

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Π.Μ.Σ. «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ & ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»**  
**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:**  
**«Απομόνωση και χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών ανθεκτικών στη  
ριφαμπικίνη του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* (στέλεχος Α)»**

**ΦΡΑΓΚΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**

Η ανάθεση της μεταπτυχιακής διατριβής με θέμα: «Απομόνωση και χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* (στέλεχος Α)», έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (11<sup>η</sup> / 13-06-2014) κατά την οποία ορίστηκε η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή.

**Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:**

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (**Επιβλέπων**), Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επ. Καθηγητής (Συνεπιβλέπων), Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής (Μέλος), Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χατζόπουλο Πολυδεύκη, Καθηγητή, επιβλέποντα της πτυχιακής μου μελέτης για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη, Επ. Καθηγητή, για τη βοήθεια που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα. Επίσης, τον ευχαριστώ για την πολύτιμη εμπειρία και γνώση που αποκόμισα μέσα από την παρούσα εργασία.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον κ. Κατινάκη Παναγιώτη, Καθηγητή, για τη βοήθεια και τις συνεχείς παρατηρήσεις και συμβουλές οι οποίες συνέβαλαν στη βέλτιστη δομή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Διδάκτορα κα. Κεφαλογιάννη Ηώ καθώς και τη Διδάκτορα κα. Αναστασία Βενιεράκη για την καθοδήγηση που μου παρείχαν στα διάφορα στάδια των πειραμάτων.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Κατερίνα Δημητρίου για τη συνεχή βοήθεια κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, αλλά και την οικογένειά μου, τους φίλους και συμφοιτητές μου που ήταν δίπλα μου σε όλη αυτή την προσπάθεια και με στήριξαν στην περάτωση της μεταπτυχιακής διατριβής, αλλά και σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Σας ευχαριστώ θερμά,  
Φράγκου Παναγιώτα

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	1
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
1. Γενικά.....	5
1.1 Βιολογικά λιπάσματα .....	7
1.2 Ριζοβακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών .....	8
1.3 Αζωτοδέσμευση .....	13
1.3.1 Μορφές αζωτοδέσμευσης .....	13
1.3.2 Αζωτοδέσμευση από το γένος <i>Azospirillum</i> .....	15
1.4 <i>Azospirillum</i> spp. ....	17
1.4.1 Ταξινόμηση του γένους <i>Azospirillum</i> .....	17
1.4.2 Μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Azospirillum</i> .....	20
1.5 Κινήσεις βακτηρίων.....	22
1.5.1 Ομαδική κίνηση (swarming).....	23
1.6 Μεταγραφή βακτηριακού DNA και αντιβιοτικά .....	28
1.6.1 Ανσαμυκίνες-ΡΙφαμικίνη .....	29
1.6.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στη ριφαμικίνη .....	33
1.6.2.1 Ανθεκτικότητα με μετάλλαξη του στόχου .....	33
1.6.2.2 Ανθεκτικότητα με διπλασιασμό του στόχου.....	36
1.6.2.3 Ανθεκτικότητα που προκύπτει από το σύμπλοκο RNA πολυμεράση-πρωτεΐνες δέσμευσης.....	37
1.6.2.4 Ανθεκτικότητα με τροποποίηση της ριφαμικίνης .....	37
1.6.2.5 Ανθεκτικότητα με τροποποίηση της διαπερατότητας.....	38
1.6.3 Η μεταγραφή στόχος αντιμικροβιακών φαρμάκων.....	38
1.6.4 Η μεταλλαξιγένεση του <i>groB</i> που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της RNA πολυμεράσης .....	40
1.6.5 Πλειοτροπικά αποτελέσματα των RifR μεταλλάξεων.....	41
1.7 Σκοπός μελέτης .....	43
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	44
2.1. Βιολογικό υλικό .....	44
2.2 Θρεπτικά υλικά.....	44

2.3 Προετοιμασία προεμβολίων .....	45
2.4.Επίστρωση τρυβλίων με τη μέθοδο streaking .....	45
2.5 Μελέτη swarming σε υποστρώματα παρουσία διαφορετικών οργανικών οξέων .....	46
2.6. Δημιουργία ανθεκτικών στελεχών στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη .....	46
2.6.1 Μελέτη ομαδικής κίνησης (swarming) των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών στη ριφαμπικίνη.....	47
2.6.2 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από το στέλεχος A του <i>Azospirillum lipoferum</i> .....	48
2.6.3Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	49
2.6.4 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης .....	50
2.6.5 Ανάκτηση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης .....	51
2.6.. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων .....	52
2.7 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	52
2.7.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα .....	52
2.7.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)..	53
2.8 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> .....	54
2.8.1 δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> κατάλληλων για μετασχηματισμό .....	54
2.8.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο .....	54
2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i> .....	55
2.10 Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού .....	57
2.11 Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών .....	57
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>59</b>
3.1. Καλλιέργεια βακτηρίων σε διαφορετικά οργανικά οξέα.....	59
3.1.1.Δοκιμή ανάπτυξης βακτηρίων σε οργανικά οξέα .....	59
3.1.2.Μελέτη ομαδικής κίνησης σε υποστρώματα με διαφορετικά οργανικά οξέα .....	60
3.2.Ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη .....	63
3.2.1.Ομαδική κίνηση σε υπόστρωμα NB απουσία και παρουσία ριφαμπικίνης.....	63
3.2.2. Ανάλυση του προϊόντος της PCR .....	68
3.2.3. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας.....	69
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>77</b>
<b>5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>81</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>95</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διάφοροι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται στην περιοχή της ριζόσφαιρας των φυτών και να συμβάλλουν στην αύξηση και ανάπτυξη αυτών. Η ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία, pH, θρεπτικά συστατικά) αλλά και από παράγοντες που μπορεί να αναστέλλουν την αύξησή τους (π.χ. αντιβιοτικά).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του στελεχών H2 και 4a2 του βακτηρίου *Azospirillum brasilense* και του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* σε υπόστρωμα παρουσία διαφορετικών οργανικών οξέων (μηλικό οξύ και κιτρικό οξύ) καθώς επίσης και η ομαδική κίνησή τους σε υπόστρωμα περιεκτικότητας 0,6% w/v άγαρ παρουσία των παραπάνω οργανικών οξέων.

Επίσης, για το στέλεχος A του βακτηρίου *A. lipoferum* μελετήθηκε η ικανότητά του να αναπτύσσει ανθεκτικές μορφές όταν βρίσκεται σε υπόστρωμα που περιέχει το αντιβιοτικό ριφαμπικίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (50 mg/ml και 100 mg/ml). Αυτές οι ανθεκτικές μορφές, στη συνέχεια μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να κινούνται ομαδικά σε υποστρώματα περιεκτικότητας 0,6% άγαρ, παρουσία και απουσία ριφαμπικίνης και για τις δύο συγκεντρώσεις (50 mg/ml και 100 mg/ml). Με αλληλούχισι του γονιδιώματος των ανθεκτικών στελεχών εντοπίστηκαν οι περιοχές στις οποίες έγιναν οι μεταλλάξεις ώστε τα βακτήρια να εμφανίσουν το χαρακτήρα της ανθεκτικότητας στη ριφαμπικίνη.

## **ABSTRACT**

Various soil microorganisms have the ability to grow in the region of the rhizosphere of plants and contribute to the growth and development of these. The growth of these microorganisms can be influenced by environmental factors such as temperature, pH, nutrients, but also and factors that may inhibit their growth (eg. antibiotics).

In this thesis we studied the ability of the strains H2 and 4a2 of the bacterium *Azospirillum brasilense* and the strain A of the bacterium *A. lipoferum*, to grow on a substrate which may contain different organic acids (malic acid and citric acid), as well as swarming motility on substrates with 0,6% w/v agar and the presence of the above organic acids.

Also, for the strain A of the bacterium *A. lipoferum*, was studied the ability to develop resistant forms when in the substrate exists the antibiotic rifampicin at different concentrations (50 mg/ml and 100 mg/ml). Then, the mutants were studied for their ability to swarm when the agar concentration is 0.6% and there is a presence or absence of rifampicin for both concentrations (50 mg/ml and 100 mg/ml). By sequencing the genome of resistant strains we could identify the areas where the mutations which give resistance, occurred.

## 1. Γενικά

Οι μικροοργανισμοί αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της βιοποικιλότητας στη γη. Χωρίς τους μικροοργανισμούς η ανάπτυξη και συντήρηση των ανώτερων μορφών ζωής θα ήταν αδύνατη. Για παράδειγμα, το οξυγόνο που αναπνέουμε είναι αποτέλεσμα μικροβιακής δράσης, ο μεταβολισμός των εδαφικών συστατικών σε απλούστερες ενώσεις δε θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χωρίς τους μικροοργανισμούς ή επίσης, η επιβίωση πολλών φυτικών οργανισμών εξαρτάται από τη συνεργιστική δράση φυτού και μικροοργανισμού. Όμως, αρκετοί μικροοργανισμοί εμφανίζουν αρνητική επιρροή σε άλλες μορφές ζωής (φυτά, ζώα, άνθρωπος κ.α.) παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική ανάπτυξη, λειτουργία αλλά και επιβίωση τους (Madigan *et al.*, 2007). Οι κυριότερες κατηγορίες μικροοργανισμών είναι τα Αρχαία, τα Βακτήρια, οι Μύκητες, τα Πρώτιστα, οι Ιοί και τα Prions. Οι μικροοργανισμοί καταλαμβάνουν ένα πολύ μεγάλο μέρος της ζωής στον πλανήτη. Εκτιμήσεις δείχνουν ότι ο αριθμός τους είναι της τάξεως  $5 \times 10^{30}$  κύτταρα. Ένα σημαντικό τμήμα των μικροοργανισμών καταλαμβάνουν οι προκαρυώτες, δηλαδή τα Αρχαία και τα Βακτήρια. Προκαρυωτικός θεωρείται ένας μονοκύτταρος μικροοργανισμός που διαθέτει πρωτοπλασματική μεμβράνη, περιβάλλεται, συνήθως, από κυτταρικό τοίχωμα (Τζάμος, 2007) και στερείται πυρήνα. Τα προκαρυωτικά κύτταρα, όσο μικρά και αν είναι, συνιστούν το μεγαλύτερο τμήμα της συνολικής βιομάζας του πλανήτη και καθίστανται σημαντική πηγή θρεπτικών ουσιών της ζωής (Madigan *et al.*, 2007).

Οι μικροοργανισμοί είναι δυνητικά σε θέση να εκτελούν χημικές τροποποιήσεις οργανικών και ανόργανων ουσιών σε μεγάλη κλίμακα (Trundiger και Bud, 1967).

Η μικροβιακή θρέψη αφορά την τροφοδοσία των κυττάρων με θρεπτικές ουσίες απαραίτητες για την επιβίωση και ανάπτυξη τους. Οι διάφοροι οργανισμοί χρειάζονται διαφορετικές ομάδες θρεπτικών ουσιών, οι οποίες δεν είναι όλες απαραίτητες στις ίδιες ποσότητες, από τις οποίες όσες είναι αναγκαίες σε μεγάλες ποσότητες καλούνται μακροτροφικές, ενώ όσες απαιτούνται σε μικρότερες ποσότητες καλούνται μικροτροφικές (ψευδάργυρος, χαλκός, μαγγάνιο, κλπ). Οι βασικότερες μακροτροφικές ουσίες θεωρούνται ο άνθρακας και το άζωτο (Madigan *et al.*, 2007).

Τα βακτήρια χρειάζονται για την ανάπτυξή τους συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά. Αυτά τα θρεπτικά πρέπει να περιέχουν χημικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για τη δράση ενζύμων και συστημάτων μεταφοράς (Gottschalk, 1986). Ένα τυπικό βακτηριακό κύτταρο αποτελείται από 70-80% νερό. Το υπόλοιπο αποτελείται κυρίως από 4 σημαντικές οργανικές



ενώσεις: πρωτεΐνη 50% της ξηρής μάζας των κυττάρων, υδατάνθρακες 10%, λίπος 10%, νουκλεϊκά οξέα 20% και ανόργανες ουσίες 3%. Για την κατασκευή αυτών των ενώσεων, το κύτταρο χρειάζεται να προσλαμβάνει από κατάλληλες πηγές νερό, άνθρακα, άζωτο, ορυκτά P, S, Na, K, κ.λπ. αλλά και αυξητικούς παράγοντες. Η θρέψη των βακτηρίων επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως pH, O<sub>2</sub>, θερμοκρασία, οσμωτική πίεση, κ.λπ. Για ορισμένους οργανισμούς, οι πηγές πρέπει να είναι πολύ συγκεκριμένες, για παράδειγμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο CO<sub>2</sub> ή N<sub>2</sub>, ενώ για άλλους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν πολλές διαφορετικές πηγές. Η πηγή άνθρακα είναι συνήθως και η πηγή ενέργειας για τα περισσότερα βακτήρια. Κάθε φυσική (και κάποιες συνθετικές) οργανική ένωση μπορεί να μεταβολίζεται από ορισμένα βακτήρια. Η πηγή αζώτου είναι συνήθως μερικώς ελαττωμένη και μπορεί να είναι νιτρικό άζωτο (HNO<sub>3</sub>) ή αμμωνία (NH<sub>3</sub>), ή αμινοξέα. Το άζωτο αποτελεί το 10 % του ξηρού βάρους των βακτηρίων. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι ειδικές ενώσεις που χρειάζονται τα βακτήρια για να αυξηθούν. Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται βιταμίνες (A, B, C, D, και E), νιασίνη, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, παντοθενικό οξύ, πυριδοξίνη, κ.λπ. και αμινοξέα. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες μπορεί να είναι σιδηροφόρα (ενώσεις μεταφοράς σιδήρου), αιμίνη, NAD και βασικά αμινοξέα.

Πολλοί προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι απαραίτητο να έχουν ως πηγή άνθρακα κάποιου τύπου οργανική ένωση. Ορισμένοι προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι αυτότροφοι, δηλαδή ικανοί να δημιουργούν όλες τις οργανικές δομές τους από διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) και ενέργεια προερχόμενη από το φως ή από ανόργανες χημικές ενώσεις. Άλλοι όμως δεν έχουν την ικανότητα σύνθεσης όλων των απαραίτητων ενώσεων που χρειάζονται και εξαρτώνται από συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να συνδυαστούν για να παραχθούν βιταμίνες, αμινοξέα, πουρίνες και πυριμιδίνες αλλά και άλλες ενώσεις λιγότερο σημαντικές (Gottschalk, 1986).

Μεγάλο πλήθος βακτηρίων συναντάται στο έδαφος και ιδιαίτερα στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Η ριζόσφαιρα είναι ένα πολύπλοκο σύστημα στο οποίο κανείς μπορεί να συναντήσει, ρίζες, μικροοργανισμούς, αλλά και διάφορες οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Εκτιμάται ότι κάθε ρίζα ενός φυτού έχει μία χημικά, φυσικά και βιολογικά μοναδική ριζόσφαιρα. Αυτή η πολυπλοκότητα, σε συνδυασμό με τους αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης που επιβάλλονται στο φυτό, είναι αναγκαία ώστε το φυτό να προσλάβει από το έδαφος τους πόρους που χρειάζεται. Για να επιβιώσει το φυτό χρειάζεται να αλληλεπιδράσει με διαφορετικά μέλη της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας με

αποτέλεσμα να υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ μικροοργανισμών και φυτών (Jones και Hinsinger, 2008).

### 1.1. Βιολογικά λιπάσματα

Τα λιπάσματα βιολογικής προέλευσης είναι παρασκευάσματα τα οποία περιέχουν ευεργετικούς μικροοργανισμούς σε βιώσιμη κατάσταση, που προορίζονται για εφαρμογή στο έδαφος ή σε σπόρους και έχουν σχεδιαστεί για να βελτιώνουν τη γονιμότητα του εδάφους και να βοηθούν στην ανάπτυξη των φυτών, αυξάνοντας τον αριθμό και τη βιολογική δράση των επιθυμητών μικροοργανισμών στο περιβάλλον της ρίζας (Sivasakthivelan και Saranraj, 2013). Τα βιολογικά λιπάσματα είναι γνωστά και ως εμβόλια ή βιο-εμβόλια. Τα λιπάσματα αυτά έχουν ευρεία χρήση στην Ινδία τα τελευταία τριάντα χρόνια εξαιτίας της αποτελεσματικότητάς τους, της συμβολής τους στην αύξηση της παραγωγικότητας της καλλιέργειας, τη γονιμότητα του εδάφους και το φιλικό χαρακτήρα προς το περιβάλλον. Αποτελούν αναπόσπαστο μέρος του συστήματος ολοκληρωμένης παροχής θρεπτικών συστατικών στα φυτά (Integrated Plant Nutrition System - IPNS) και της βιολογικής γεωργίας. Ένα από τα κύρια προβλήματα αυτής της μεθόδου είναι η διατήρηση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών κατά την αποθήκευση, αλλά και άλλοι παράμετροι όπως το μέσο ανάπτυξης, η φυσιολογική κατάσταση των μικροοργανισμών κατά τη συλλογή τους (Chen και Alexander, 1973), η διαδικασία αποξήρανσης, ο ρυθμός ξήρανσης (Mary *et al.*, 1985), η θερμοκρασία αποθήκευσης και η δραστηριότητα του νερού του εμβολίου, τα οποία επηρεάζουν την ίδια τους τη ζωή.

Το *Azospirillum* είναι πολύ σημαντικό βιολογικό λίπασμα το οποίο συμμετέχει στην αζωτοδέσμευση σε συνεργασία με τις πλέον βασικές καλλιέργειες τροφίμων παγκοσμίως όπως είναι το ρύζι, το καλαμπόκι, το σόργο, το σιτάρι και το κечρί. Διάφορα μέλη του γένους *Azospirillum* είναι διαδεδομένα στα εδάφη και ο εμβολιασμός τους σε δημητριακά και κτηνοτροφικά φυτά είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των αποδόσεων σε πολλά πειράματα αγρού (Boddey και Dobreiner, 1988), όχι μόνο εξαιτίας της αζωτοδέσμευσης αλλά και από την παραγωγή συστατικών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Tien *et al.*, 1979).

Υπάρχουν διάφορα σκευάσματα βιολογικής προέλευσης τα οποία έχουν αντικαταστήσει τα χημικά λιπάσματα. Μερικά από τα οποία περιέχουν συνδυασμό

μικροοργανισμών είναι τα Symbion-N (*Azospirillum*, *Rhizobium*, *Acetobacter* και *Azotobacter* - <http://www.tstanes.com/products-symbion-n.html>), Gmax Nitromax (*Azospirillum* και *Azotobacter* -<http://www.greenmaxagrotech.com/azotobacter.html>), Bio-Azospirillum (<http://www.specialbiochem.co.in/bio-azospirillum-azospirillum-biofertilizer.htm>) κ.α. Τα λιπάσματα αυτά μπορεί να είναι σε υγρή ή στερεή μορφή.

## 1.2. Ριζοβακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)

Η ζώνη του εδάφους που περιβάλλει άμεσα το ριζικό σύστημα αναφέρεται ως ριζόσφαιρα (Walker *et al.*, 2003), ενώ ο όρος «ριζοβακτήρια» σημαίνει μια ομάδα ριζόσφαιρικών βακτηρίων τα οποία αποικίζουν το περιβάλλον της ρίζας (Kloepper *et al.*, 1991). Οι ρίζες εκτός από την παροχή της μηχανικής στήριξης και τη διευκόλυνση πρόσληψης νερού και θρεπτικών συστατικών, επίσης συνθέτουν, συσσωρεύουν και εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων (Walker *et al.*, 2003). Αυτές οι ριζικές εκκρίσεις των φυτών (Πίνακας 1), δρουν ως χημικά προσελκυστικά για έναν τεράστιο αριθμό μικροοργανισμών, ενώ άλλες ενεργούν ως απωθητικά. Η σύνθεση αυτών των εκκριμάτων εξαρτάται από τη φυσιολογική κατάσταση και τα είδη φυτών και μικροοργανισμών (Kang *et al.*, 2010). Επιπλέον, οι εκκρίσεις αυτές προωθούν τις συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις φυτών και μικροοργανισμών και αναστέλλουν την ανάπτυξη των ανταγωνιστικών φυτικών ειδών (Nardi *et al.*, 2000).

Πίνακας 1. Διάφορες ενώσεις στα εκκρίματα ριζών από διαφορετικά φυτά (Dakora και Philips, 2002).

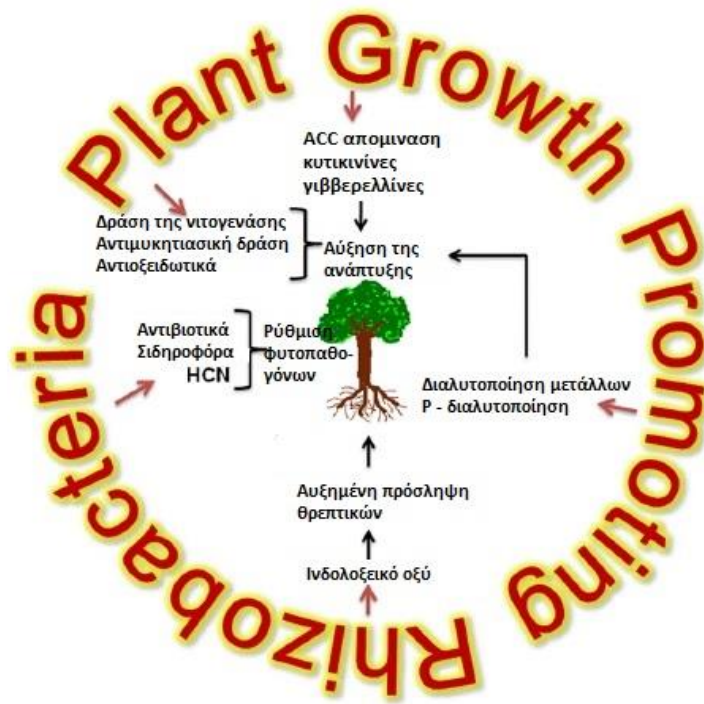
Αμινοξέα	α-αλανίνη, β-αλανίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, κυστεΐνη, κυστίνη, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, σερίνη, θρεονίνη, προλίνη, βαλίνη, τρυπτοφάνη, ορνιθίνη, ιστιδίνη, αργινίνη, ομοσερίνη, φαινυλαλανίνη, γ-αμινοβουτυρικό οξύ, α-αμινοαδιπικό οξύ
Οργανικά οξέα	Κιτρικό οξύ, οξαλοξικό οξύ, μηλικό οξύ, φουμαρικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, οξικό οξύ, βουτυρικό οξύ, βαλεριανικό οξύ, γλυκολινικό οξύ, πισιδικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, ακονιτικό οξύ, γαλακτικό οξύ, πυρουβικό οξύ, γλουταρικό οξύ, μαλονικό οξύ, τετρονικό οξύ, αλδονικό οξύ, ερυθρονικό οξύ
Σάκχαρα	Γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, ριβόζη, ξυλόζη,

	ραμνόζη, αραβινόζη, δεσόξυριβόζη, ολιγοασακχαρίτες, ραφινόζη, μαλτόζη
Βιταμίνες	Βιοτίνη, θειαμίνη, παντοθενικό οξύ, ριβαφλαβίνη, νιασίνη
Πουρίνες/νουκλεοσίδια	Αδενίνη, γουανίνη, κυτιδίνη, ουριδίνη
Ένζυμα	Φωσφορικό-αλκαλικό οξύ, αναστροφάση, αμυλάση, πρωτεάση
Ανόργανα ιόντα και αέρια μόρια	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , OH <sup>-</sup> , H <sup>+</sup> , CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub>

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το έδαφος φιλοξενεί ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων (περίπου 10<sup>8</sup> έως 10<sup>9</sup> κύτταρα ανά γραμμάριο εδάφους), ενώ ο αριθμός των καλλιεργήσιμων βακτηριακών κυττάρων στο έδαφος είναι γενικά περίπου 1% του συνολικού αριθμού κυττάρων που υπάρχουν (Schoenborn *et al.*, 2004). Ο αριθμός και το είδος των βακτηρίων που βρίσκονται σε διαφορετικά εδάφη επηρεάζεται από τις εδαφολογικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, η παρουσία άλατος και άλλες χημικές ουσίες, καθώς και από τον αριθμό και τα είδη των φυτών που βρίσκονται σε αυτά τα εδάφη (Glick *et al.*, 1999). Η συγκέντρωση των βακτηρίων που βρίσκονται γύρω από τις ρίζες των φυτών είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το υπόλοιπο έδαφος και αυτό συμβαίνει λόγω της παρουσίας θρεπτικών ουσιών όπως σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και άλλα μικρά μόρια από τα εκκρίματα της ρίζας του φυτού, οι οποίες υπολογίζεται ότι είναι το ένα τρίτο του άνθρακα που δεσμεύεται από τα φυτά (Badri *et al.*, 2009a; Badri *et al.*; 2009, Bais *et al.*, 2006; Whipps *et al.*, 1990).

Τα βακτήρια που υπάρχουν στο έδαφος μπορεί να είναι ευεργετικά, βλαβερά ή ουδέτερα (Lynch, 1990). Τα βακτήρια της ριζόσφαιρας που προάγουν την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών ανήκουν στην ομάδα των PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Vessey, 2003). Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ελεύθερα διαβιούντα βακτήρια, βακτήρια τα οποία σχηματίζουν συγκεκριμένες συμβιωτικές σχέσεις με τα φυτά, ενδοφυτικά βακτήρια τα οποία αποικίζουν σε ένα μέρος ή όλο τον ιστό της ρίζας αλλά και κυανοβακτήρια (Glick, 1995).

Τα PGPR, πρέπει να είναι ικανά να αποικίσουν την επιφάνεια της ρίζας, να μπορούν να επιβιώσουν, να πολλαπλασιαστούν και να ανταγωνίζονται άλλους μικροοργανισμούς, τουλάχιστον για το διάστημα που απαιτείται για να επάγουν την αύξηση και να συμβάλλουν στην προστασία των φυτών (Kloepper, 1994).



Εικόνα 1. Μηχανισμός προώθησης της ανάπτυξης των φυτών από ριζοβακτήρια (Munees και Mulugeta, 2013)

Οι Somers *et al.* (2004), ταξινόμησαν τα PGPR ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους σε (i) Βιο-λιπάσματα (Biofertilizers), αυξάνουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, (ii) Φυτικοί διεγέρτες (phytostimulators), προωθούν την ανάπτυξη των φυτών, συνήθως μέσω φυτοορμονών, (iii) αποκαταστάτες της ριζόσφαιρας (rhizoremediators), αποικοδομούν οργανικούς ρύπους και (iv) βιολογικά φυτοφάρμακα (biopesticides), χρήση για έλεγχο ασθενειών, κυρίως από την παραγωγή αντιβιοτικών και αντιμυκητιακών μεταβολιτών (Antoun και Prevost, 2005). Τα PGPR μπορούν να διαχωριστούν σε εξωκυτταρικά (ePGPR) τα οποία υπάρχουν στην ριζόσφαιρα, στη ριζική επιφάνεια ή στους χώρους μεταξύ των κυττάρων του φλοιού της ρίζας και ενδοκυτταρικά (iPGPR), τα οποία υπάρχουν μέσα στα κύτταρα των ριζών, γενικά σε εξειδικευμένες οζώδεις δομές (Figueiredo *et al.*, 2011). Μερικά παραδείγματα ePGPR είναι τα *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* και *Serratia*, κλπ (Bhattacharyya και Jha, 2012). Παρομοίως, μερικά παραδείγματα iPGPR είναι τα *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* και *Rhizobium* της οικογένειας Rhizobiaceae.

Τα PGPR είναι σημαντικά για τη γεωργία αφού είναι η καλύτερη εναλλακτική λύση για αντικατάσταση των χημικών λιπασμάτων, επειδή η εφαρμογή τους ως βιολιπάσματα μειώνει το κόστος παραγωγής των καλλιεργειών. Ένας μεγάλος αριθμός των PGPR, όπως τα

*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* και *Paenibacillus* έχει απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα διαφόρων καλλιεργειών (Saharan και Nehra, 2011; Vessey, 2003). Η εφαρμογή τους ως βιολιπάσματα έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ανάπτυξης και της απόδοσης σε διάφορες καλλιέργειες όπως το σιτάρι, το ρύζι, το καλαμπόκι και το ζαχαροκάλαμο (Bhattacharyya και Jha, 2011; Moutia *et al.*, 2010;Saharan και Nehra, 2011; Mirza *et al*, 2001) .Διευκολύνουν τα φυτά να αποκτήσουν από το έδαφος διαθέσιμους πόρους και θρεπτικά συστατικά που στερούνται, όπως είναι το άζωτο, ο φώσφορος και ο σίδηρος (Glick, 2012).

Τα *Azospirillum* επηρεάζουν την αύξηση και ανάπτυξη διαφόρων φυτών, παράγοντας φυτοορμόνες, όπως αυξίνες, οι οποίες έχουν πρωταρχική επιρροή στην ανάπτυξη των ριζών. Ένα βελτιωμένο ριζικό σύστημα οδηγεί σε καλύτερη απορρόφηση νερού και θρεπτικών με αποτέλεσμα την αύξηση των αποδόσεων της καλλιέργειας.

Γενικότερα, τα PGPR προάγουν την ανάπτυξη φυτών άμεσα με τη διευκόλυνση απόκτησης των πόρων (άζωτο, φωσφόρο και βασικά μέταλλα) ή διαμορφώνοντας τα επίπεδα των φυτικών ορμονών, είτε έμμεσα με τη μείωση των ανασταλτικών αποτελεσμάτων διαφόρων παθογόνων στην ανάπτυξη των φυτών και δρώντας ως παράγοντες βιοελέγχου (Glick, 2012) (Εικόνα 1). Άμεσοι μηχανισμοί ανάπτυξης των φυτών είναι (i) η αζωτοδέσμευση, (ii) η διαλυτοποίηση των φωσφορικών, (iii) η παραγωγή σιδηροφόρων, (iv) η παραγωγή φυτοορμονών και (v) η δράση του ενζύμου 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase.

PGPR	Φυτό	Συνθήκες	Αποτελέσματα προσθήκης των βακτηρίων στα φυτά	Βιβλιογραφία
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i>	Artichoke ( <i>Cynara scolymus</i> )	In vitro	Βακτήρια διαλυτοποίησης μαζί με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια οδήγησαν σε σημαντική αύξηση των ριζιδίων, το μήκος και το βάρος των βλαστών, την ταχύτητα της βλάστησης μείωση του μέσου χρόνου βλάστησης.	Jahanian <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas sp.</i> PS1	Greengram ( <i>Vigna radiata</i> (L.) wilczek)	Γλάστρα	Σημαντική αύξηση του ξηρού βάρους των φυτών, του αριθμού των οζιδίων, της συνολικής περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη, αύξηση στο ριζικό N, το N των βλαστών την απόδοση των σπόρων και την περιεκτικότητα των σπόρων σε πρωτεΐνες.	Ahemad and Khan (2012), Ahemad και Khan (2011), Ahemad και Khan (2010)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Soybean, wheat	Αγρός	Σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα των εδαφικών ενζύμων, της συνολικής παραγωγικότητας και της πρόσληψης των θρεπτικών συστατικών	Sharma <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas putida</i> strain R-168, <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain R-93, <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090, <i>Pseudomonas putida</i> DSM291, <i>Azospirillum lipoferum</i> DSM 1691, <i>Azospirillum brasilense</i> DSM 1690	Maize ( <i>Zea mays</i> L.)	Αγρός	Το ύψος του φυτού, το βάρος των σπόρων, ο αριθμός των σπόρων και το ξηρό βάρος των βλαστών αυξήθηκαν.	Gholami <i>et al.</i> (2009)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Γλάστρα	Σημαντική αύξηση του μήκους της ρίζας και των βλαστών.	Sachdev <i>et al.</i> (2009)
<i>Azospirillum amazonense</i>	Rice ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Θερμοκήπιο	Αύξηση της ξηρής ουσίας σπόρων (7–11.6%), του αριθμού των ταξιανθιών (3–18.6%) και της συσσώρευσης αζώτου στα σιτηρά κατά την ωρίμανση (3.5–18.5%).	Rodrigues <i>et al.</i> (2008)
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Common bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Θερμοκήπιο	Αύξηση της ανάπτυξης της ρίζας.	Remans <i>et al.</i> (2008)

<i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i>	Cotton ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Αγρός	Η απόδοση σε σπόρους (21%), το ύψος των φυτών (5%) και ο μικροβιακός πληθυσμός στο έδαφος (41%), αυξήθηκαν, ενώ το βάρος της κάψας και η παραγωγή παρέμειναν στατιστικά ανεπηρέαστα.	Anjum <i>et al.</i> (2007)
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Bacillus pantothenicus</i> , <i>Pseudomonas pieketti</i>	Rice ( <i>Oryza sativa</i> )	Μικρά κομμάτια εδάφους	Αυξημένες αποδόσεις στο ρύζι έως και 76.9%.	Thakuria <i>et al.</i> (2004)

**Πίνακας 2. Παραδείγματα PGP ριζοβακτηρίων και τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά από την προσθήκη τους στα φυτά.**

### 1.3. Αζωτοδέσμευση

#### 1.3.1. Μορφές αζωτοδέσμευσης

Το άζωτο (N) είναι το πιο σημαντικό θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών. Μολονότι υπάρχει περίπου 78% N<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, δεν είναι διαθέσιμο στα αναπτυσσόμενα φυτά. Το ατμοσφαιρικό N<sub>2</sub> μετατρέπεται σε μορφές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα φυτά με τη βιολογική δέσμευση N<sub>2</sub> (Biological nitrogen fixation-BNF), η οποία μετατρέπει το άζωτο σε αμμωνία με τη βοήθεια αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών του εδάφους μέσω της δράσης του ενζύμου της νιτρογενάσης (Kim and Rees, 1994). Το στοιχείο αυτό είναι κύριο συστατικό των πρωτεϊνών, των νουκλεϊνικών οξέων και διαφόρων άλλων συστατικών του κυττάρου. Απαντά στη φύση σε οργανική αλλά και σε ανόργανη μορφή, με τη δεύτερη να καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος ως αμμωνία (NH<sub>3</sub>), νιτρικά άλατα (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ή N<sub>2</sub>. Ορισμένα βακτήρια χρησιμοποιούν αμμωνία ως συγκεκριμένη πηγή αζώτου, άλλα χρησιμοποιούν νιτρικά άλατα, ενώ μόνο τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιούν το ατμοσφαιρικό άζωτο (N<sub>2</sub>) ως πηγή αζώτου.

Παρ' όλη την αφθονία του, το άζωτο, είναι ένας από τους πιο περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη των καλλιεργειών, με τα αζωτούχα λιπάσματα να αντιπροσωπεύουν μεγάλο ποσοστό του κόστους μιας καλλιέργειας. Έτσι, για την αποφυγή των υψηλών δαπανών που προκύπτουν από τη συνεχή χρήση αζωτούχων λιπασμάτων στράφηκε το ενδιαφέρον στο βιολογικό τρόπο αζωτοδέσμευσης. Η συνεργιστική αζωτοδέσμευση, πραγματοποιείται από ελεύθερους διαβιόντες διαζωτροφικούς



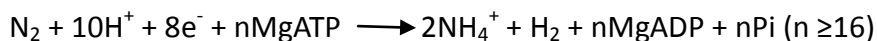
μικροοργανισμούς, κάτω από την άμεση επίδραση του φυτού ξενιστή. Τα φυτά εφοδιάζουν τους διαζωτροφικούς οργανισμούς με οργανικά υποστρώματα (εκκρίματα, λύματα, επιδερμικά κύτταρα) και σε αντάλλαγμα, οι μικροοργανισμοί δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο ( $N_2$ ), το οποίο μεταφέρεται άμεσα ή έμμεσα στο φυτό. Τα ελεύθερα διαβιούντα βακτήρια δεσμεύουν το  $N_2$  μόνο κατά τη διάρκεια της ενεργούς ανάπτυξής τους, το οποίο σημαίνει ότι χρειάζονται οργανικά υποστρώματα, όχι μόνο για να παράγουν ενέργεια, αλλά και για να συνθέσουν νέα κύτταρα, σε αντίθεση με τα συμβιωτικά βακτήρια, τα οποία δε διαιρούνται και γι' αυτό είναι απαραίτητη η παρουσία αρκετής ποσότητας πηγής άνθρακα για την ανάπτυξή τους (Alhashin και Attitala, 2011).

Η BNF αντιπροσωπεύει περίπου τα δύο τρίτα της αζωτοδέσμευσης σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ το υπόλοιπο άζωτο συντίθεται από τη διαδικασία Haber-Bosch (Rubio και Ludden, 2008). Η βιολογική δέσμευση του αζώτου συμβαίνει, γενικά σε ήπιες θερμοκρασίες, από αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση (Raymond *et al.*, 2004). Επιπλέον, η BNF αντιπροσωπεύει μια οικονομικά συμφέρουσα και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση σε αντίθεση με τα χημικά λιπάσματα (Ladha *et al.*, 1997).

Η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται από φυλογενετικά διαφορετικούς προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι ανήκουν στις οικογένειες των βακτηρίων και των αρχαίων (Young, 1992). Οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί μπορεί να είναι συμβιωτικά και μη συμβιωτικά βακτήρια. Τα συμβιωτικά της οικογένειας Rhizobiaceae δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με ψυχανθή και άλλα δέντρα (Ahemad και Khan, 2012; Zahran, 2001), ενώ τα μη-συμβιωτικά είναι ελεύθερα διαβιούντα, συνεργιστικά και ενδοφυτικά, όπως είναι τα κυανοβακτήρια (*Anabaena*, *Nostoc*), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* και *Azocarus* κ.α. (Bhattacharyya and Jha, 2012). Τα μη συμβιωτικά παρέχουν ένα μικρό ποσοστό του δεσμευμένου αζώτου που χρειάζεται το φυτό (Glick, 2012).

Δομικά, το σύστημα της αζωτοδέσμευσης ποικίλει στα διαφορετικά βακτηριακά γένη. Η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης διεξάγεται από ένα σύμπλοκο ενζύμου, το σύμπλοκο της νιτρογενάσης (Kim and Rees, 1994). Η δομή της νιτρογενάσης έχει χαρακτηριστεί από τους Dean and Jacobson (1992) ως ένα μεταλλοένζυμο δύο συστατικών που αποτελείται από την αναγωγή της δινιτρογενάσης η οποία είναι πρωτεΐνη σιδήρου και τη δινιτρογενάση η οποία έχει έναν μεταλλικό συμπάροντα. Η αναγωγή της δινιτρογενάσης παρέχει ηλεκτρόνια με υψηλή δύναμη ισχύος ενώ η δινιτρογενάση χρησιμοποιεί αυτά τα ηλεκτρόνια για να μετατρέψει το  $N_2$  σε  $NH_3$ . Με βάση τον μεταλλικό

συμπαράγοντα έχουν χαρακτηριστεί τρία συστήματα αζωτοδέσμευσης: (α) το σύστημα νιτρογενάσης-μολυβδαινίου (Mo-nitrogenase), (β) το σύστημα νιτρογενάσης-βαναδίου (V-nitrogenase) και (γ) το σύστημα νιτρογενάσης-σιδήρου (Fe-nitrogenase).



Από αυτή την αντίδραση φαίνεται ότι η αφομοίωση του αζώτου απαιτεί υψηλά ποσά βιολογικής ενέργειας (Halbleib και Ludden, 2000).

Το μεγαλύτερο ποσοστό βιολογικής αζωτοδέσμευσης παρέχεται από τη νιτρογενάση μολυβδαινίου η οποία βρίσκεται σε όλους τους διαζωτροφικούς οργανισμούς (Bishop και Jorgerger, 1990). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αζωτοδέσμευση ονομάζονται γονίδια *nif* και εντοπίζονται τόσο σε συμβιωτικά αλλά και σε ελευθέρως διαβιούντα συστήματα (Kim and Rees, 1994). Τα γονίδια *nif* περιλαμβάνουν δομικά γονίδια που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της Fe-πρωτεΐνης, στη βιοσύνθεση του συμπαράγοντα σιδήρου-μολυβδαινίου και στη μεταφορά ηλεκτρονίων. Επίσης, περιλαμβάνει ρυθμιστικά γονίδια που απαιτούνται για τη σύνθεση και τη λειτουργία του ενζύμου (Glick, 2012).

Δεδομένου ότι για τις ενώσεις αυτές εκδηλώνεται έντονος ανταγωνισμός στα μικροβιακά οικοσυστήματα, η ικανότητα αζωτοδέσμευσης προσδίδει σημαντικό οικολογικό πλεονέκτημα στους αντίστοιχους οργανισμούς. Η βιολογική δέσμευση του αζώτου, μαζί με τη φωτοσύνθεση ως προμηθευτή ενέργειας, είναι η βάση όλης της ζωής στη Γη.

### 1.3.2. Αζωτοδέσμευση από το γένος *Azospirillum*

Η αζωτοδέσμευση είναι ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο τα *Azospirillum* επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών (Okon *et al.*, 1983). Μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τα βακτήρια αυτά, παρατηρείται σημαντική αύξηση του συνολικού αζώτου στους βλαστούς και στους σπόρους (Karulnik *et al.*, 1981).

Έχουν μελετηθεί οι σχέσεις σε 12 στελέχη του *A. brasilense* σε ρίζες σιταριού. Συγκρίθηκαν για το πώς ανταποκρίνονται κατά την αποίκηση της ρίζας, στην επαγωγή της ανάπτυξης και στον εφοδιασμό του φυτού με άζωτο. Όλα τα στελέχη αποίκισαν στην επιφάνεια της ρίζας και στο εσωτερικό της. Τα περισσότερα στελέχη προκάλεσαν την ανάπτυξη του φυτού αλλά σε διαφορετικό βαθμό το καθένα. Μερικά αύξησαν το συνολικό άζωτο στις ρίζες και στα φύλλα έως και 80% πάνω, σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά, ενώ άλλα δε φάνηκαν να επηρεάζουν την περιεκτικότητα του φυτού σε άζωτο. Οι επιδράσεις ποικίλουν για τα διαφορετικά στελέχη. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το *A. brasilense* παρέχει άζωτο στα φυτά σιταριού και πιθανώς η ποσότητα εξαρτάται

από την ειδική αλληλεπίδραση των βακτηρίων με την ποικιλία (Saubidet και Barneix, 1998).

Μέτρηση της δέσμευσης του αζώτου μετά τον εμβολιασμό με το *A. lipoferum* και το *A. brasilense* στο ρύζι έδειξε ότι το N που προέρχεται από την ατμόσφαιρα ήταν 20,0% (*A. lipoferum*) και 19,9% (*A. brasilense*) σε ρύζι μπασμάτι και 58,9% (*A. lipoferum*) και 47,1% (*A. brasilense*) σε σούπερ-ρύζι μπασμάτι (Mirza *et al.*, 2000). Χρησιμοποιώντας ένα in vitro μοντέλο (*A. brasilense*-σιτάρι) μέσα σε 70 ώρες μετά τον εμβολιασμό, ασήμαντες ποσότητες πρόσφατα δεσμευμένου αζώτου μεταφέρθηκαν από ένα στέλεχος του *A. brasilense* στους ιστούς βλαστού σε σιτάρι. Με προσθήκη μηλικού οξέως η μεταφορά αζώτου στους βλαστούς ήταν 48 φορές μεγαλύτερη, το οποίο σημαίνει ότι το 20% του αζώτου στους βλαστούς προέρχεται από την αζωτοδέσμευση. Η αδυναμία του φυτού να απελευθερώσει ικανές ποσότητες άνθρακα στη ριζόσφαιρα είναι σημαντικός παράγοντας στη συνεργασία μεταξύ *A. brasilense* και σιταριού (Wood *et al.*, 2001). Εμβολιασμός ρυζιού με *A. amazonense* αύξησε το ξηρό βάρος των σπόρων και τη συσσώρευση του αζώτου κατά την ωρίμανση. Η συνεισφορά της αζωτοδέσμευσης ήταν 27% της συνεισφοράς του φυτού. Η αύξηση του ρυζιού από το *A. amazonense* ήταν κατά κύριο λόγο απάντηση στην αζωτοδέσμευση (Rodrigues *et al.*, 2008). Εμβολιασμός του *A. brasilense*, σε χειμερινό σιτάρι, με μια σημειακή μετάλλαξη στην αμμωνιακή θέση δέσμευσης της συνθετάσης της γλουταμίνης, έδειξε τη σημασία της συμβολής του αζώτου στο φυτό. Η συνθετάση της γλουταμίνης είναι ένα από τα κύρια ένζυμα αφομοίωσης της αμμωνίας. Μεταλλάξεις σε αυτό το ένζυμο γενικά έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση αμμωνίου από το βακτήριο στο περιβάλλον. Το μεταλλαγμένο βακτήριο από το οποίο εκκρίνεται αμμώνιο, εμφάνισε καλύτερες επιδόσεις από το *A. brasilense* άγριου τύπου για την ανάπτυξη και απόδοση του σιταριού (Van Dommelen *et al.*, 2009).

Σε διάφορα συστήματα εμβολιασμού, παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση του δεσμευμένου αζώτου με συνέπεια την ανάπτυξη των φυτών, ενώ αυτό δεν συνέβη σε άλλες δοκιμές. Επίσης σε συστήματα όπου η συμβολή είναι μικρή, συσσωρεύονται μεγάλες ποσότητες αζώτου μέσω της αζωτοδέσμευσης και άλλοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την αύξηση των φυτών (Bashan και de Bashan, 2010)

## 1.4. *Azospirillum* spp.

### 1.4.1. Ταξινόμηση του γένους *Azospirillum*

Το πρώτο είδος *Azospirillum* απομονώθηκε από τον Beijerinck (Beijerinck, 1925) από φτωχό σε άζωτο αμμώδες έδαφος στην Ολλανδία και αρχικά ονομάστηκε *Spirillum lipoferum*. Αυτό το βακτήριο στη συνέχεια απομονώθηκε από έδαφος και αποξηραμένα φύκη στην Ινδονησία, αλλά και από τροπικά φυτά ως βακτήριο φυλλόσφαιρας. Αργότερα, οι Dobereiner και Day (Dobereiner και Day, 1976), απομόνωσαν το βακτήριο και ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν ότι ήταν ευρέως διαδεδομένο στη ριζόσφαιρα πολλών τροπικών φυτών. Από τότε το *Azospirillum* έχει απομονωθεί από τις ρίζες πολλών άγριων αλλά και καλλιεργήσιμων φυτών παγκοσμίως. Οι Tarrand *et al.* (Tarrand *et al.*, 1978), πρότειναν το *Azospirillum* ως γένος και διέκριναν δύο είδη το *Azospirillum brasilense* και το *Azospirillum lipoferum*, βασιζόμενοι σε φυσιολογικές και μορφολογικές διαφορές ανάμεσα στα διάφορα στελέχη, καθώς και σε πειράματα ομολογίας του DNA (Bashan και Levanony, 1990).

Τα είδη του γένους *Azospirillum* είναι Gram-αρνητικά βακτήρια τα οποία ανήκουν στην συνομοταξία των α-πρωτεοβακτηρίων. Ανήκουν στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων (Proteobacteria), τάξη Rhodospirillales, οικογένεια Rhodospirillaceae (Tarrand *et al.*, 1978). Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί 18 είδη του γένους αυτού, τα οποία αναφέρονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Είδη του γένους *Azospirillum*

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

	<i>A. picis</i>	(Lin <i>et al.</i> , 2009)
	<i>A. thiophilum sp. nov.</i>	(Lavrinenko <i>et al.</i> , 2010)
	<i>A. formosense</i>	(Lin <i>et al.</i> , 2012)
	<i>A. humicireducens sp. nov.</i>	(Zhou <i>et al.</i> , 2013)
	<i>A. fermentarium sp. nov.</i>	(Lin <i>et al.</i> , 2013)
	<i>A. himalayense</i>	(Shivani & Dileep Kumar, 2014)

Από τα παραπάνω είδη που αναφέρονται στον Πίνακα 3, περισσότερες μελέτες για τη φυσιολογία και τη γενετική τους, έχουν γίνει στο *A. lipoferum* και στο *A. brasilense*. Και τα δύο είναι άφθονα, κυρίως σε τροπικές περιοχές, που σχετίζονται με κτηνοτροφικά αγρωστώδη, καλαμπόκι, σιτάρι, ρύζι, σόργο, ζαχαροκάλαμο και διάφορα άλλα φυτά τα οποία επίσης φιλοξενούν αυτό το βακτηριακό είδος (Hartman και Baldani, 2006; Zambrano *et al.*, 2007). Παρ' όλα αυτά, εκτός από τη σύνδεση τους με φυτά, τα *Azospirillum* έχουν επίσης συσχετιστεί με περιβάλλοντα στα οποία επικρατούν ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και μόλυνσης (Nosko *et al.*, 1994; Eckford *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2008). Το είδος *A. amazonense* απομονώθηκε και περιγράφηκε το 1983 από κτηνοτροφικά αγρωστώδη που είχαν φυτευτεί στην περιοχή του Αμαζονίου, αλλά επίσης έχει συσχετιστεί και με τη ριζόσφαιρα ρυζιού, καλαμποκιού, σόργου και άλλων φυτών στη βορειοκεντρική Βραζιλία (Magalhaes *et al.*, 1983; Reis *et al.*, 2006). Μία ομάδα στη Γερμανία κατέταξε στην οικογένεια αυτή και το είδος *A. halopraeferans*. Απομονώθηκε από το φυτό *Leptochloa fusca* το οποίο αναπτύσσεται σε αλατώδεις συνθήκες στο Πακιστάν και φαίνεται να αναπτύσσεται αποκλειστικά σε αυτό το φυτό καθώς άλλες προσπάθειες απομόνωσης αυτού του είδους από άλλα φυτά που μεγαλώνουν σε παρόμοιες συνθήκες στη Βραζιλία απέτυχε (Reinhold *et al.*, 1987; 1988). Επιπλέον ένα άλλο είδος απομονώθηκε από φυτά ρυζιού στο Ιράκ περιγράφηκε και ονομάστηκε *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989), παρ' όλο που αυτό το είδος δεν έχει αναφερθεί να έχει απομονωθεί από άλλα φυτά ή σε κάποια άλλη χώρα έχει καθιερωθεί ως νέο είδος (List No. 39, 1991). Το 1977, από μελέτες που έγιναν στην Αυστραλία χρησιμοποιώντας αναλύσεις της 16S rDNA αλληλουχίας του *Conglomeromonas largomobilis subsp. largomobilis*, έδειξαν ότι αυτό το βακτήριο είχε στενή σχέση με τα είδη *A. lipoferum* και *A. brasilense*, αλλά επαρκή απόσταση για να θεωρηθεί ως ξεχωριστό είδος. Βασιζόμενος στη φυλογενετική, οι Ben Dekhil *et al.* (1997) πρότειναν τη μεταφορά του υποείδους *C. largomobilis spp. largomobilis* στο γένος *Azospirillum*, ως *Azospirillum largomobile*, το οποίο έπειτα διορθώθηκε σε *A. largimobile* (Sly και

Stackebrandt, 1999). Το 2001 περιγράφηκε και ονομάστηκε *A. dobereineriae* προς τιμήν της Βραζιλιάνας επιστήμων Johanna Deobereiner, η οποία ξεκίνησε τις μελέτες του είδους στη Βραζιλία (Eckert *et al.* 2001). Ένα άλλο είδος απομονώθηκε από το αμμώδες έδαφος ενός φυτού ρυζιού το 1982 και ονομάστηκε *A. oryzae* στην Κίνα (Xie και Yokota, 2005). Τότε χρησιμοποιώντας κτηνοτροφικά αγρωστώδη από τη Κίνα, ένα άλλο είδος ανακαλύφθηκε από επιφανειακές αποστειρωμένες ρίζες και βλαστούς από το φυτό *Melinis minutiflora Beauv* και σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα ημιστερεά υποστρώματα για να χαρακτηριστούν 15 διαφορετικά στελέχη του είδους *A. melinis* (Peng *et al.* 2006). Το 2007, χρησιμοποιώντας το ίδιο μέσο σε pH 7.2–7.4 περιγράφηκαν δύο νέα είδη από μία επιστημονική ομάδα στον Καναδά. Αυτά τα είδη απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα φυτείας καλαμποκιού στο Οντάριο και ονομάστηκαν *A. canadense* (Mehnaz *et al.*, 2007a) και *A. zeae* (Mehnaz *et al.*, 2007b). Το *A. canadense* χρησιμοποιεί πολλά οργανικά οξέα όπως μηλικό, πυροσταφυλικό, οξικό, ηλεκτρικό, κιτρικό, μυρμηκικό και άλλα, τα οποία μπορεί να μη χρησιμοποιούνται από τα άλλα είδη. Μια ομάδα στην Ταϊβάν χρησιμοποιώντας στερεό θρεπτικό υλικό απομόνωσε από μολυσμένο με πετρέλαιο έδαφος, το είδος *A. rugosum*, το οποίο ονομάστηκε έτσι επειδή καθώς το βακτήριο αναπτυσσόταν, η μορφή της αποικίας άλλαζε σε ζαρωμένη-ρυτιδιασμένη όψη το οποίο δεν είχε παρουσιαστεί στα υπόλοιπα είδη του γένους αυτού. Το είδος αυτό έχει στενή φυλογενετική σχέση με τα *A. canadense*, *A. brasilense* και *A. dobereineriae* βάσει χρησιμοποίησης της πηγής άνθρακα, υδρόλυσης της ζελατίνης, αναγωγής των νιτρικών και δραστηριότητας της διυδρολάσης της αργινίνης (Young *et al.* 2008). Το 2009, περιγράφηκαν δύο νέα βακτήρια του γένους *Azospirillum*, το *A. palatum* (Zhou *et al.* 2009) και το *A. picis* (Lin *et al.* 2009). Το πρώτο απομονώθηκε από έδαφος στην Κίνα και είναι αρνητικό στη μείωση του ακετυλενίου, δεν παράγει ινδόλες και δεν μειώνει τα νιτρικά ή νιτρώδη. Το δεύτερο απομονώθηκε στην Ταϊβάν από πίσσα που είχε χρησιμοποιηθεί για την επίστρωση δρόμου, η οποία γενικά περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ) και άλλες δηλητηριώδης ή καρκινογόνες ενώσεις. Πιο πρόσφατα έχουν προταθεί νέα είδη όπως το *Azospirillum thiophilum*, το οποίο απομονώθηκε από μία επιφάνεια που περιείχε θείο και βακτήρια σε μία θειούχα πηγή στη Ρωσία (Lavrinenko *et al.* 2010). Αν και έχει στενή σχέση με διάφορα είδη *Azospirillum*, αυτό το στέλεχος BV-ST είναι ικανό για μιξοτροφική ανάπτυξη υπό μικροαερόβιες συνθήκες με την ταυτόχρονη αξιοποίηση των οργανικών υποστρωμάτων και το θειοθειικό ως δότη ηλεκτρονίων για την εξοικονόμηση ενέργειας. Αργότερα στην επαρχία Yunlin της Ταϊβάν, από αγροτικό έδαφος απομονώθηκε το είδος *A. formosense* (Lin *et al.*,

2012), για το οποίο η ανάλυση της 16S RNA αλληλουχίας έδειξε μεγαλύτερη ομοιότητα με τα είδη *A. brasilense*, *A. rygosum* και *A. oryzae*. Αργότερα απομονώθηκε από μικροβιακές κυψέλες καυσίμων ένα νέο είδος του οποίου τα χημοταξονομικά χαρακτηριστικά ήταν παρόμοια με αυτά του γένους *Azospirillum*. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε αρκετές ομοιότητες με τα είδη *A. lipoferum*, *A. thiophilum* και *A. oryzae*. Οι ομοιότητες που εμφάνισαν στην αλληλουχία του γονιδίου *nifH* ήταν από 94% έως 97%. Το είδος αυτό ονομάστηκε *A. humicireducens* (Zhou *et al.*, 2013). Ένα ακόμα είδος που τοποθετήθηκε στο γένος αυτό είναι το *A. fermentarium* το οποίο απομονώθηκε από μία δεξαμενή ζύμωσης στην Ταϊβάν (Zhou *et al.*, 2013). Οι ομοιότητες με τα είδη *A. picis*, *A. oryzae* και *A. rugosum* ήταν μεγαλύτερες (>96%) από τα υπόλοιπα του γένους αυτού. Το τελευταίο είδος που εντοπίστηκε να ανήκει στο γένος *Azospirillum* είναι το *Azospirillum himalayense* το οποίο απομονώθηκε από έδαφος σε μία κοιλάδα στα Ιμαλάια (Shivani και Dileep Kumar, 2014). Το είδος αυτό παρουσίασε μεγαλύτερη ομοιότητα με τα είδη *A. brasilense* και *A. rugosum*.

Με βάση τα είδη που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα, βρίσκονται σε ποικίλα περιβάλλοντα και σε διάφορα είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων όχι μόνο όσων είναι αγροτικής σημασίας, όπως δημητριακά, ζαχαροκάλαμο και κτηνοτροφικά αγρωστώδη, αλλά και άλλα είδη φυτών, όπως τα φυτά του καφέ, φρούτα και ορχιδέες.

#### **1.4.2. Μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του γένους *Azospirillum***

Το γένος *Azospirillum* είναι αερόβια μη ζυμωτικά, χημειοοργανότροφα βακτήρια και παράγουν αρκετές φυτοορμόνες, κυρίως αυξίνες (δεν έχει διαπιστωθεί για όλα τα είδη ακόμα) και χρησιμοποιούν διάφορες πηγές άνθρακα, κυρίως σάκχαρα και αλκοόλες σακχάρων (Massena Reis *et al.*, 2011). Τα κύτταρα τους είναι μικρών διαστάσεων (1μm x 2,1-3,8μm) και φέρουν πολικά μαστίγια. Αρκετά στελέχη είναι ικανά να μεταπίπτουν σε ανθεκτικές μορφές (κύστεις), όταν καλλιεργούνται σε αντίξοες συνθήκες. Τα *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum* κ.α.) ανήκουν στην ομάδα των σπειραμάτων, είναι αρνητικά κατά Gram (Gram<sup>-</sup>), αυτοκινούμενα (κίνηση μέσω πολικών μαστιγίων), ελικοειδώς συνεστραμμένα ραβδόμορφα, ελεύθερης διαβίωσης, αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα οποία απομονώνονται από το έδαφος και τη ριζόσφαιρα πολλών φυτών. Σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα κινούνται με ένα πολικό μαστίγιο, ενώ σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα αναπτύσσονται και πλευρικά μαστίγια (Krieg *et al.*, 1984).

Στο περιβάλλον της ρίζας, τα *Azospirillum*, επωφελούνται από την παρουσία

διαφόρων πηγών άνθρακα (οργανικών οξέων, αμινοξέων) που περιέχονται στις εκκρίσεις των ριζών και αυξάνονται ικανοποιητικά. Κάτω από μικροαερόβιες συνθήκες δεσμεύουν το μοριακό άζωτο, το οποίο αποδίδουν, αφού υποστούν λύση, ως πρωτεϊνικό άζωτο στη ριζόσφαιρα. Μετά από τη μετατροπή του σε αφομοιώσιμες μορφές, παραλαμβάνεται από τα φυτά.

Το *Azospirillum* ανήκει στα βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης, που προάγει και επηρεάζει την ανάπτυξη και απόδοση πολλών φυτικών ειδών [plant-growth-promoting-rhizobacteria (PGPR)], πολλά από τα οποία είναι γεωργικής και οικολογικής σπουδαιότητας (Bashan *et al.*, 2004). Μελέτες των Bashan και Levanony (1990), που αφορούν τον εμβολιασμό των φυτών με *Azospirillum*, έδειξαν ότι περισσότερα από 100 φυτικά είδη (C3 και C4 φυτά) επηρεάστηκαν θετικά από τον εμβολιασμό. Μετά από τον εμβολιασμό, τα βακτήρια αποικίζουν επιτυχώς τη ρίζα και κυρίως την επιφάνεια των ριζικών τριχιδίων.

Η σύνδεση του *Azospirillum* στις ρίζες γίνεται σε δύο φάσεις, την προσρόφηση και την αγκύρωση. Η σύνδεση και τελικά η αποίκιση του *Azospirillum*, εξαρτάται από την κινητικότητα του βακτηρίου και τη χημειοταξία προς τα εκκρίματα της ρίζας. Μερικά είδη του γένους αυτού είναι ικανά να αποικίσουν και στο εσωτερικό τμήμα της ρίζας σιταριού (Bashan *et al.*, 2004).

Τα βακτήρια αυτά είναι εξαιρετικά χρήσιμα για τη γεωργία, γιατί πέρα από τον εμπλουτισμό του εδάφους με άζωτο, εφοδιάζουν τα φυτά και με ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες. Επίσης, προστατεύουν τις καλλιέργειες από προσβολές, αφού ανταγωνίζονται τους φυτοπαθολόγους μικροοργανισμούς εδάφους.

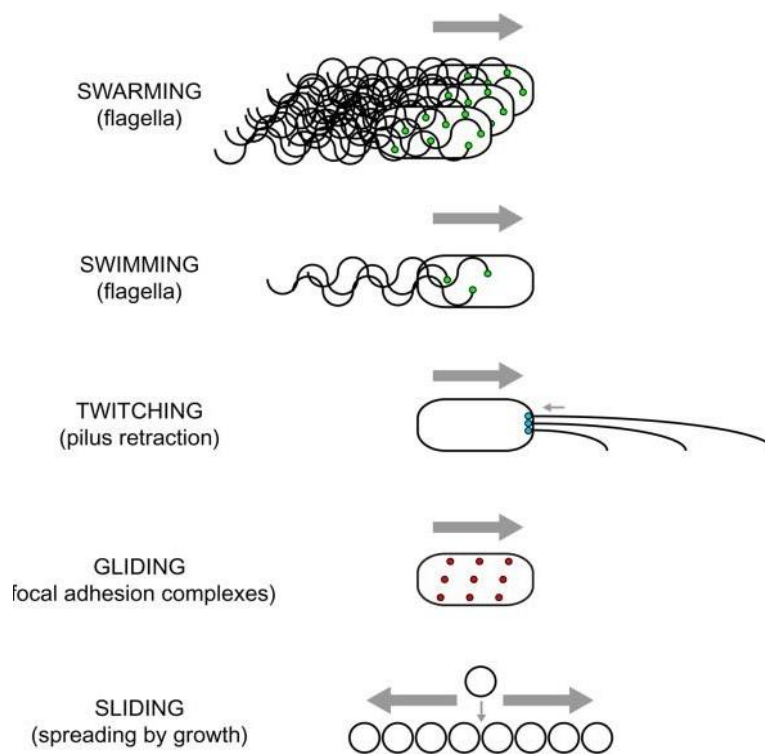
Η δέσμευση του αζώτου και η παραγωγή φυτοορμονών γίνεται σε συνδυασμό με το φυτό, αλλά η μεταφορά του είναι περιορισμένη και όχι πάντα ανιχνεύσιμη. Τα *Azospirillum* επηρεάζουν διάφορα μεταβολικά μονοπάτια των φυτών, συμπεριλαμβανομένης και της δραστηριότητας της μεμβράνης των κυττάρων. Το πιο εμφανές αποτέλεσμα στην παρουσία αυτών των βακτηρίων στη ριζόσφαιρα των φυτών είναι αλλαγές στη μορφολογία του ριζικού συστήματος, με αποτέλεσμα τα φυτά να απορροφούν στοιχεία και νερό καλύτερα (Bashan *et al.*, 2004).

Σήμερα η πιο κοινή εξήγηση για την επίδραση των βακτηρίων *Azospirillum* σε φυτά είναι η παραγωγή φυτοορμονών που μεταβάλλουν το μεταβολισμό και τη μορφολογία του φυτού με αποτέλεσμα καλύτερη απορρόφηση στοιχείων και νερού (Bashan *et al.*, 2004).



## 1.5. Κινήσεις βακτηρίων

Σύμφωνα με τον Henrichsen (1972), έχουν αναγνωρισθεί έξι διαφορετικοί τύποι επιφανειακής μετατόπισης των βακτηρίων: α) Ομαδική κίνηση (swarming): εξαρτάται από την υπερβολική ανάπτυξη των μαστιγίων και εν μέρει από την αλληλεπίδραση κυττάρου προς κύτταρο, β) Κολυμβητική κίνηση (swimming): εξαρτάται από τα μαστίγια και το ρευστό μέσο, γ) Gliding: εξαρτάται από ενδογενείς κινητήριες δυνάμεις και εν μέρει από την αλληλεπίδραση κυττάρου με κύτταρο, δ) Σύσπαση (twitching): εξαρτάται από ενδογενείς κινητήριες δυνάμεις, ε) Ολίσθηση (sliding): εξαρτάται από την ανάπτυξη και τη μειωμένη τριβή, στ) Darting: εξαρτάται από την ανάπτυξη των εγκλείστων.



Εικόνα 2. Κατηγορίες βακτηριακής κινητικότητας (Kearns, 2010)

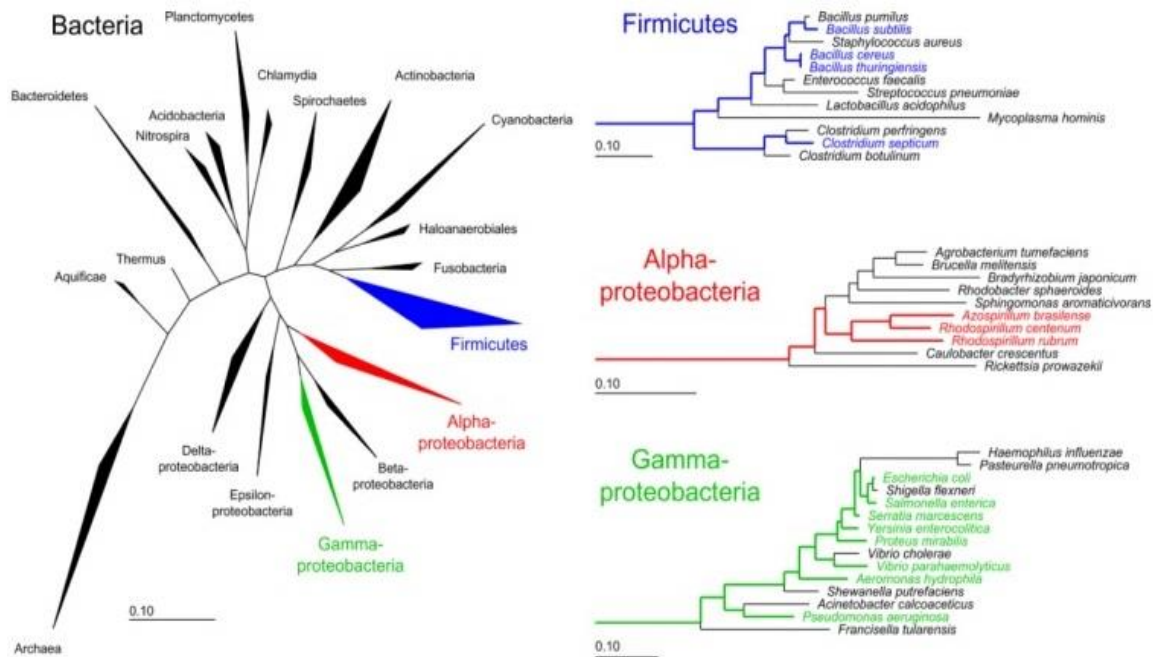
Από τους παραπάνω τύπους κίνησης των βακτηρίων η ομαδική και η κολυμβητική κίνηση εξαρτώνται από την ύπαρξη μαστιγίων (Harsey, 1994). Η κολύμβηση είναι αποτέλεσμα της περιστροφικής κίνησης των μαστιγίων και σε αντίθεση με την ομαδική κίνηση, τα κύτταρα κινούνται αυτόνομα σε υγρό περιβάλλον. Κατά τη διάρκεια της κολυμβητικής κίνησης, περίτριχα μαστίγια σε ένα κύτταρο, συγχωνεύονται σε μια δέσμη και περιστρέφονται για να ωθήσουν το βακτήριο σε κίνηση. Ένα κύτταρο ανατρέπεται, όταν έστω και ένα μαστίγιο αλλάζει κατεύθυνση περιστροφής (Kearns, 2010). Twitching είναι μία μορφή βακτηριακής μετατόπισης σε υγρές επιφάνειες, ανεξάρτητη από την ύπαρξη

μαστιγίων. Η κίνηση αυτή συμβαίνει με την επέκταση, πρόσδεση και στη συνέχεια απόσυρση των πολικών τριχιδίων τύπου IV, των οποίων η λειτουργία θα μπορούσε να παρομοιαστεί με ένα γάντζο. Κάποιες μορφές της κίνησης gliding είναι παρόμοιες με την twitching αφού βασίζονται στην επέκταση τριχιδίων τύπου IV και την οπισθοχώρηση για την κίνηση των κυττάρων. Άλλες μορφές gliding δεν εξαρτώνται από τα τριχίδια και οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για αυτό είναι ακόμα υπό μελέτη (McBride, 2001). Η μετατόπιση sliding είναι ένα είδος επιφανειακής μετατόπισης που παράγεται από επεκτατικές δυνάμεις σε μια αυξανόμενη αποικία, σε συνδυασμό με ειδικές ιδιότητες της επιφάνειας των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη τριβή μεταξύ κυττάρων και υποστρώματος. Τα κύτταρα κινούνται αργά, στενά συνδεδεμένα, σε ένα ενιαίο στρώμα (Henrichsen, 1972). Η κίνηση dartring παράγεται από επεκτατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται σε ένα συσσωμάτωμα κυττάρων μέσα σε μια κοινή κάψουλα και καταλήγει στην εκτίναξη των κυττάρων από το συσσωμάτωμα. Κανένα από τα ζεύγη κυττάρων ή τα συσσωματώματα δε μετακινούνται, παρά μόνο κατά τη διάρκεια της εκτίναξης και το γεγονός αυτό δείχνει στο μικροσκόπιο την εικόνα ότι η αποικία τρέμει (Henrichsen, 1972).

Η κινητικότητα διαδραματίζει καίριο ρόλο στη βακτηριακή φυσιολογία και βακτήρια που ζουν σε διαφορετικά ενδιαιτήματα πρέπει να διαθέτουν συστήματα μετακίνησης προσαρμοσμένα στο συγκεκριμένο τους περιβάλλον (Merino *et al.*, 2006).

### **1.5.1. Ομαδική κίνηση βακτηρίων (swarming)**

Η ομαδική κίνηση (swarming) είναι ένα είδος βακτηριακής μετανάστευσης που εξαρτάται γενικά από το μαστίγιο και χαρακτηρίζεται από γρήγορη και συντονισμένη πληθυσμιακή μετακίνηση κατά μήκος στερεών επιφανειών (Kearns, 2010). Σύμφωνα με τον Henrichsen (1972) η ομαδική κίνηση (swarming) των βακτηρίων, είναι ένα είδος μετατόπισης πάνω σε επιφάνειες η οποία τροφοδοτείται από την περιστροφική κίνηση των μαστιγίων. Ο όρος αυτός αν και είναι απλός ακριβής και μηχανιστικά ορθός, δε δικαιολογεί τη μεγάλη ποικιλία των φαινοτύπων που σχετίζονται με την ομαδική κίνηση, ούτε δίνει έμφαση σε όλα εκείνα τα στοιχεία που παραμένουν άγνωστα μέχρι σήμερα και σχετίζονται με αυτή τη συμπεριφορά. (Kearns, 2010).



Εικόνα 3. Φυλογενετικό δέντρο, βασισμένο στο γονίδιο 16S rRNA, τα βακτηριακά είδη των οποίων το όνομα είναι χρωματισμένο, έχουν την ικανότητα ομαδικής κινητικότητας, ενώ στα υπόλοιπα, με μαύρο χρώμα, δεν έχει παρατηρηθεί προς το παρόν ικανότητα ομαδικής κινητικότητας (Kearns, 2010)

Η ομαδική κίνηση αρχικά παρατηρήθηκε στην επιφάνεια μέσου που είχε στερεοποιηθεί με άγαρ σε τρυβλία petri. Το άγαρ επιλέγεται μέχρι και σήμερα ως η επιφάνεια για τη μελέτη αυτής της μορφής κίνησης. Στο εργαστήριο οι απαιτήσεις για την έναρξη της κίνησης στα διαφορετικά βακτήρια ποικίλει και το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα βακτήρια διαθέτουν ειδικές προσαρμογές για την επιφάνεια στην οποία κατοικούν.

Η κίνηση αυτή καθοδηγείται από το μαστίγιο το οποίο πρέπει να δημιουργήσει κίνηση προς τα εμπρός με τα ελικοειδή νημάτια να σπρώχνουν ενάντια στο νερό που βρίσκεται γύρω (Copeland *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2010). Τα βακτήρια θα πρέπει να προσελκύσουν αρκετό νερό γύρω τους ώστε να μπορέσουν να βυθιστούν μέσα σε αυτό. Ένα ακόμα εμπόδιο που συναντάνε πέρα από το νερό είναι η τριβή της επιφάνειας στην οποία κινούνται, η οποία ορίζεται ως ηλεκτροστατική δύναμη ανάμεσα στα βακτήρια και την επιφάνεια. Η ένταση αυτής της δύναμης εξαρτάται από τις ιδιότητες του υλικού της επιφάνειας, την περιεκτικότητα σε νερό ή αν είναι επικαλυμμένη με κάποιο παχύρευστο ή λιπαντικό υγρό (Akbulut *et al.*, 2006). Μόλις τα βακτήρια ξεπεράσουν τα δύο πρώτα εμπόδια και ξεκινούν την κίνηση, το κινούμενο υγρό θα συναντήσει την επιφανειακή τάση. Λόγω της τάσης του νερού να κολλά στον εαυτό του παρεμποδίζεται η διαβροχή της επιφάνειας πριν να φτάσουν τα βακτήρια (de Gennes, 1985). Αυτό το εμπόδιο αντιμετωπίζεται από τα βακτήρια είτε παράγοντας επιφανειοδραστικές ουσίες είτε με τη χρήση κάποιου υποστρώματος με χαμηλή επιφανειακή τάση.

Σε αντίθεση με άλλα είδη βακτηριακής μετατόπισης σε επιφάνειες, η ομαδική κίνηση περιλαμβάνει μία σύνθετη διαδικασία διαφοροποίησης στην οποία τα κύτταρα αποκτούν πολλά μαστίγια και επιμηκύνονται (Fraser και Hughe, 1999). Όταν τα κύτταρα μετατρέπουν την κίνηση από κολυμβητική σε ομαδική κίνηση, ο αριθμός των μαστιγίων αυξάνεται στην κυτταρική επιφάνεια (Kearns, 2010). Οργανισμοί με εναλλακτικά συστήματα μαστιγίων γίνονται υπερμαστιγοφόροι κατά την μετάβαση από το μοναδικό πολικό μαστίγιο σε πολλαπλά περιφερειακά μαστίγια (Alberti και Harshey, 1990).

Εξωκυτταρικά χημικά σιανάλα, όπως λακτόνες ομοσερίνης (AHL), πεπτίδια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, πολυαμίνες κ.λ.π, καθώς και φυσιολογικοί παράγοντες, η επαφή με την επιφάνεια και η υγρασία, παρέχουν ερεθίσματα που ενεργοποιούν την κυτταρική διαφοροποίηση ως προς αυτό τον τύπο κίνησης (Harshey, 2003). In vitro, η ομαδική κίνηση πραγματοποιείται σε ημιστερεές επιφάνειες (0,5 – 0,7% άγαρ), όταν παρέχονται συγκεκριμένες πηγές άνθρακα και αζώτου (Kohler *et al.*, 2000).

Η περιεκτικότητα των μέσων ανάπτυξης του βακτηρίου σε νερό είναι ένας κρίσιμος παράγοντας. Πολύ λίγο νερό οδηγεί σε περιορισμένη κίνηση, ενώ πάρα πολύ νερό μπορεί να επιτρέψει την κολύμβηση (swimming). Η ομαδική κίνηση, απαιτεί ένα ενεργειακά πλούσιο στέρεο θρεπτικό μέσο, αλλά και συνθήκες που υποστηρίζουν αυτή την κίνηση και εξαρτώνται από τον υπό μελέτη οργανισμό. Η περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου σε άγαρ παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην κίνηση των βακτηρίων (Kearns, 2010).

Τα βακτήρια κινούνται σε κυτταρικές ομάδες, δίπλα-δίπλα, που καλούνται 'σχεδίες' (rafts). Αυτός ο σχηματισμός 'σχεδιάς' είναι δυναμικός: κύτταρα, τα οποία εμπεριέχονται στη 'σχεδία' κινούνται με όλη την ομάδα των βακτηρίων, ενώ όσα χάνονται από αυτή γρήγορα καθίστανται ακίνητα (Kearns και Losick, 2005). Η συνύπαρξη των βακτηρίων σε μία ομάδα διευκολύνει την κίνηση, αυξάνοντας τη συγκράτηση της υγρασίας (Matsuyama *et al.*, 2001).

Πολλά βακτήρια που εκτελούν ομαδική κίνηση συνθέτουν και εκκρίνουν επιφανειοδραστικές ουσίες. Οι βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφιπαθητικά μόρια τα οποία λειτουργούν ως ενυδατικοί παράγοντες, μειώνοντας έτσι την επιφανειακή τάση μεταξύ των κινούμενων κυττάρων και της επιφάνειας κάτω από αυτά (Matsuyama *et al.*, 1992). Οι ενώσεις αυτές εκτός από την κινητικότητα συνεισφέρουν στη διαλυτοποίηση και τη διάχυση υποστρωμάτων κατάλληλων για την ανάπτυξη (Lindow *et al.*, 2003).

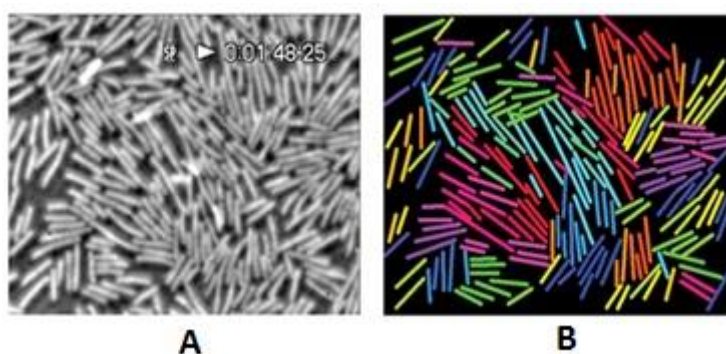
Οι μικροοργανισμοί επηρεάζονται έντονα από την επιφανειακή τάση του νερού. Το νερό είναι απαραίτητο για τα βακτηριακά κύτταρα. Ακόμα και αυτά που πολλαπλασιάζονται

σε συμπαγές υπόστρωμα είναι βρεγμένα, με την έννοια ότι καλύπτονται από μία λεπτή στρώση νερού. Το νερό εμποδίζει τα κύτταρα να επεκταθούν σε περαιτέρω επιφάνειες και για το λόγο αυτό παράγουν επιφανειοδραστικούς παράγοντες που καθιστούν ικανή την εξάπλωση των βακτηρίων (Soberón-Chávez, 2011).

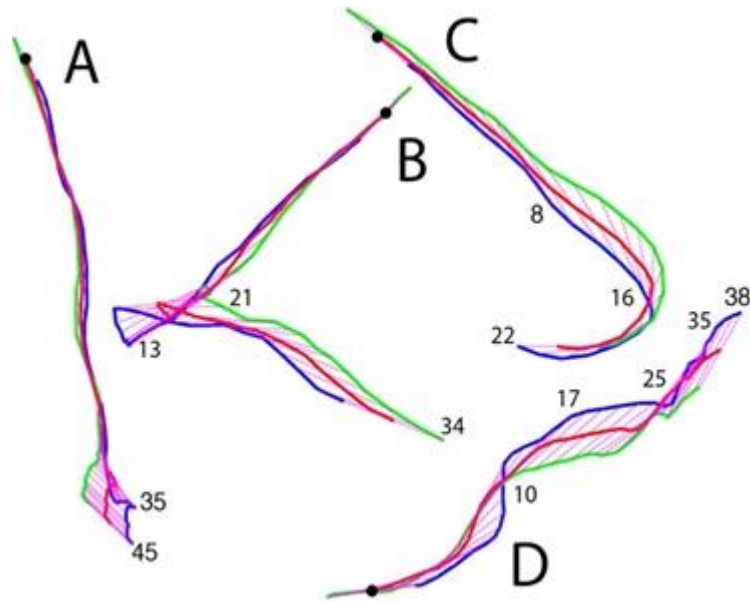
Η ομαδική κίνηση αφορά μία συντονισμένη πολυκύτταρη διαδικασία, κατά τη διάρκεια της οποίας τα κύτταρα επικοινωνούν το ένα με το άλλο (Harshey και Matsuyama, 1994). Αυτό γίνεται χωρίς να αλλάζουν τον προσανατολισμό του σώματός τους, προχωρώντας προς τα πίσω στο μέσο της δέσμης του μαστιγίου. Αυτό περιλαμβάνει αλλαγές στο σχήμα του μαστιγίου, από κανονικό σε πτυχωτό (curly) και πάλι κανονικό (Turner *et al.*, 2010).

Παρόλο που ανεξάρτητα κύτταρα κινούνται γρήγορα μπροστά και πίσω μέσα στην βακτηριακή μάζα, η αποικία σαν σύνολο μετακινείται προς τα έξω. Αυτή η επιφανειακή μετατόπιση δεν παρατηρείται σε απομονωμένα κύτταρα. Διαφορετικά είδη έχουν ποικίλους τρόπους μακροσκοπικής εμφάνισης της αποικίας τους κατά την ομαδική κίνηση (Harshey και Matsuyama, 1994).

Η μέτρηση της κίνησης αυτής συνήθως γίνεται με τη δοκιμή σε τρυβλία, όπου τα βακτηριακά κύτταρα τοποθετούνται πάνω στην επιφάνεια άγαρ και μετά από καθορισμένο χρονικό διάστημα μετριέται η διάμετρος της στεφάνης που έχει δημιουργηθεί. Ο παράγοντας που επηρεάζει το μέγεθος της στεφάνης είναι η συγκέντρωση του άγαρ (Niu *et al.*, 2005).



Εικόνα 4. Στιγμιότυπο από βίντεο που δείχνει βακτηριακά κύτταρα *E.coli* να κινούνται με ομαδική κίνηση. Β. Το ίδιο στιγμιότυπο μετά από επεξεργασία στον υπολογιστή. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα κύτταρο, και κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε μια κατεύθυνση. (Mc Carter, 2010)



Εικόνα 5. Είδη ελιγμών στην ομαδική κίνηση. Κάθε κίνηση παρουσιάζεται σε διάστημα 42-μm με 57-μm frame (στιγμιότυπο). Η αρχή κάθε κίνησης υποδεικνύεται με μαύρη κουκκίδα. Η κεφαλή, το κέντρο και η ουρά του απεικονίζονται με μπλε, κόκκινο και πράσινο αντίστοιχα. (A) κίνηση προς τα εμπρός, (B) κίνηση προς τα εμπρός τα πρώτα 13 frame, μετά αναστροφή μέχρι τα 21 frame και τέλος πλευρική κίνηση, (C) αρχικά ευθεία κίνηση και μετά τα 8 frame ακολούθησε πλευρική κίνηση, (D) δυο αναστροφές στα 10 και 25 frame (Turner *et al.*, 2010).

Η ομαδική κίνηση εμφανίζει διάφορους φαινοτύπους. Τέτοιοι μπορεί να είναι η περίοδος υστέρησης, η επιμήκυνση των κυττάρων και η δημιουργία μοτίβων των αποικιών και μπορούν να παρακαμφθούν χωρίς τα βακτήρια να χάσουν τη συμπεριφορά αυτής της κίνησης (Kearns, 2010). Η περίοδος υστέρησης εμφανίζεται πριν από την έναρξη της ομαδικής κίνησης, όταν τα βακτήρια μεταφέρονται από ένα υγρό μέσο σε μία στερεή επιφάνεια (Belas *et al.*, 2005; Hoeniger *et al.*, 1964; Kearns *et al.*, 2003; Morrison *et al.*, 1966). Είναι σταθερή για ένα συγκεκριμένο σύνολο συνθηκών, αλλά μπορεί να μειωθεί με την αύξηση της πυκνότητας του εμβολίου ή να καταργηθεί με τη χρήση συγκεκριμένων μεταλλαγμάτων (Belas *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2009; Kearns *et al.*, 2003; Kearns και Losick, 2005; Rauprich *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1976). Η επιμήκυνση των κυττάρων στην ομαδική κίνηση είναι αποτέλεσμα της διακοπής της κυτταρικής διαίρεσης και δεν παρατηρείται σε όλα τα είδη βακτηρίων κατά την ομαδική κίνηση (Kearns, 2010). Τα «νηματοειδή» αυτά κύτταρα προκύπτουν από ελάττωμα στη διαδικασία των κυτταρικών διαιρέσεων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των κυττάρων χωρίς να διαχωρίζονται. Επίσης, μπορεί αφού πετύχει η κυτταρική διαίρεση να μην καταφέρουν τα κύτταρα να διαχωριστούν με αποτέλεσμα να συνδέονται και να σχηματίζουν μεγάλες αλυσίδες (Kearns, 2010).

Όλα τα βακτήρια που εκτελούν ομαδική κίνηση μπορούν να σχηματίσουν αποικίες με ένα μεγάλο εύρος μοτίβων που εξαρτώνται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Shimada *et al.*, 2004; Hiramatsu *et al.*, 2005). Σε πολλές περιπτώσεις η ομαδική κίνηση εμφανίζει ομοιόμορφη κατανομή της αποικίας ως ένα διαφανές στρώμα κυττάρων στην επιφάνεια του τρυβλίου. Το πιο διαδεδομένο μοτίβο είναι το «μάτι του ταύρου» (bull's-eye), το οποίο παρατηρείται στο είδος *P. mirabilis* και είναι αποτέλεσμα της αναστολής της συντονισμένης κίνησης των κυττάρων που οδηγεί στο σχηματισμό ομόκεντρων δακτυλίων (Hoeniger *et al.*, 1964; Rauprich *et al.*, 1996; Matsuyama *et al.*, 2000). Ένα ακόμη μοτίβο είναι αυτό των δενδριτών το οποίο οφείλεται σε επιφανιοδραστικές ουσίες (Caiazza *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2003; Tremblay *et al.*, 2007). Σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζονται σπειροειδείς στρόβιλοι οι οποίοι είναι μεγάλες εντοπισμένες ομάδες κυττάρων που ταξιδεύουν ακολουθώντας μία κοινή κυκλική διαδρομή (Henrichsen, 1972).

### **1.6. Μεταγραφή βακτηριακού DNA και αντιβιοτικά**

Η βακτηριακή RNA πολυμεράση (RNA-polymerase, RNAP) είναι ένα ουσιώδες ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή RNA από μία μήτρα DNA ή RNA μέσω της μεταγραφής και γίνεται στόχος από διάφορα αντιβιοτικά. Τα ένζυμα αυτά είναι ζωτικής σημασίας για τα βακτήρια και παρουσιάζονται και σε πολλούς άλλους οργανισμούς (ιούς, προκαρυώτες και ευκαρυώτες) (Villain-Guillot *et al.*, 2007).

Η προκαρυωτική RNAP, είναι μία μεγάλη πρωτεΐνη που αποτελείται από κύριες υπομονάδες ( $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\beta'$ ) και ένα  $\sigma$  παράγοντα που χρειάζεται για την αναγνώριση της θέσης του υποκινητή και την έναρξη της μεταγραφής. Οι μεγάλες υπομονάδες,  $\beta$  και  $\beta'$ , περιλαμβάνουν συντηρημένες περιοχές και περιοχές που δεν είναι απαραίτητες. Η αλληλεπίδραση των  $\sigma$  παραγόντων με την RNAP τελικά οδηγεί στη γονιδιακή έκφραση. Πολλά βακτήρια και ιδιαίτερα αυτά με περίπλοκο γονιδίωμα, περιέχουν πολλαπλούς  $\sigma$  παράγοντες που μοιράζονται ομόλογες ακολουθίες. Η αντικατάσταση ενός  $\sigma$  παράγοντα από έναν άλλο μπορεί να ανακατευθύνει την RNAP ώστε να ξεκινήσει τη μεταγραφή γονιδίων που διαφορετικά δε θα μπορούσαν να μεταγραφούν. Ο παράγοντας  $\sigma$  είναι στενά συνδεδεμένος με το ένζυμο και σχηματίζει μία δομή σχήματος V κοντά στο άνοιγμα της σχισμής του ενεργού κέντρου (Villain-Guillot *et al.*, 2007).

Κατά το σχηματισμό του ολοενζύμου, συμβαίνουν αλλαγές στη διαμόρφωση των

πυρηνικών υπομονάδων (core subunits) και του παράγοντα σ. Ορισμένες περιοχές κινούνται εντός των πυρηνικών υπομονάδων, ενώ άλλες που είχαν συγκεκριμένη διάταξη στη βασική δομή της RNAP διατάσσονται κανονικά, διευκολύνοντας την αναγνώριση του υποκινητή, το άνοιγμα του υποκινητή και την έναρξη της μεταγραφής. Ο σ παράγοντας απελευθερώνεται από το σύμπλοκο της μεταγραφής αμέσως μετά την έναρξη της μεταγραφής και με απουσία αυτού του παράγοντα, ακολουθεί επιμήκυνση. Όπως παρουσιάζεται από την παραπάνω περιγραφή, η βακτηριακή RNAP είναι ένα πολύπλοκο σύστημα με αλληλοεξαρτώμενα πεδία και πρωτεΐνες και απαιτεί ειδικές ρυθμίσεις σε κάθε βήμα της μεταγραφής για να λειτουργήσει.

Η παρεμπόδιση οποιασδήποτε από αυτές τις λειτουργίες θα επηρεάσει τη διαδικασία της μεταγραφής. Διάφορα αντιβιοτικά, από φυσικές ή συνθετικές πηγές, μπορούν να επηρεάσουν αυτή την αρχιτεκτονική του ενζύμου. Οι RNAP αναστολείς, ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α. μεταγραφικοί αναστολείς που προσδένονται σε χαρακτηριστικές θέσεις πρόσδεσης (ανσαμυκίνες, στρεπτολιδινίνες, σορανγκισίνες, λιπιαρμυσίνες, CBR703 series, μικροσίνη J25, ταγκετιτοξίνη) και β. μεταγραφικοί αναστολείς χωρίς ταυτοποιημένες θέσεις πρόσδεσης (ριποστατίνες, SB σειρές, GE23077, ουρεΐδοθειοφαίνιο, κοραλλοπυρορίνες) (Villain-Guillot *et al.*, 2007). Τα τελευταία, είναι μόρια που έχουν αποδειχθεί ότι έχουν ανασταλτικές επιδράσεις στην μεταγραφή *in vitro*, αλλά δεν έχουν την απόλυτη γενετική απόδειξη ότι είναι πραγματικοί αναστολείς της μεταγραφής. Με άλλα λόγια, δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις στα σχετικά RNAP γονίδια καθιστούν τα προκύπτοντα μεταλλάγματα ανθεκτικά στους αναστολείς (Villain-Guillot *et al.*, 2007).

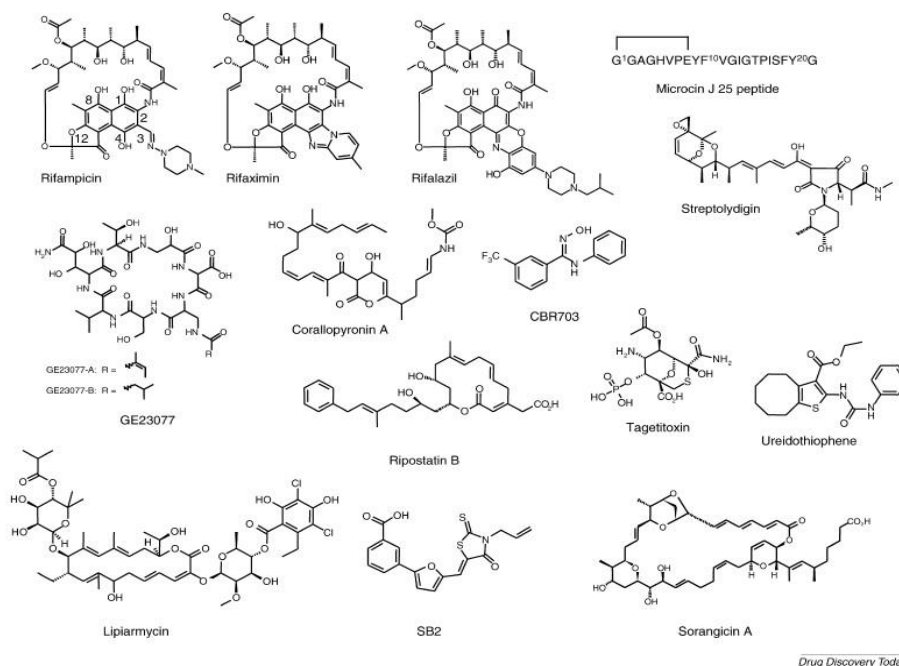
### **1.6.1. Ανσαμυκίνες - Ριφαμπικίνη**

Η ανσαμυκίνη απομονώθηκε πρώτη φορά το 1959 από τους Sensi *et al.*, από ένα στέλεχος του *Amycolatopsis mediterranei* (παλαιότερα ήταν γνωστό ως *Streptomyces mediterranei* ή *Nocardia mediterranei*) και χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για θεραπεία το 1962. Σε αυτή την οικογένεια ανήκουν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση σε μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών (βακτήρια και ευκαρυώτες). Έχουν ευρεία δράση ενάντια σε Gram<sup>+</sup> βακτήρια και σε λιγότερο βαθμό σε Gram<sup>-</sup> βακτήρια. Περιλαμβάνει πολλές ενώσεις οι οποίες επιδεικνύουν αντι-ικκή δράση έναντι βακτηριοφάγων και ιούς ευλογιάς (Turpin *et al.*, 2010). Δομικά οι ανσαμυκίνες



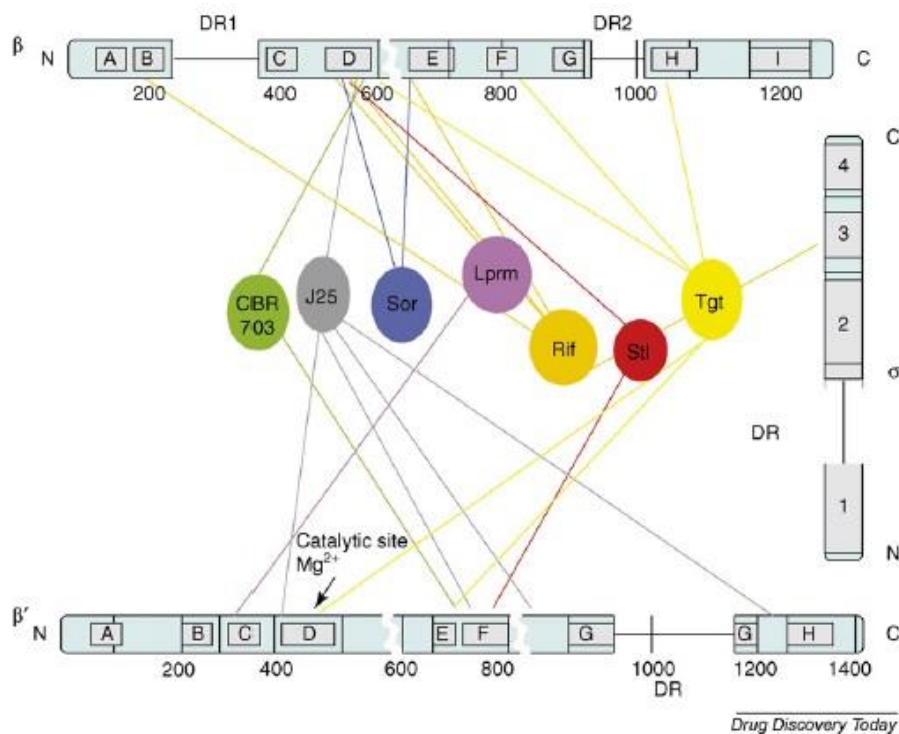
χαρακτηρίζονται από ένα επίπεδο δακτύλιο ναφθοκινόνης στον οποίο οι θέσεις 3 και 4 έχουν εκτενώς τροποποιηθεί από ημισύνθεση για τη βελτιστοποίηση φαρμακολογικών ιδιοτήτων και την παραγωγή εμπορικών αντιβιοτικών, όπως είναι η ριφαμπικίνη (RIF) η οποία είναι το πρώτο αντιβιοτικό που απομονώθηκε από την οικογένεια της ανσαμυκίνης (Turpin *et al.*, 2010). Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των ανσαμυκινών οφείλεται στην αναστολή της βακτηριακής RNA πολυμεράσης (RNAP) που έχει ως συνέπεια την παρεμπόδιση της μεταγραφής (Villain-Guillot *et al.*, 2007).

Η σύνδεση της ριφαμπικίνης (RIF) στην RNAP απαιτεί 12 αμινοξικά κατάλοιπα (Campbell *et al.* 2001). Όλες οι μεταλλάξεις ανθεκτικότητας στη ριφαμπικίνη έχουν εντοπισθεί στο γονίδιο *groB* και αυτό δείχνει ότι η ριφαμπικίνη ενεργεί μόνο στη β υπομονάδα του *groB* και οι μεταλλάξεις όλων εκτός ενός από τα 12 αμινοξέα, δημιουργεί αυθόρμητα ένα φαινότυπο ανθεκτικότητας στη ριφαμπικίνη. Αυτές οι μεταλλαγές παρουσιάζονται στο μέσο της β υπομονάδας μεταξύ των περιοχών C-D και E (Severinov *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 1988).



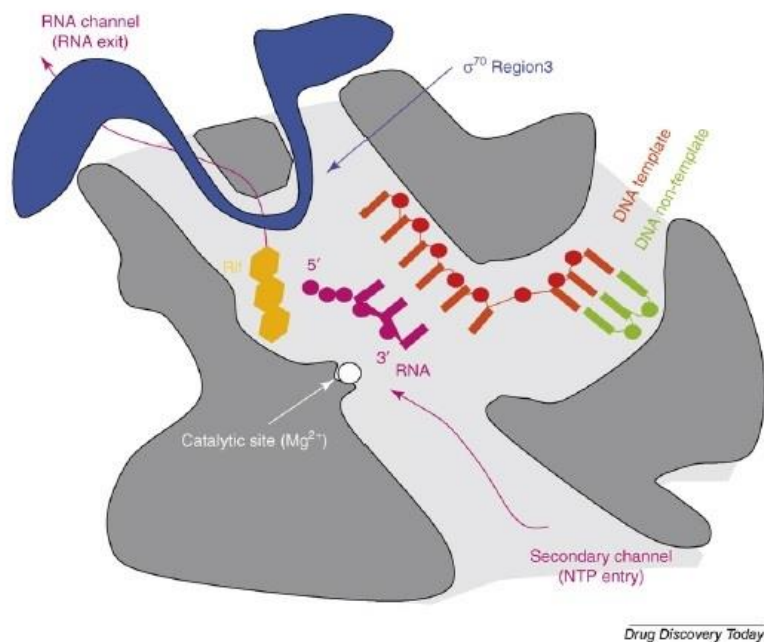
Drug Discovery Today

Εικόνα 6. Δομή μεταγραφικών αναστολέων που στοχεύουν τη βακτηριακή RNAP (Villain-Guillot *et al.*, 2007)



Εικόνα 7. Τοποθέτηση των μικρών μορίων αναστολέων μεταγραφής σχετικά με τη δομή του RNAP. Η RNAP του *E. coli* περιλαμβάνει πυρηνικές υπομονάδες ( $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\beta'$ ), και ένα  $\sigma$  παράγοντα (παρουσιάζονται μόνο οι  $\beta$  και  $\beta'$  υπομονάδες και ο  $\sigma$  παράγοντας). Οι ενώσεις που δεσμεύουν το RNAP εμφανίζονται με μπλε χρώμα (σοραγκισίνη [Sor]), ματζέντα (λιπιαρμυκίνη [Lprm]), πράσινο (CBR [CBR703]), πορτοκαλί (ριφαμπικίνη [Rif]), κίτρινο (ταγκετιτοξίνη [TGT]), γκρι (Microcin J25 [J25]) και κόκκινο (στρεπτολυδιγίνη [AK]). Οι περιοχές της πρωτεΐνης κοντά στη θέση σύνδεσης ή κοντά στα αμινοξέα που προσδίδουν ανθεκτικότητα, παρουσιάζονται σύμφωνα με τα διαθέσιμα δεδομένα. Τα κουτιά A-I των  $\beta$  και  $\beta'$  υπομονάδων και τα κουτιά 1-4 του S70 αντιπροσωπεύουν συντηρημένες περιοχές. Τα DR, DR1 και DR2 αντιπροσωπεύουν περιττές περιοχές του ενζύμου. Οι περισσότεροι από τους αναστολείς βρίσκονται σε επικαλυπτόμενες περιοχές της δομής αυτής, σε συμφωνία με βιοχημικά και διαρθρωτικά δεδομένα. (Villain-Guillot *et al.*, 2007)

Η ριφαμπικίνη βρίσκεται στο DNA 12 Å μακριά από το ενεργό κέντρο του ενζύμου και έχει προταθεί (Cambell *et al.*, 2001) ότι δρα αναστέλλοντας απευθείας το μονοπάτι του επιμηκυσμένου RNA όταν η μεταγραφή έχει μήκος 2-3 νουκλεοτίδια. Η ριφαμπικίνη φαίνεται να είναι πιο κοντά στην περιοχή 3 του  $\sigma$  παράγοντα (Artsimovitch *et al.*, 2005). Αυτή η προσέγγιση μπορεί να εξηγήσει τη  $\sigma$ -εξαρτώμενη αναστολή της μεταγραφής από τη RIF. Για παράδειγμα η αναστολή είναι ισχυρότερη όταν η πολυμεράση χρησιμοποιεί το  $\sigma^{70}$  σε σύγκριση με το  $\sigma^{32}$  (Wegrzyn *et al.*, 1998). Η ριφαμπικίνη θα μπορούσε να αλλάξει τη διαμόρφωση της περιοχής 3 του  $\sigma$  παράγοντα, επάγοντας πολλαπλασιασμό μιας αλλοστερικής επίδρασης κατά μήκος του DNA με την δραστική θέση. Όσον αφορά την αντιβακτηριακή συμπεριφορά της, η ριφαμπικίνη είναι ιδιαίτερα ενεργή σε χαμηλή συγκέντρωση (10 ng / ml) έναντι Gram-θετικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* και *Mycobacteria* (Villain-Guillot *et al.*, 2007).



Εικόνα 8. Τοπολογία της θέσης σύνδεσης της ριφαμπικίνης και η εγγύτητά της στην περιοχή 3 του  $\sigma$  παράγοντα. Το εναρκτήριο (πρότυπο κλώνο, κόκκινο, μη-πρότυπο κλώνο, πράσινο) και το δημιουργούμενο RNA (ματζέντα), το οποίο υβριδοποιείται στο πρότυπο DNA, παρουσιάζονται επίσης. Η 3'-υδροξυλική ομάδα του RNA τοποθετείται στην καταλυτική θέση του ενζύμου (λευκός κύκλος) και η 5' φωσφορική ομάδα είναι στραμμένη προς το κανάλι του RNA. Η ριφαμπικίνη εμφανίζεται με πορτοκαλί χρώμα. Η εγγύτητα μεταξύ της ριφαμπικίνης και της περιοχή 3 του  $\sigma$  θα μπορούσε να επιτρέψει στη ριφαμπικίνη να δημιουργήσει αλλοστερικές επιδράσεις στην περιοχή 3 που διαδίδεται κατά μήκος του DNA στη δραστική θέση. Ένα τέτοιο σήμα θα μπορούσε να αποτρέψει τη σύνδεση του καταλυτικού  $Mg^{2+}$  ιόντος. Επίσης φαίνεται πώς οι νουκλεοζίτες εισέρχονται στην καταλυτική θέση διαμέσου του δευτερεύοντος καναλιού και πως το επίμηκες RNA εξωθείται μέσα από το κανάλι RNA. (Artsimovitch και Vassylyev, 2006)

Όπως προαναφέρθηκε, η RIF δεσμεύεται σε συντηρημένα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και εμποδίζει την έναρξη της μεταγραφής. Ένα μεγάλο ποσοστό της υπολογίσιμης αντοχής στη RIF είναι εξαιτίας των μεταλλάξεων αυτών των αμινοξέων. Αυτές οι μεταλλάξεις συχνά συμβαίνουν με μεγάλη συχνότητα, η οποία υποχρεώνει τη χρήση της RIF σχεδόν αποκλειστικά σε συνδυασμούς φαρμάκων, συνηθέστερα με ισονιαζίδη, καθώς και τον περιορισμό της χρήσης της για τη θεραπεία της φυματίωσης και καταστάσεις έκτακτης ανάγκης (Turpin *et al.*, 2010).

Η μετάλλαξη του στόχου με σκοπό την αντοχή στη RIF δεν είναι μοναδική. Υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί αντίστασης, όπως ο διπλασιασμός (duplication) του στόχου, δράση των RNAP-δεσμευτικών πρωτεϊνών, τροποποίηση της RIF και τροποποίηση της κυτταρικής διαπερατότητας (Πίνακας 4) (Turpin *et al.*, 2010).

**Πίνακας 4. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας και οργανισμοί στους οποίους εμφανίζονται**

Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	Μικροοργανισμός	Επίπεδο ανθεκτικότητας	
Μετάλλαξη	<i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Helicobacter pylori</i>	Υψηλό έως πολύ υψηλό	Jin and Gross, 1991; Severinov <i>et al.</i> , 1993; Telenti <i>et al.</i> , 1993; Ramaswamy and Musser, 1998; Heep <i>et al.</i> , 2001; Perkins and Nicholson, 2008
Διπλασιασμός του γροβ	<i>Nocardia farcinica</i> , <i>Amycolatopsis mediterranei</i> , <i>Actinomadura sp.</i>	Υψηλό	Ishikawa <i>et al.</i> , 2006
Πρωτεΐνες δέσμευσης στην RNAP	<i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Ενδιάμεσο έως χαμηλό	Newell <i>et al.</i> , 2006; Flatten <i>et al.</i> , 2009
Τροποποίηση της ριφαμπικίνης	<i>Mycobacterium smegmatis</i> DSM 43756, <i>Bacillus sp.</i>	Ενδιάμεσο έως χαμηλό	Imai <i>et al.</i> , 1999; Dabbs <i>et al.</i> , 1995
Τροποποίηση της διαπερατότητας	<i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Χαμηλό	Tanaka <i>et al.</i> , 1996; Siddiqi <i>et al.</i> , 2004

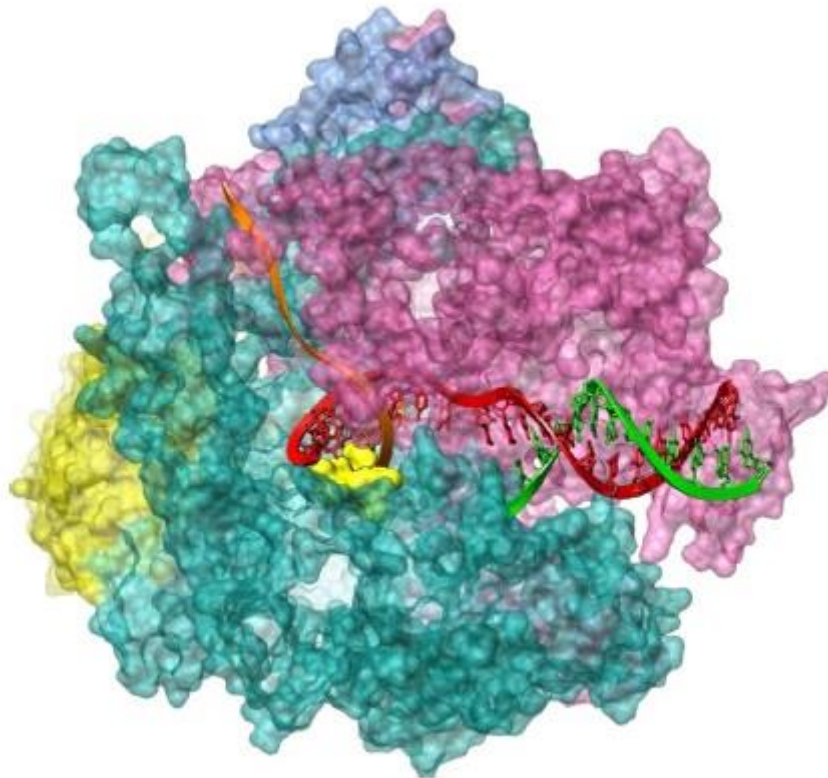
Τα βακτήρια και οι μύκητες στη φύση υπάρχουν σε κοινότητες και θα πρέπει να επικοινωνήσουν για να είναι ανταγωνιστικά. Η πλειοψηφία των ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους που συντίθενται από μικρόβια σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρουν προφανώς, ως μόρια κυτταρικής σηματοδότησης και άμεσα ή έμμεσα διαμορφώνουν τη μεταγραφή ώστε να ευνοείται η συμβίωση μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών (Yim *et al.*, 2007). Όπως ήταν αναμενόμενο η RNAP στοχεύεται από μία ποικιλία αντιβιοτικών που περιέχουν παρόμοιες θέσεις σύνδεσης με τη RIF (Villain Guillot *et al.*, 2010) και βακτήρια έχουν αναπτύξει ποικίλες στρατηγικές για να αυξηθούν παρουσία αυτών των αντιβιοτικών. Μερικοί από αυτούς τους μηχανισμούς παρέχουν αντοχή σε πολύ υψηλά επίπεδα RIF, ενώ άλλοι μόνο προστατεύουν τα βακτήρια σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Turpin *et al.*, 2010).

### 1.6.2. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στη ριφαμπικίνη

#### 1.6.2.1. Ανθεκτικότητα με μετάλλαξη του στόχου

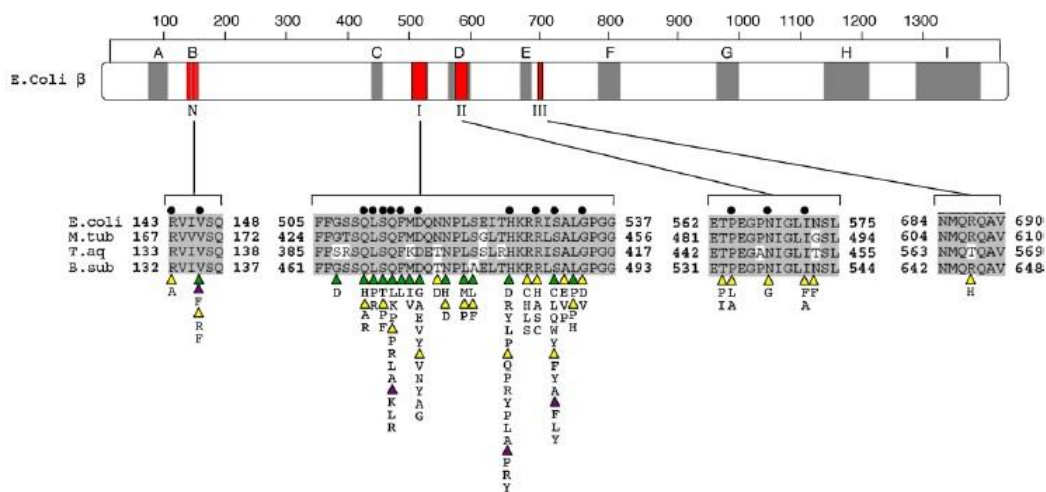
Πολλά RIF-ανθεκτικά (Rif<sup>R</sup>) στελέχη του *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae* κλπ, έχουν

χαρακτηριστεί, δείχνοντας ότι η αντίσταση πιο συχνά παρέχεται από μεταλλάξεις στο RNAP ενεργό κέντρο. Η RIF αλληλεπιδρά μόνο με την β-υπομονάδα του RNAP που κωδικοποιείται από το γονίδιο *groB* (Campbell *et al.*, 2001) και η θέση δέσμησης του είναι εξαιρετικά διατηρημένη μεταξύ των βακτηρίων. Η δέσμηση του μορίου στο RNAP περιλαμβάνει 12 αμινοξικά υπολείμματα. Η μεταλλαξιγένεση σε καθένα από αυτά τα υπολείμματα παράγει έναν ανθεκτικό φαινότυπο (Campbell *et al.*, 2001). Η αυθόρμητη αντίσταση στη RIF συνδέεται κυρίως με σημειακές μεταλλάξεις που καταλήγουν σε υποκαταστάσεις αμινοξέων και λιγότερο συχνά, συνδέεται με μερικές προσθήκες ή διαγραφές. Το 95% αυτών των μεταλλάξεων καθορίζουν τέσσερις περιοχές στο N-τελικό άκρο της β-υπομονάδας του πολυπεπτιδίου (Floss και Yu, 2005) που εμπλέκονται στην πρόσδεση της RIF. Στην *E. coli*, οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντίσταση στη RIF βρίσκονται στην κεντρική περιοχή του πολυπεπτιδίου, στο σύμπλεγμα I (αμινοξέα 507-533), σύμπλεγμα II (αμινοξέα 563-572) και το σύμπλεγμα III (Jin και Gross, 1991, Severinov *et al.*, 1993) και μπορούν επίσης να εμφανιστούν κοντά στο N τελικό άκρο της υπομονάδας (Severinov *et al.*, 1993). Στον *M. tuberculosis*, η ανθεκτικότητα στη RIF συνδέεται κυρίως με μεταλλάξεις σε μία περιοχή με 81-bp (κωδικόνια 432 έως 458 στο σύμπλεγμα I) του *groB* (Telenti *et al.*, 1993), με το 41% των ανθεκτικών κλινικά απομονωμένων στελεχών να φέρουν μια μετάλλαξη του S455, 36% με μια μετάλλαξη του H440 και 9% με μια μετάλλαξη του D430 (Ramaswamy και Musser, 1998). Μια μετάλλαξη στην αρχή του γονιδίου *groB*, το αμινοτελικό σύμπλεγμα I, έχει επίσης παρατηρηθεί (V176F). Αυτή η μετάλλαξη δίνει υψηλού επιπέδου ανοχή στη RIF και μπορεί να ευθύνεται για την εμφάνιση περισσότερο από 1% RIF<sup>R</sup> στελεχών. Μεταλλάξεις με ανθεκτικότητα στη RIF έχουν επίσης βρεθεί στο N-άκρο (V135F) και το σύμπλεγμα I (Q469K, Q469L, Q469R, H482D, H482P, H482R, H482Y, S487F, S487L και S487Y) του γονιδίου *groB* του *B. Subtilis* (Perkins και Nicholson, 2008) καθώς και στο *Helicobacter pylori* (V149F) (Heep *et al.*, 2001).



Εικόνα 9. Σημείο σύνδεσης της ριφαμπικίνης στο ενεργό κέντρο της RNA πολυμεράσης. Το μοντέλο κτίστηκε από τις συντεταγμένες του πυρηνικού συμπλόκου του *Thermus aquaticus* [1I6V (Campbell *et al.*, 2001)] και από έναν πυρηνικό σύμπλοκο του *Thermus thermophilus* [2O5I (Vassylyev *et al.*, 2007)] τα στοιχεία των οποίων ανακτήθηκαν από την Τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data-Bank). Η α-υπομονάδα παρουσιάζεται με κίτρινο χρώμα, η β-υπομονάδα με μπλε, η β'-υπομονάδα με ματζέντα, η διπλή έλικα του DNA με κόκκινο και πράσινο, το RNA με πορτοκαλί και τέλος η RIF με φωτεινό κίτρινο χρώμα (Turpin *et al.*, 2010).

Η ανθεκτικότητα σε μεταγραφικούς αναστολείς, που προκύπτει από σημειακές μεταλλάξεις του στόχου, δεν είναι ουδέτερη για τα βακτήρια. Στην περίπτωση της ριφαμπικίνης, αυτές οι μεταβολές στο στόχο επανειλημμένα εμπλέκονται σε απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Sonenshein *et al.*, 1974; Kawamura *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2002; Bergval *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 1988), πιθανώς λόγω αλλαγής του τερματισμού της ρο-εξαρτώμενης μεταγραφής (Jin *et al.*, 1988).



Εικόνα 10. Θέση των μεταλλάξεων ανθεκτικότητας στη ριφαμπικίνη, στη  $\beta$  υπομονάδα της RNAP. Το 1342-αμινο-οξύ-καιρό  $\beta$  υπομονάδα αντιπροσωπεύεται από τη λεπτή μπάρα, οι γκρι σκιασμένες περιοχές που αντιστοιχούν στα διατηρημένα τμήματα της ακολουθίας, που ορίζονται με A-I, και οι κόκκινες αντιστοιχούν σε συμπλέγματα ανθεκτικότητας στη RIF: μεταλλάξεις στο *Mycobacterium tuberculosis* (πράσινο τρίγωνο), *Escherichia coli* (κίτρινο τρίγωνο) και *Bacillus subtilis* (μοβ τρίγωνο). Σημαντικές επαφές μεταξύ της RIF και της  $\alpha$ -υπομονάδας (μαύρες κουκίδες). (Turpin *et al.*, 2010)

### 1.6.2.2. Ανθεκτικότητα με διπλασιασμό (duplication) του στόχου

Διάφορα βακτήρια είναι φυσικά ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη εξαιτίας μεταλλαγών στο *groB* γονίδιο. Τα *Nocardia sp.* είναι Gram-θετικά σαπρόφυτα που βρίσκονται στο περιβάλλον, με διάφορα είδη να προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις. Το *Nocardia farcinica* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε πολλά φάρμακα και είναι ιδιαίτερα συχνό στην Ιαπωνία (Kageyama *et al.*, 2004) και την Ευρώπη (Schaal και Lee, 1992, Wauters *et al.*, 2005). Το γονιδίωμα του *N. farcinica* IFM 10152 αφού αλληλουχήθηκε (Isikawa *et al.*, 2004) εντοπίστηκαν δύο διαφορετικά RNAP γονίδια της  $\beta$ -υπομονάδας, τα *groB* και *groB2*. Αυτά τα δύο γονίδια έχουν υψηλό βαθμό ομολογίας (88,8%) και η σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών τους αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη *Nocardia groB2* περιέχει υποκαταστάσεις αμινοξέων στα RIF συμπλέγματα I και II, που είναι πιθανό να προσδίδουν RIF ανθεκτικότητα (Isikawa *et al.*, 2006). Ο ρόλος του τροποποιημένου γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα, επιβεβαιώθηκε με σίγαση του *groB2*, φανερώνοντας ένα νέο μηχανισμό αντίστασης. Ένας τέτοιος μηχανισμός δεν μπορεί να είναι ένα σπάνιο γεγονός, καθώς η επικάλυψη του *groB* είναι ευρέως διαδεδομένη στα *Nocardia sp.* και πρόσφατα έχει βρεθεί σε ένα στενά συνδεδεμένο ακτινομύκητα *Actinomadura sp. ATCC 39727* (Vigliotta *et al.*, 2005). Δεν είναι ακόμα γνωστό εάν ο ακτινομύκητας *A. mediterranei*, ο οποίος παράγει τη

RIF, χρησιμοποιεί τη στρατηγική αυτή των επικαλύψεων για να αντισταθεί σε αυτό το αντιβιοτικό. Οι RIF μεταλλάξεις είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το γονίδιο έκφρασης και μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της παραγωγής του αντιβιοτικού σε είδη του γένους *Streptomyces* (Hu *et al.*, 2002) και μια αλλαγή στην απορρόφηση της πηγής άνθρακα στο *B. subtilis* (Inaoka *et al.*, 2004). Οι προαναφερθείσες επαναλήψεις των μεταλλαγμένων *groB* γονιδίων θα μπορούσαν είτε να αντανakλούν μηχανισμούς σηματοδότησης μεταξύ των *N. farcinica* ή *Actinomadura sp.* και άλλα βακτήρια που παράγουν μόρια που μοιράζονται την ίδια θέση δέσμευσης με τη RIF ή την παρουσία των αδρανών γονιδίων που κωδικοποιούν για μόρια που στοχεύουν στη μεταγραφή του γονιδιώματός τους (Turpin *et al.*, 2010).

### **1.6.2.3. Ανθεκτικότητα που προκύπτει από το σύμπλοκο RNA πολυμεράση – πρωτεΐνες δέσμευσης**

Η ανθεκτικότητα δεν προκύπτει πάντα από μεταλλάξεις στο γονίδιο *groB*. Ο ακτινομύκτης *Streptomyces coelicolor* είναι εγγενώς ανθεκτικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις ριφαμπικίνης και πρόσφατα οι Newell *et al.* (2006) έδειξαν μία RNAP-δεσμευτική πρωτεΐνη, την *gbrA*, η οποία παρέχει βασικά επίπεδα ανθεκτικότητας στη ριφαμπικίνη σε αυτόν τον οργανισμό. Πειράματα έχουν δείξει ότι η έκφραση της *gbrA* πρωτεΐνης προκύπτει σε χαμηλές συγκεντρώσεις RIF και ότι αυτό το μόριο αναστέλλει τον εκκινητή που κατευθύνει τη μεταγραφή σε ένα ριβοσωμικό RNA οπερόνιο. Η *dnaA* είναι μία άλλη RNAP-δεσμευτική πρωτεΐνη η οποία προστατεύει την RNAP από τη RIF, όπως και οι σ παράγοντες που συνδέονται με την RNAP για να σχηματίσουν ένα RNAP ολοένζυμο (Turpin *et al.*, 2010).

### **1.6.2.4. Ανθεκτικότητα με τροποποίηση της ριφαμπικίνης**

Μία άλλη στρατηγική είναι η ουδετεροποίηση του αντιβιοτικού με ομοιοπολική τροποποίηση. Τα βακτήρια μπορούν να απενεργοποιήσουν τη ριφαμπικίνη με διάφορους τρόπους, όπως γλυκοσυλίωση, ριβοσυλίωση, φωσφορυλίωση και αποχρωματισμό. (Turpin *et al.*, 2010)



### 1.6.2.5. Ανθεκτικότητα με τροποποίηση της διαπερατότητας

Ένα αντιβιοτικό για να είναι αποτελεσματικό πρέπει να φτάσει στο στόχο του σε αποδοτικό χρόνο και σε αρκετή ποσότητα. Μία στρατηγική καταστροφής του αντιβιοτικού είναι η παρεμπόδιση της εισόδου του στο κύτταρο. Ορισμένα βακτηριακά είδη που δεν επιτρέπουν σε πολλά αντιβιοτικά να συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα ονομάζονται «εγγενώς» ανθεκτικά, ενώ άλλα βακτήρια ευαίσθητα στα αντιβιοτικά μπορούν να γίνουν ανθεκτικά σε πολλαπλά αντιβιοτικά. Αυτό συμβαίνει μέσω δύο μηχανισμών:

- (i) τα βακτήρια μπορεί να είναι ανθεκτικά ή να αποκτήσουν ανθεκτικότητα μειώνοντας τη διαπερατότητα του μεμβρανικού φράγματος και
- (ii) μπορούν επίσης να υπερεκφράζουν αντλίες εκροής που σχετίζονται με τη μεμβράνη (Turpin *et al.*, 2010).

### 1.6.3. Η μεταγραφή στόχος αντιμικροβιακών φαρμάκων

Τα βακτηριοκτόνα φάρμακα παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα βακτηριοστατικά σε αρκετές καλά-καθορισμένες ασθένειες (Stratton, 2003). Πράγματι, η ριφαμπικίνη έχει οριστεί ως βακτηριοκτόνο- αντιβιοτικό αφού η μοριακή βάση της βακτηριοκτόνου δράσης της επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Sat *et al.*, 2001). Οι ανασαμυκίνες εισήχθησαν το 1962 για τη θεραπεία θετικών κατά Gram βακτηριακών λοιμώξεων και στη συνέχεια της φυματίωσης. Επί του παρόντος, βραχυχρόνια χημειοθεραπεία που περιλαμβάνει ριφαμπικίνη, ισονιαζίδη, πυραζιναμίδη και αιθαμβουτόλη-στρεπτομυκίνη αποτελεί ακόμα τον ακρογωνιαίο λίθο στη θεραπεία για τη φυματίωση.

Παρά την εξαιρετική αποτελεσματικότητά της έναντι Gram-θετικών βακτηρίων, η ριφαμπικίνη έχει υψηλή τάση να παράγει ανθεκτικά μεταλλάγματα, γεγονός που περιορίζει σε μεγάλο βαθμό τη χρήση της ως θεραπευτικό. Έχουν παρατηρηθεί σχετικά υψηλές συχνότητες αυθόρμητων μεταλλάξεων Rif<sup>R</sup> σε στελέχη του *M. tuberculosis* τα οποία δεν είχαν εκτεθεί προηγουμένως στο αντιβιοτικό και κυμαίνονται από  $10^{-8}$  έως  $10^{-7}$  (Campbell *et al.*, 2001). Για το λόγο αυτό, η ριφαμπικίνη χορηγείται γενικά σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά και η χρήση της περιορίζεται σε σαφώς καθορισμένες ασθένειες. Εκτός από τη χρήση της στη φυματίωση, είναι ένα πρώτης επιλογής αντιβιοτικό για την πρόληψη της μηνιγγίτιδας και της θεραπείας της βρουκέλλωσης. Σε συνδυασμό με κινολόνες,

μινοκυκλίνη, κοτριμοξαζόλη, φουσιδικό οξύ ή βανκομυκίνη, η ριφαμπικίνη έχει επίσης ένα σημαντικό ρόλο στην θεραπεία των λοιμώξεων που σχετίζονται με το βιοφίλμ (Trampuz και Zimmerli, 2005). Οι σχετικά υψηλές συχνότητες αυθόρμητης μετάλλαξης μπορεί να αποδοθεί τουλάχιστον εν μέρει, στο μεγάλο αριθμό των μεταλλαξιγόνων (mutable codons) κωδικονίων και συγκεκριμένες υποκαταστάσεις ζευγών βάσεων που οδηγούν σε υποκαταστάσεις αμινοξέων (>20) που σχετίζονται με τον φαινότυπο Rif<sup>R</sup> στο *M. tuberculosis* (Telenti *et al.*, 1993; Hauck *et al.*, 2009).

Οι Rif<sup>R</sup> μεταλλάξεις συμβαίνουν σε σχετικά υψηλές συχνότητες σε άλλα βακτήρια και οι μεταλλάξεις οδηγούν στην ίδια κεντρική περιοχή του γονιδίου *groB* όπως παρατηρείται στο μυκοβακτήριο της φυματίωσης. Σε πρώιμες μελέτες σε *E. coli*, αναλύθηκαν 42 μεταλλάγματα Rif<sup>R</sup> από τα οποία 35 είχαν απλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *groB*, ενώ τα υπόλοιπα είχαν πολλαπλές μεταλλάξεις (Jin και Gross, 2003). Οι 35 μονές μεταλλάξεις εμφανίστηκαν σε 17 αλληλόμορφα σε 14 κωδικόνια. Δύο αφορούσαν την απαλοιφή κωδικονίων (in-frame deletion), μία την εισαγωγή κωδικονίων (in-frame insertion) και οι άλλες ήταν αντικαταστάσεις ζευγών βάσεων. Οι Garibyan *et al.* (2003) έχουν αναγνωρίσει 69 διαφορετικές υποκαταστάσεις ζευγών βάσεων μεταξύ των *E. coli* Rif<sup>R</sup> μεταλλαγμάτων που οδηγούν σε 37 ζεύγη βάσεων που βρίσκονται σε 24 κωδικόνια του γονιδίου *groB*. Παρατηρήθηκαν όλοι οι έξι τύποι αντικαταστάσεων ζευγών βάσεων (GC σε AT και AT σε GC μεταβάσεις-transitions, και GC σε CG, GC σε TA, AT σε CG και AT σε TA μεταστροφές-transversions). Αυτή η παρατήρηση έδειξε ότι το *groB* / Rif<sup>R</sup> σύστημα μπορεί να παρέχει μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο για τη μελέτη αυθόρμητων και επαγόμενων μεταλλάξεων μηχανισμών στο *E. coli* και σε άλλα βακτήρια. Πρόσφατα έχουν μελετηθεί οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων *groB* στις αποδόσεις δευτερογενών μεταβολιτών σε ακτινομύκητες. Παρατήρησαν ότι ορισμένες μεταλλάξεις Rif<sup>R</sup> καθορισμένες για τη χαρτογράφηση του *groB* σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών ή ενεργοποίηση κρυφών γονιδιακών συστημάτων βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών (Hu *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2013; Ochi *et al.*, 2014; Ochi and Hosaka, 2013).

#### 1.6.4. Μεταλλαξιγένεση του γονιδίου *groB* που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της RNA πολυμεράσης

Η υψηλή διατήρηση των περιοχών για μεταλλάξεις RifR μεταξύ των βακτηρίων, ο μεγάλος αριθμός των μεταλλάξιμων περιοχών (mutable sites), η ευκολία στην επιλογή RifR μεταλλαγμάτων και η ένταξη όλων των έξι τύπων αντικαταστάσεων ζευγών βάσεων μεταξύ των RifR μεταλλαγμάτων προτείνει ότι το *groB* / RifR σύστημα μπορεί να είναι μια γενική μέθοδος για τη μελέτη μεταλλαξιγόνων διαδικασιών σε άλλα βακτήρια, περιλαμβανομένων εκείνων που στερούνται καλά ανεπτυγμένα γενετικά συστήματα (Garibyan *et al.*, 2003).

Ορισμένα μεταλλάγματα του RifR από διαφορετικούς ακτινομύκητες ενισχύουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και σε ορισμένες περιπτώσεις, ενεργοποιούν σιωπηλά ή κρυφά μονοπάτια (Ochi *et al.*, 2014). Η προσέγγιση αυτή έχει σημαντικές συνέπειες για την εξόρυξη μικροβιακού γονιδιώματος για νέους δευτερογενείς μεταβολίτες για την ανάπτυξη φαρμάκων και άλλων εφαρμογών (Ochi *et al.*, 2014, Baltz, 2011, Bachman, 2014). Σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν όλες οι ευμετάβλητες περιοχές στο γονίδιο *groB* που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, αλληλουχήθηκαν 248 μεταλλαγμένα *groB* αλληλόμορφα από επτά διαφορετικούς ακτινομύκητες, συμπεριλαμβανομένων πέντε ειδών *Streptomyces*, *Sa. erythraea* και *Amycolatopsis orientalis* (Tanaka *et al.*, 2013). Από αυτή την προσπάθεια φάνηκε ότι οι αυθόρμητες RifR μεταλλάξεις σε ακτινομύκητες μπορούν να προκύψουν από τα έξι μονοπάτια υποκατάστασης ζευγών βάσεων και επιπλέον επτά από τις 248 διαφορετικές μεταλλάξεις περιέχουν διαγραφές σε μια περιοχή του *groB* που κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο 10 αμινοξέων Gln421-Asn430. Αν εξετασθούν όλες οι πιθανές μεταβάσεις (4) και μεταστροφές (8) επί του κλώνου, δεν παρατηρήθηκαν T G μεταστροφές (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Αυθόρμητες RifR μεταλλάξεις στα γονίδια *groB* σε ακτινομύκητες (Ochi *et al.*, 2014)

Mutation pathway	Base-pair substitutions <sup>b</sup>	Mutable sites	Mutations observed	Normalized	
				Mutations per site	mutations per site
Transition	<u>GC to AT</u>	<u>6</u>	<u>116</u>	<u>19.3</u>	<u>2.5</u>
	G to A	2	18	9	
	C to T	4	98	24.5	
	<u>AT to GC</u>	<u>4</u>	<u>47</u>	<u>11.8</u>	<u>1.6</u>
	A to G	3	46	15.3	
Transversion	T to C	1	1	1	
	<u>GC to CG</u>	<u>4</u>	<u>15</u>	<u>3.8</u>	<u>0.5</u>
	G to C	1	1	1	
	C to G	3	14	4.7	
	<u>GC to TA</u>	<u>7</u>	<u>12</u>	<u>1.7</u>	<u>0.2</u>
	G to T	3	7	2.3	
	C to A	4	5	1.3	
	<u>AT to CG</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0.1</u>
	A to C	1	1	1	
	T to G	0	0	0	
	<u>AT to TA</u>	<u>5</u>	<u>15</u>	<u>3</u>	<u>0.4</u>
	A to T	4	13	3.3	
T to A	1	2	2		
Total		<u>27</u>	<u>206</u>	<u>7.6</u>	<u>1.0</u>

### 1.6.5. Πλειοτροπικά αποτελέσματα των RifR μεταλλάξεων

Η μεταγραφή είναι μια σύνθετη, περίπλοκη, ρυθμιζόμενη διαδικασία στην οποία η έναρξη με ειδικούς εκκινήτες, η παύση και ο τερματισμός περιλαμβάνουν την παροδική αλληλεπίδραση της RNAP με άλλες υπομονάδες, όπως οι  $\sigma$  παράγοντες, μικρά μόρια, αλληλουχίες DNA και το ίδιο το RNA μεταγράφημα. Η RIF είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση της φυσιολογίας των βακτηρίων επειδή οι RifR μεταλλάξεις επηρεάζουν μια σειρά από φαινοτύπους (Goldstein, 2014). Μερικές από τις μεταλλάξεις στο *E. coli* έχουν ως αποτέλεσμα η αύξηση να εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Επηρεάζουν τη σταθερότητα των πλασμιδίων, την ανάπτυξη των βακτηριοφάγων και την επιδεκτικότητα τους σε άλλους αναστολείς και ακόμα, επηρεάζουν φαινοτύπους που σχετίζονται με μεταλλάξεις σε άλλες υπομονάδες ή ένζυμα (Jin και Gross, 1999). Κάποιες RifR μεταλλάξεις επηρεάζουν την έκφραση του τερματισμού / αντι-τερματισμού της μεταγραφής ( Zhou και Jin, 1988; Little *et al.*, 1983; Zhou και Jin, 1998). Άλλα παραδείγματα των επιδράσεων που συνδέονται με τις RifR μεταλλάξεις είναι ότι εμπλέκονται στον έλεγχο της sporίωσης, στη βλάστηση, το σχήμα των κυττάρων και το μεταβολισμό του *B. subtilis* (Sonenshein *et al.*, 1974; Doi *et al.*, 1970; Perkins *et al.*, 2007), στον μη κανονικό τερματισμό στον εξασθενητή του οπερονίου της

τρυπτοφάνης στο *E.coli* (Yanofsky και Hom, 1981), στη μεταβολή των διατροφικών απαιτήσεων στο *Casei Lactobacillus* (Morishita και Yura, 1976), στην ενεργοποίηση σιωπηλών γονιδίων και στην αυξημένη παραγωγή αντιβιοτικού σε κάποιους ακτινομύκητες (Tanaka *et al.*, 2013). Έχουν γίνει επίσης, πολυάριθμες μελέτες σε διάφορους οργανισμούς ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο τα RifR μεταλλάγματα είναι κατάλληλα ή τοξικά και η προσαρμογή τους μέσω των δευτερογενών μεταλλάξεων (Goldstein, 2014).

## 1.7. Σκοπός μελέτης

Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να κινούνται σε στερεά μέσα και η κίνησή τους εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται (θερμοκρασία, pH, θρεπτικό μέσο κ.α.), συνεκτικότητα υποστρώματος (άγαρ 0,6% w/v) αλλά και την παρουσία παραγόντων που δρουν ανασταλτικά για την επιβίωσή τους (αντιβιοτικά).

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εστιάζει στην κίνηση - ομαδική κίνηση (swarming) που παρατηρείται στα βακτηριακά στελέχη A, H2 και 4a2 του *Azospirillum lipoferum*, ως απάντηση στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης που υποβλήθηκαν. Δηλαδή σε υποστρώματα με διαφορετική πηγή οργανικών οξέων, αλλά και σε υπόστρωμα παρουσία κάποιου αντιβιοτικού.

Σκοπός των πειραμάτων αυτών είναι η μελέτη της ικανότητας των ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη στελεχών να αποικίζουν στο ριζικό σύστημα των φυτών, να υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσής τους και αφού επιβιώσουν μετά από την εφαρμογή τους στο έδαφος, ως βιολογικοί παράγοντες να συμμετέχουν στη βελτίωση των αποδόσεων των φυτών, αντικαθιστώντας τα χημικά λιπάσματα.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Βιολογικό υλικό

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα H2 και 4a2 τα οποία ανήκουν στο είδος *Azospirillum brasilense*, καθώς και το στέλεχος A του *Azospirillum lipoferum* που προέρχονται από τον πειραματικό αγρό του Εργαστηρίου Γεωργίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η απομόνωσή τους πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

### 2.2. Θρεπτικά υλικά

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων:

α) Για την παρασκευή 1 λίτρου υγρού θρεπτικού διαλύματος ΟΑΒ με pH 7.0 χρειαζόμαστε

• $K_2HPO_4$	6.0 gr
• $KH_2PO_4$	4.0 gr
• $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 gr
• NaCl	0.1 gr
• $CaCl_2$	0.02 gr
• $NH_4Cl$	1.0 gr
• Difcoyeastextract	0.1 gr
• <u>Διάλυμα I</u>	10 ml
FeCl <sub>3</sub> 0.1gr ή FeEDTA	0.228 gr
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.022 gr
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.024 gr
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.08 gr
<u>Διάλυμα II</u>	1 ml
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.004gr
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.024gr

Στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκαν δύο διαφορετικά οργανικά οξέα, το μηλικό οξύ και το κιτρικό οξύ. Στην πρώτη περίπτωση προστέθηκαν 5 gr μηλικού οξέως για 1 lt διαλύματος και για τη ρύθμιση του pH (6,8-7,0), προστέθηκαν 3 gr NaOH. Ενώ στην άλλη περίπτωση προστέθηκαν 2 gr κιτρικού οξέως και το τελικό pH έδειξε να κυμαίνεται στις τιμές 6,8-7,0, χωρίς να χρειαστεί περεταίρω ρύθμιση.

β) Για την παρασκευή 1 λίτρου Nutrient Broth (NB) με pH 7.0 διαλύθηκαν 13 gr NB σε 1 lt H<sub>2</sub>O.

γ) Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου, προστίθενται στα παραπάνω διαλύματα, άγαρ 20 gr/lt. Για τη μελέτη της ομαδικής κίνησης swarming προστέθηκε ειδικό άγαρ για αυτή την περίπτωση σε συγκέντρωση 0,6% w/v.

### **2.3. Προετοιμασία προεμβολίων**

Πριν από κάθε πείραμα δημιουργήθηκαν υγρές καλλιέργειες των στελεχών A, H2 και 4a2 του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* σε υγρό θρεπτικό μέσο NB οι οποίες αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 30 °C για 24 ώρες μέχρι να φτάσουν στην εκθετική φάση αύξησης.

### **2.4. Επίστρωση τρυβλίων με τη μέθοδο streaking**

Τα βακτηριακά στελέχη A, H2 και 4a2 του *Azospirillum lipoferum* εμβολιάστηκαν με τη μέθοδο streaking σε στερεό θρεπτικό μέσο OAB στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές πηγές οργανικών οξέων, το κιτρικό οξύ και το μηλικό οξύ. Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα να διαπιστωθεί η ικανότητα αυτών των βακτηριακών στελεχών να αναπτύσσονται στα συγκεκριμένα υποστρώματα.



## 2.5. Μελέτη swarming σε υποστρώματα παρουσία διαφορετικών οργανικών οξέων

Η μελέτη swarming έγινε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό OAB και συγκέντρωση στερεοποιητικού παράγοντα άγαρ 0,6% w/v. Στο υπόστρωμα ανάπτυξης προστέθηκαν διαφορετικές πηγές οργανικών οξέων (μηλικό οξύ και κιτρικό οξύ) για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Η θερμοκρασία επώασης ρυθμίστηκε στους 30 °C. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για το κάθε ένα βακτηριακό στέλεχος H2 και 4a2 του *Azospirillum brasilense* και A του *Azospirillum lipoferum* για το καθένα διαφορετικό υπόστρωμα. Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν στο κέντρο, με 5 μl υγρής καλλιέργειας του κάθε βακτηριακού στελέχους, η οποία βρισκόταν στην εκθετική φάση αύξησης.

Στα πλαίσια της μακροσκοπικής παρατήρησης, μετρήθηκε η διάμετρος ανάπτυξης των βακτηρίων στο θρεπτικό μέσο και τα τρυβλία φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή τύπου Canon PowerShot G6.

## 2.6. Δημιουργία ανθεκτικών στελεχών στο αντιβιοτικό Rifampicin

Για την δημιουργία ανθεκτικών στελεχών στη ριφαμπικίνη το βακτηριακό στέλεχος A αναπτύχθηκε σε τρυβλία Petri (200ml υγρής καλλιέργειας A / τρυβλίο) με στερεό θρεπτικό υλικό NB (1,5% άγαρ) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού ριφαμπικίνη, 50 mg/ml και 100 mg/ml. Μετά από επώαση στους 30°C για τουλάχιστον 72 ώρες, στα τρυβλία αναπτύχθηκαν μεμονωμένες αποικίες διαφορετικού μεγέθους. Ο συνολικός αριθμός αποικιών που αναπτύχθηκε στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού ήταν τέσσερις στα 50 mg/ml και τρεις στα 100 mg/ml. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε διαφορετική συγκέντρωση του αντιβιοτικού.

Από αυτές τις ανθεκτικές αποικίες στη ριφαμπικίνη απομονώθηκαν τέσσερις διαφορετικού μεγέθους, δύο μεγάλες και δύο μικρές. Μία μεγάλη και μία μικρή, προέρχονται από τα τρυβλία με περιεκτικότητα σε ριφαμπικίνη 50 mg/ml και μία μεγάλη και μία μικρή από τα τρυβλία με περιεκτικότητα σε ριφαμπικίνη 100 mg/ml. Από τις αποικίες αυτές φτιάχτηκαν υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο NB και αφέθηκαν για επώαση στους 30 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, εφαρμόζοντας την τεχνική streaking, προστέθηκαν τα ανθεκτικά στελέχη για άλλη μια φορά σε υπόστρωμα NB παρουσία

ριφαμπικίνης, 50 mg/ml και 100 mg/ml αντίστοιχα για το καθένα, ώστε να επιβεβαιωθεί η ανθεκτικότητα τους στο αντιβιοτικό.

Από τις νέες αποικίες φτιάχτηκαν ξανά υγρές καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό μέσο NB και αφέθηκαν για επώαση στους 30 °C για 24 ώρες.

**Πίνακας 6. Ονοματολογία και μέγεθος των ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη αποικιών που απομονώθηκαν**

<b>Αποικία</b>	<b>Μέγεθος</b>
1.100	Μικρή
2.100	Μεγάλη
1.50	Μεγάλη
2.50	Μικρή

*Τα νούμερα 1 και 2 επιλέχθηκαν τυχαία για να χαρακτηριστούν οι αποικίες που χρησιμοποιήθηκαν. Τα νούμερα 50 και 100 αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις της ριφαμπικίνης από τις οποίες επιλέχτηκαν οι αποικίες, 50 mg/ml και 100 mg/ml αντίστοιχα.*

### **2.6.1. Μελέτη ομαδικής κίνησης (swarming) των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών στη ριφαμπικίνη**

Οι υγρές καλλιέργειες των ανθεκτικών στελεχών στη ριφαμπικίνη χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της ομαδικής κίνησης αυτών σε υπόστρωμα NB περιεκτικότητας 0,6% w/v άγαρ, με και χωρίς ριφαμπικίνη 50 mg/ml και 100 mg/ml για τα αντίστοιχα στελέχη.

Και τα τέσσερα ανθεκτικά στελέχη καθώς και το στέλεχος αγρίου τύπου, εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με υπόστρωμα NB περιεκτικότητας 0,6% w/v άγαρ, χωρίς ριφαμπικίνη. Ταυτόχρονα, 5 μl από καθένα από τα δύο ανθεκτικά στελέχη, προερχόμενα από το υπόστρωμα περιεκτικότητας 50 mg/ml ριφαμπικίνη, εμβολιάστηκαν στο κέντρο τρυβλίων με υπόστρωμα NB και περιεκτικότητα σε ριφαμπικίνη 50 mg/ml, καθώς και 5 μl από καθένα από τα δύο ανθεκτικά στελέχη, προερχόμενα από το υπόστρωμα περιεκτικότητας 100 mg/ml ριφαμπικίνη, εμβολιάστηκαν στο κέντρο τρυβλίων με υπόστρωμα NB και περιεκτικότητα σε ριφαμπικίνη 100 mg/ml. Όλα τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30 °C. Στη συνέχεια ακολούθησε μακροσκοπική παρατήρηση της αύξησης της διαμέτρου, των αποικιών που αναπτύχθηκαν, σε συνάρτηση με το χρόνο.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για το κάθε ανθεκτικό στέλεχος. Για κάθε χειρισμό μελετήθηκε και η ομαδική κίνηση του βακτηριακού στελέχους A αγρίου τύπου, του *Azospirillum lipoferum*.

Στα πλαίσια της μακροσκοπικής παρατήρησης, μετρήθηκε η διάμετρος ανάπτυξης των βακτηρίων στο θρεπτικό μέσο και τα τρυβλία φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή τύπου Canon PowerShot G6.

### **2.6.2. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από το στέλεχος A του *Azospirillum lipoferum*.**

Για την απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της NucleoSpin<sup>R</sup> Tissue και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- 5 ml θρεπτικού υλικού LB εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία καθενός από τα τέσσερα δείγματα του υπό μελέτη στελέχους που διαθέτουμε και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 30 °C για 24 ώρες.
- 1,5 ml καλλιέργειας μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο σωλήνα erpendorf παραμένει μόνο το ίζημα των κυττάρων.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 180 μl διαλύματος λύσης T, το οποίο περιέχει RNAase A.
- Προστίθενται 25 μl διαλύματος Proteinase K, το δείγμα αναδεύεται και επώάζεται για μία ώρα περίπου στους 56 °C.
- Προστίθενται 200 μl διαλύματος λύσης B3, ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος και επώαση για 10 λεπτά στους 70 °C.
- Προστίθενται 210 μl αιθανόλης (96-100%) και αναδεύεται καλά για 5 - 10 sec μέχρι να ομογενοποιηθεί.
- Όλο το δείγμα που είναι στο σωλήνα erpendorf μεταφέρεται στη στήλη, φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 1 ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα erpendorf.
- Προστίθενται 500 μl διαλύματος Wash Solution (B.W) στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα erpendorf.

- Ακολουθεί δεύτερο πλύσιμο, προσθέτοντας στη στήλη 600 μl διαλύματος B5 (περιέχει αιθανόλη) και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα B5 καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Η στήλη τοποθετείται σε καινούργιο σωλήνα erpendorf και ακολουθεί έκλυση DNA από αυτήν. Προστίθενται 100 μl του διαλύματος Elution Solution (B.E), προθερμασμένου στους 70 °C. Ακολουθεί επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αυξηθεί η έκλυση. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

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

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης εξασφαλίζει την παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA από πολύ μικρή αρχική ποσότητα απομονωμένου DNA ενός οργανισμού. Βασική προϋπόθεση είναι η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στα άκρα του τμήματος του DNA που πρόκειται να αντιγραφεί. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των εκκινητών δηλαδή δύο ολιγονουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικά με τα άκρα του τμήματος του DNA που θα αντιγραφεί (Ντούνη, 2010).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για την PCR προγραμματίζεται στην συσκευή του ειδικού θερμικού κυκλοποιητή.

Μια τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής :


Σε ειδικό σωλήνα erpendorf προστίθενται :

- |  |        |
|--|--------|
| • Γονιδιωματικό DNA                                  | 1 μg   |
| • Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10 μM)    | 1 μl   |
| • Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10μM) | 1 μl   |
| • Μίγμα dNTPs (10Mm)                                 | 1 μl   |
| • 10 x PCR ρυθμιστικό διάλυμα                        | 5 μl   |
| • DMSO   | 2 μl   |
| • DyNAzyme II DNA πολυμεράση                         | 0,5 μl |

- ddH<sub>2</sub>O

έως τελικό όγκο 50μl

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

- Αρχική αποδιάταξη 94 °C για 2-4 min
  - Αποδιάταξη 94 °C για 1 min
  - Υβριδισμός εκκινητών 45-65 °C για 1 min
  - Επιμήκυνση 72 °C για 1 min/ 13-15 kb αναμενόμενου προϊόντος
  - Τελική επιμήκυνση 72 °C για 5-10 min
- 35 κύκλοι
- 

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Forward: 5'-GCTGCATGTTTCGAGCCCATCAGCG-3'

Reverse: 5'-CGACATCTACCGCGTCATGCGTCC-3'

#### 2.6.4. Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών 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.

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

Η παρασκευή της πηκτής αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με την ακόλουθη διαδικασία:

- Ποσότητα αγαρόζης 1% αναμειγνύεται σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1 x TAE.
- Η φιάλη με την αγαρόζη και το διάλυμα TAE θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί τελείως.
- Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος φτάσει περίπου τους 60°C, προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0,5 mg/ml.
- Το διάλυμα αφήνεται να σταθεροποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχουν προσαρμοστεί η κατάλληλη «χτένα» έτσι ώστε να σχηματιστούν στην πηκτή, τα βοηθία φόρτωσης.

- Όταν η πηκτή σταθεροποιηθεί, απομακρύνεται η «χτένα» και η συσκευή συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1 xTAE, ώστε η πηκτή να είναι βυθισμένη στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα DNA αναμειγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης.
- Τέλος, στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται κατάλληλη τάση έως 60 Vcm<sup>-1</sup>.

### 2.6.5. Ανάκτηση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης

Για την ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της *QIAquick Gel Extraction kit NucleoSpinR Extract II* και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- Από την πηκτή αγαρόζης απομονώνεται με καθαρό νυστέρι, το τμήμα εκείνο που περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Η ζώνη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα erpendorf, ζυγίζεται και προστίθενται τριπλάσιος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος QG (3 μl QG / mg πηκτής).
- Το δείγμα επώαζεται για 5-10 min στους 50 °C έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη (ανακίνηση ανά 2-3 min).
- Στο διάλυμα προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης (1 μl ισοπροπανόλης / mg πηκτής).
- Το διάλυμα ανακινείται ήπια και τοποθετείται σε φορτισμένη στήλη *QIAquick Spin* και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το DNA προσδένεται στη στήλη και απομακρύνεται το διάλυμα που τη διαπέρασε.
- Στη συνέχεια γίνεται πλύση της στήλης με 750 μl διαλύματος QG και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Απορρίπτεται το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση για 1 min.
- Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα Erpendorf και γίνεται έκλυση του DNA με την προσθήκη 30 μl ddH<sub>2</sub>O ή διαλύματος EB.
- Το δείγμα επώαζεται για 1 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

## 2.6.6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα προσδιορίζονται φωτομετρικά με τη χρήση σπεκτροφωτόμετρου (NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer), αφού πρώτα πριν από τη μέτρηση επιλεγεί το λογισμικό με την ένδειξη DNA.

- Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται 1μl από τον εκάστοτε διαλύτη (H<sub>2</sub>O ή TE).
- Φωτομετρείται ποσότητα δείγματος 1 μl και λαμβάνονται οι λόγοι OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> βάσει των οποίων γίνεται η εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων των νουκλεϊκών οξέων.
- Ένα δείγμα DNA θεωρείται ικανοποιητικά καθαρό όταν ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> είναι περίπου 1,8. Μικρότερες τιμές αποτελούν συνήθως ένδειξη μόλυνσης.
- Επίσης, άλλο μέτρο καθαρότητας είναι ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> ο οποίος σε δείγματα υψηλής καθαρότητας κυμαίνεται μεταξύ 1,8 με 2,2 και μικρότερες αποτελούν ένδειξη μόλυνσης.

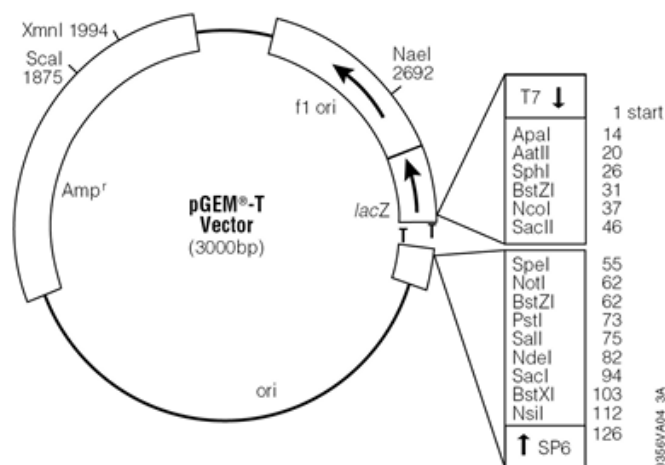
## 2.7. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

### 2.7.1. Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Τα τμήματα DNA που προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης φέρουν κολλώδη άκρα, οπότε για την κλωνοποίησή τους χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega) (Εικόνα 11). Ο φορέας έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI* και στα τυφλά άκρα που δημιουργήθηκαν, προστέθηκαν βάσεις θυμίνης, ώστε να αποφευχθεί η επανασυγκόλλησή τους.

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega) διαθέτει μια αρχή αντιγραφής (*ori*), τμήμα του γονιδίου *lacZ* του *E. coli*, που κωδικοποιεί για το α-πεπτιδίο του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση, μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσύνδεσμος) εντός του γονιδίου *lacZ* καθώς και τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων ενώ η μεταγραφή μπορεί και επάγεται παρουσία του χημικού αναλόγου της λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο). Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή μπλε ουσία. Η ένθεση ξένου DNA στη 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 ανασυνδιασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών όταν σε αυτές προστεθεί X-gal και IPTG. Επίσης ο συγκεκριμένος φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός που επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 11. Πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega)

([https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem\\_t-vector-systems/?activeTab=1](https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-vector-systems/?activeTab=1))

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

Η αντίδραση ενσωμάτωσης τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα γίνεται σε τελικό όγκο ο οποίος εξασφαλίζει την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3.

Σε σωλήνα errendorf τοποθετούνται ο πλασμιδιακός φορέας, το DNA ένθεσης, το ένζυμο λιγάση T4, ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο. Στην παρούσα εργασία η αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation) πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl. Πιο συγκεκριμένα η αντίδραση που έλαβε χώρα ήταν η εξής:

- Πλασμιδιακός φορέας 0,5 μl
- DNA ένθεσης 3 μl
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 1 μl
- Ένζυμο λιγάση T4 0,5 μl



- ddH<sub>2</sub>O έως τον τελικό όγκο των 10 μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 4 °C για 16 ώρες.

## **2.8. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli***

### **2.8.1. Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* κατάλληλων για μετασχηματισμό**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* XL-Blue το οποίο καλλιεργήθηκε σε στερεό ή υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Η ανάπτυξη του πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση στους 37 °C για 16 ώρες.

- 10 ml θρεπτικού υλικού, παρουσία αντιβιοτικού αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μία αποικία *E. coli* (XL-Blue) και επώάζονται υπό ανάδευση, για περίπου 18 ώρες στους 37 °C.
- 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37 °C για 2 ώρες περίπου ( $OD_{600}=0,3-0,4$ ). Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 25 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> και φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).
- Τα κύτταρα φυλάσσονται στους -80 °C.

### **2.8.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο**

- 100 μl ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων από το κατάλληλο στέλεχος *E. coli*, μεταφέρονται σε σωλήνα errendorf, μέσα σε πάγο.
- Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που προορίζονται για μετασχηματισμό.
- Το μίγμα κυττάρων-πλασμιδιακού DNA επώάζεται στον πάγο για περίπου μισή ώρα.
- Στη συνέχεια το μίγμα υποβάλλεται σε θερμικό σοκ (Heat-Shock) στους 42 °C για 1-2 min και μεταφέρεται απευθείας στον πάγο για 1 min. Έτσι επιτυγχάνεται η είσοδος του

πλασμιδίου στα κύτταρα.

- Προστίθενται 200 ml LB θρεπτικού διαλύματος και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 1 ώρα.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη για τον φορέα pGEM-T Easy) για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων.

## 2.9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli*

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα *E.coli* πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους :

i) Μέθοδος βρασμού (Holmes και Quilgey, 1981):

- 5 ml θρεπτικού υλικού LB, που περιέχουν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανάδευση στους 37 °C για περίπου 16 ώρες.
- Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1,5 ml σε σωλήνα Eppendorf και φυγοκεντρώνται στις 13000 rpm για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται αφήνοντας το ίζημα των κυττάρων όσο το δυνατόν πιο στεγνό.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 150 ml διαλύματος STET παρουσία 2 ml λυσοζύμης.
- Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 sec και μετά φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την φυγοκέντρηση, το ίζημα που αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνεται. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται στο υπερκείμενο 180 ml ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια και εφόσον το δείγμα έχει στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος TE.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

## ii) Απομόνωση με στήλη

Για την απομόνωση με στήλη χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*<sup>TM</sup> και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- 5 ml θρεπτικού υλικού LB, που περιέχουν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανάδευση στους 37 °C για περίπου 16 ώρες.
- 3 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 13000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 250 μl διαλύματος P1 (περιέχει RNAse A).
- Προστίθενται 250 μl διαλύματος P2 (περιέχει NaOH), το δείγμα ανακινείται απαλά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για λιγότερο από 5 min. Σε αυτό το στάδιο επιτυγχάνεται η λύση των κυττάρων.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος N3 (περιέχει οξικό οξύ και υδροχλωρική γουανιδίνη), ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται στην στήλη *QIAprep*.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη απορρίπτεται και σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA είναι προσδεμένο στη στήλη.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος PE (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση για 1 min, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα PE το οποίο περιέχει αιθανόλη και μπορεί να παρεμποδίσει περεταίρω ενζυμικές αντιδράσεις .
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε καινούριο σωλήνα Erpendorf και στη συνέχεια γίνεται έκλυση του DNA που είναι προσδεμένο στη στήλη με την προσθήκη 50 μl διαλύματος EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ή ddH<sub>2</sub>O. Το δείγμα επώαζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

## 2.10. Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού

Σε σωλήνα errendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου και το ένζυμο περιορισμού. Εάν το δείγμα του DNA περιέχει υπολείμματα RNA προστίθεται επιπλέον και RNase A. Τέλος, προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Στην παρούσα περίπτωση η πέψη πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl. Ως ένζυμο περιορισμού χρησιμοποιήθηκε το *EcoRI*, με αλληλουχία αναγνώρισης G/AATTC (όπου "/" ορίζεται το σημείο πέψευς στην αλληλουχία). Η αντίδραση που έλαβε χώρα ήταν η εξής :

- Διάλυμα DNA 1 μg (σε H<sub>2</sub>O ή TE) 4μl
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 2,5 μl
- Περιοριστικό ένζυμο *EcoRI* 0,5 μl
- Ένζυμο RNase A 0,2 μl
- ddH<sub>2</sub>O έως τον όγκο των 25 μl

Το δείγμα αναμειγνύεται καλά και επώαζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία (για το ένζυμο *EcoRI* είναι 37 °C) για 2-3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

## 2.11. Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*<sup>TM</sup>, εστάλη για αυτόματη αλληλούχιση στην εταιρία CEMIA DNA sequencing (Ελλάδα).

Η αναζήτηση της ταυτότητας των υπό μελέτη ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών, με τις διαθέσιμες ακολουθίες της βάσης δεδομένων GenBank χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information). Η μετάφραση των ακολουθιών σε αμινοξικές και η ανάλυση τους έγινε με το πρόγραμμα ExPASy (Expert Protein Analysis System).

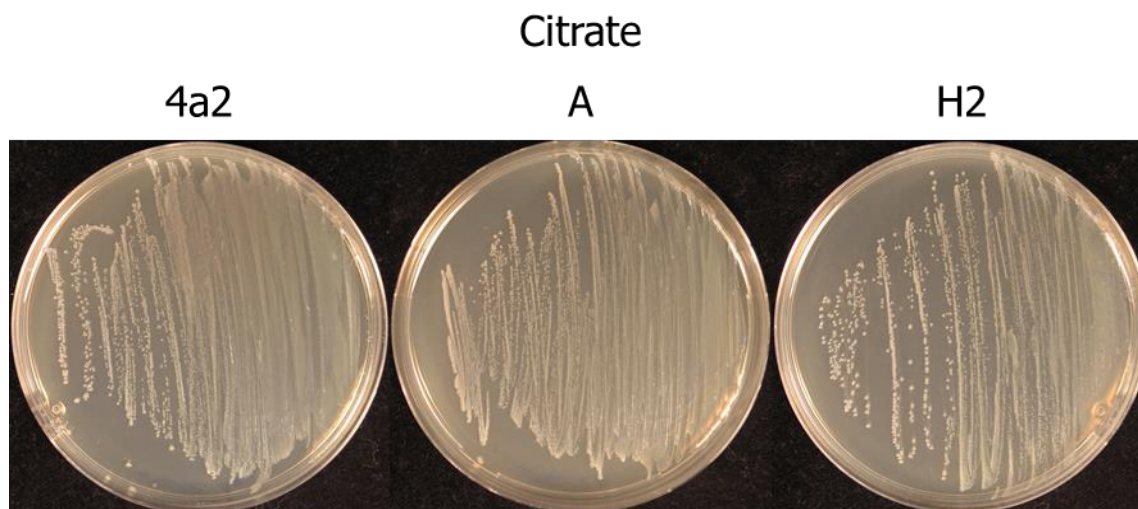
Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με τον αλγόριθμο CLUSTALW με τη βοήθεια του

προγράμματος ΜΕGA4.

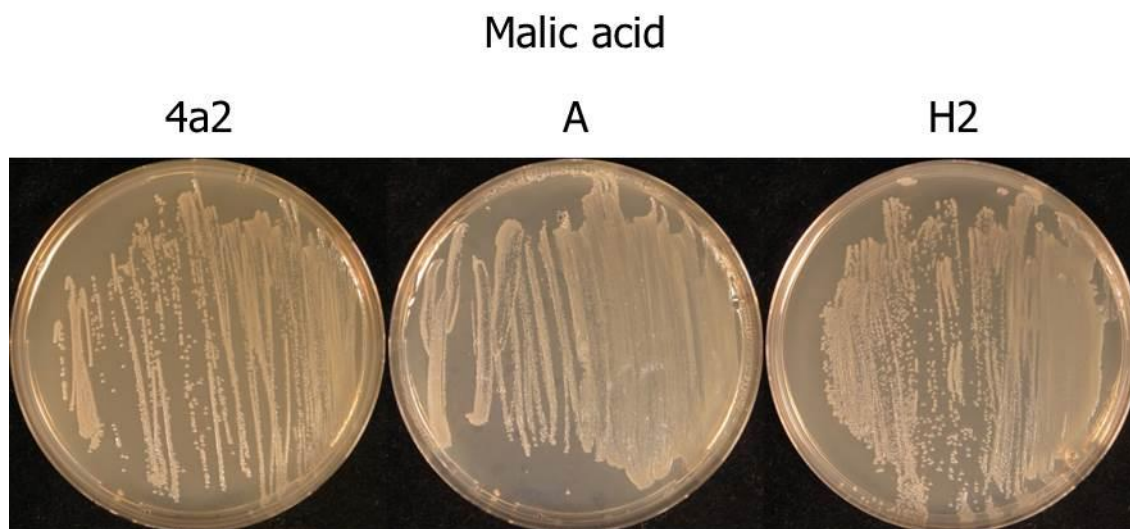
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Καλλιέργεια βακτηρίων σε διαφορετικά οργανικά οξέα

##### 3.1.1 Δοκιμή ανάπτυξης βακτηρίων σε οργανικά οξέα



Εικόνα 12. Ανάπτυξη των στελεχών 4a2 και H2 του βακτηρίου *Azospirillum brasilense* και του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε υπόστρωμα OAB παρουσία κιτρικού οξέος.

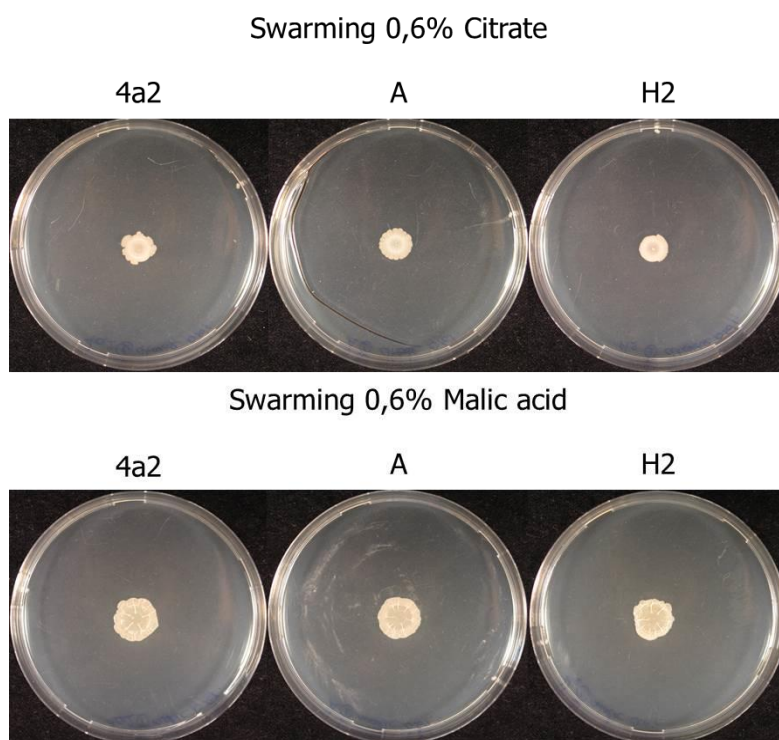


Εικόνα 13. Ανάπτυξη των στελεχών 4a2 και H2 του βακτηρίου *Azospirillum brasilense* και του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε υπόστρωμα OAB παρουσία μηλικού οξέος

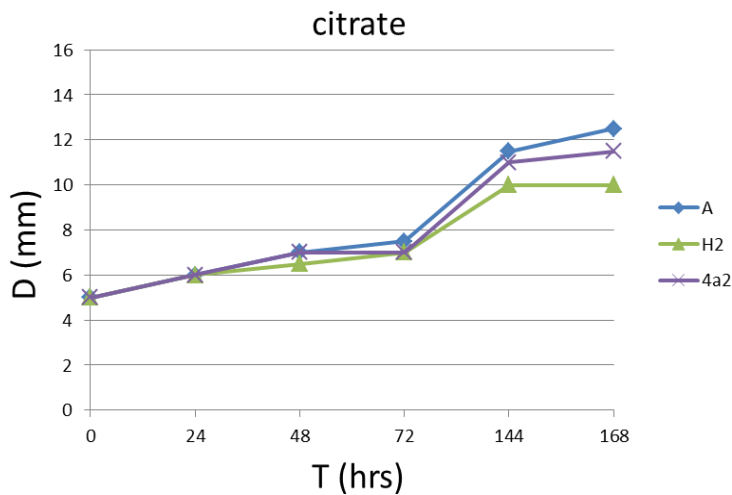
Και τα τρία στελέχη, τα H2 και 4a2 του βακτηρίου *A. brasilense* και το A του βακτηρίου *A. lipoferum*, μετά από επίστρωση των βακτηρίων με ραβδώσεις (streaking) σε τρυβλία με υπόστρωμα OAB αναπτύχθηκαν τόσο στο μηλικό οξύ (Εικόνα 13) όσο και στο κιτρικό οξύ (Εικόνα 12).

### 3.1.2. Μελέτη ομαδικής κίνησης (swarming) σε υποστρώματα με διαφορετικά οργανικά οξέα.

Αφού διαπιστώθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών H2 και 4a2 του *Azospirillum brasilense* και του στελέχους A του *Azospirillum lipoferum* σε υποστρώματα με διαφορετικά οργανικά οξέα, ακολούθησε πείραμα ανάπτυξής τους στα ίδια υποστρώματα, αλλά αυτή τη φορά αλλάζοντας τον στερεοποιητικό παράγοντα σε περιεκτικότητα 0,6% w/v άγαρ ώστε να μελετηθεί η ομαδική κίνηση (swarming) (Εικόνα 14). Απομονώθηκαν συνολικά 6 αποικίες. Μία για κάθε στέλεχος από κάθε ένα διαφορετικό υπόστρωμα. Αφού έγιναν υγρές καλλιέργειες από τα αντίστοιχα στελέχη, τρυβλία με υπόστρωμα OAB παρουσία μηλικού οξέος και τρυβλία με υπόστρωμα OAB παρουσία κιτρικού οξέος, περιεκτικότητας 0,6% w/v άγαρ, εμβολιάσθηκαν στο κέντρο με 5 μl προκαλλιέργειας του κάθε βακτηριακού στελέχους, η οποία βρισκόταν στην εκθετική φάση αύξησης.

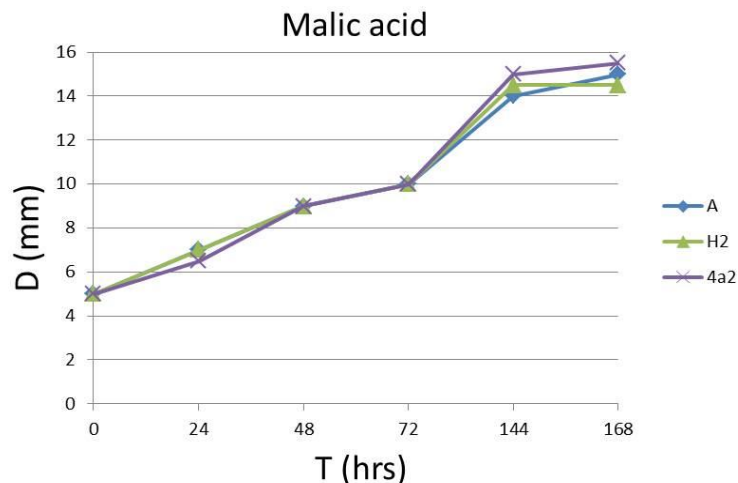


Εικόνα 14. Ανάπτυξη των στελεχών 4a2 και H2 του βακτηρίου *A. brasilense* και του στελέχους A του βακτηρίου *A. lipoferum* σε υπόστρωμα OAB παρουσία μηλικού οξέος και κιτρικού οξέος σε κίνηση swarming (0,6% w/v άγαρ).



Εικόνα 15. Κινητική αύξησης των αποικιών των στελεχών 4a2 και H2 του βακτηρίου *Azospirillum brasilense* και του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, ως αποτέλεσμα ομαδικής κίνησης (0,6% άγαρ) σε υπόστρωμα παρουσία κιτρικού οξέος, σε συνάρτηση με το χρόνο.

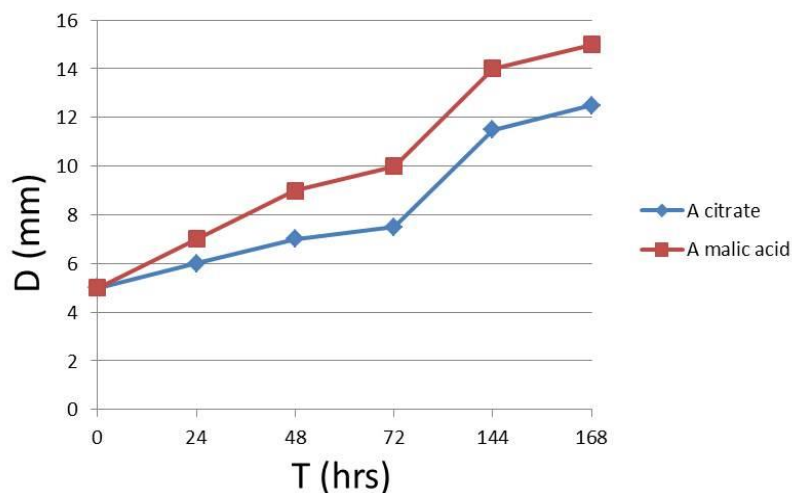
Σε παράλληλη παρατήρηση και των τριών βακτηριακών στελεχών σε ομαδική κίνηση σε υπόστρωμα παρουσία κιτρικού οξέος και τα τρία παρουσίασαν παρόμοια αύξηση σε συνάρτηση με το χρόνο με το A να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανάπτυξη και το H2 τη μικρότερη (Εικόνα 15).



Εικόνα 16. Κινητική αύξησης των αποικιών των στελεχών 4a2 και H2 του βακτηρίου *Azospirillum brasilense* και του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, ως αποτέλεσμα ομαδικής κίνησης (0,6% άγαρ) σε υπόστρωμα παρουσία μηλικού οξέος, σε συνάρτηση με το χρόνο.

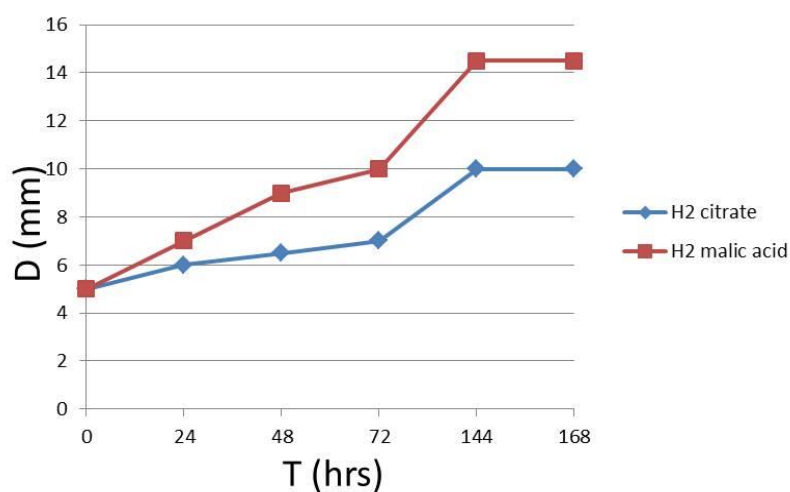
Σε παράλληλη παρατήρηση και των τριών βακτηριακών στελεχών σε ομαδική κίνηση σε υπόστρωμα παρουσία μηλικού οξέος και τα τρία παρουσίασαν παρόμοια αύξηση σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικόνα 16).





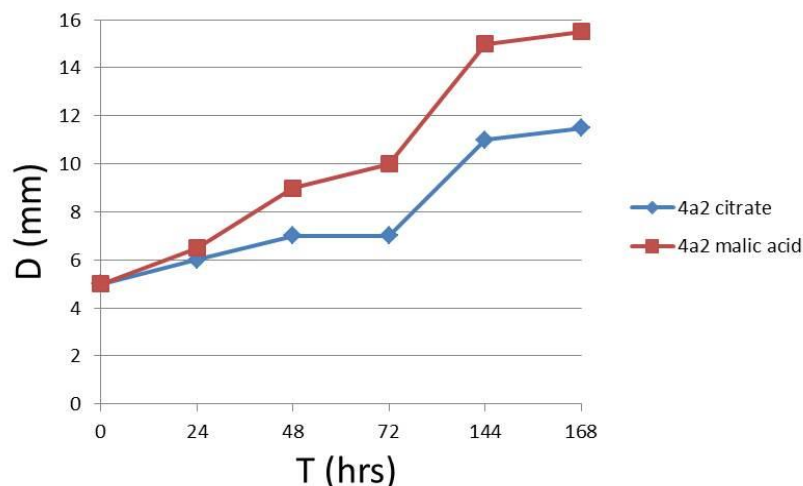
Εικόνα 17. Κινητική αύξησης των αποικιών του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, ως αποτέλεσμα ομαδικής κίνησης (0,6% άγαρ) σε υπόστρωμα παρουσία κιτρικού οξέος και μηλικού οξέος αντίστοιχα, σε συνάρτηση με το χρόνο.

Για το στέλεχος A του βακτηρίου *A. lipoferum* σε ομαδική κίνηση, σε τρυβλία παρουσία μηλικού και κιτρικού οξέος αντίστοιχα, η αποικία στο τρυβλίο που περιείχε μηλικό οξύ εμφάνισε μεγαλύτερη και πιο γρήγορη ανάπτυξη σε σχέση με την αποικία που αναπτύχθηκε σε κιτρικό οξύ (Εικόνα 17).



Εικόνα 18. Κινητική αύξησης των αποικιών του στελέχους H2 του βακτηρίου *Azospirillum brasilense*, ως αποτέλεσμα ομαδικής κίνησης (0,6% άγαρ) σε υπόστρωμα παρουσία κιτρικού οξέος και μηλικού οξέος αντίστοιχα, σε συνάρτηση με το χρόνο.

Για το στέλεχος H2 του βακτηρίου *A. lipoferum* σε ομαδική κίνηση, σε τρυβλία παρουσία μηλικού και κιτρικού οξέος αντίστοιχα, η αποικία στο τρυβλίο που περιείχε μηλικό οξύ εμφάνισε μεγαλύτερη και πιο γρήγορη ανάπτυξη σε σχέση με την αποικία που αναπτύχθηκε σε κιτρικό οξύ (Εικόνα 18).



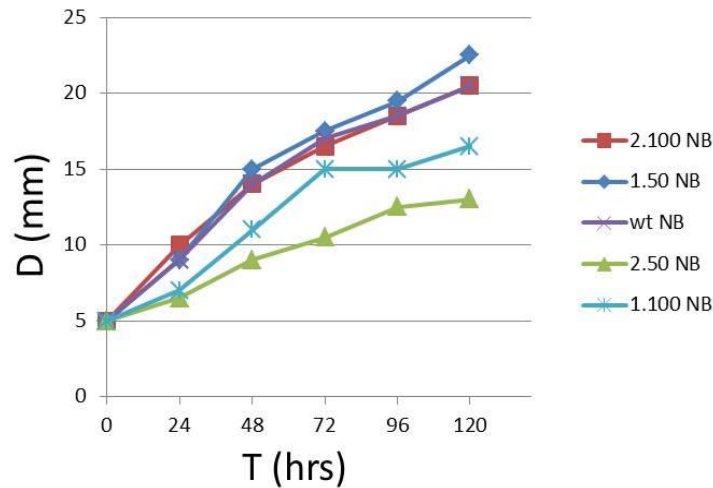
Εικόνα 19. Κινητική αύξησης των αποικιών του στελέχους 4a2 του βακτηρίου *Azospirillum brasilense*, ως αποτέλεσμα ομαδικής κίνησης (0,6% άγαρ) σε υπόστρωμα παρουσία κιτρικού οξέος, σε συνάρτηση με το χρόνο.

Στην Εικόνα 19 φαίνεται ότι για το στέλεχος 4a2 του βακτηρίου *A. lipoferum* σε ομαδική κίνηση, σε τρυβλία παρουσία μηλικού και κιτρικού οξέος αντίστοιχα, η αποικία στο τρυβλίο που περιείχε μηλικό οξύ εμφάνισε μεγαλύτερη και πιο γρήγορη ανάπτυξη σε σχέση με την αποικία που αναπτύχθηκε σε κιτρικό οξύ.

### 3.2. Ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη

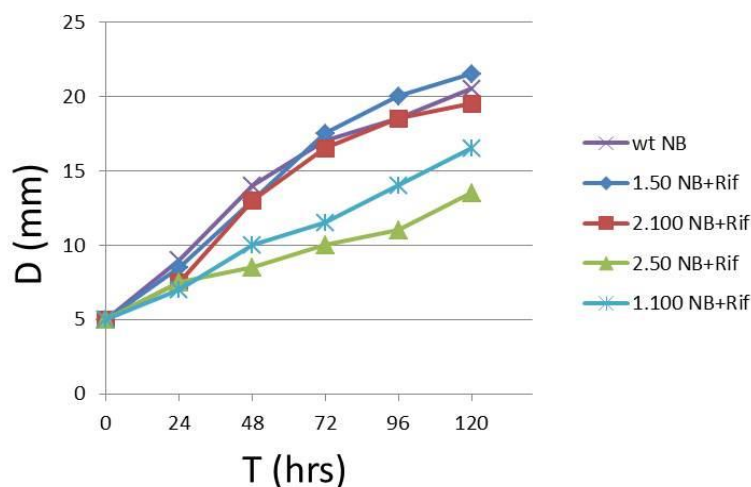
#### 3.2.1 Ομαδική κίνηση σε υπόστρωμα NB απουσία και παρουσία ριφαμπικίνης

Ο ρυθμός αύξησης της διαμέτρου της αποικίας συναρτήσει του χρόνου επώασης των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών A (1.100, 2.100, 1.50 και 2.50) του είδους *Azospirillum lipoferum*, σε τρυβλία με υπόστρωμα NB, περιεκτικότητας 0,6% w/v άγαρ (swarming), 50 mg/ml και 100 mg/ml ριφαμπικίνης αντίστοιχα, θερμοκρασία επώασης 30°C και pH υποστρώματος 7.0, παρουσιάζεται στις παρακάτω εικόνες.



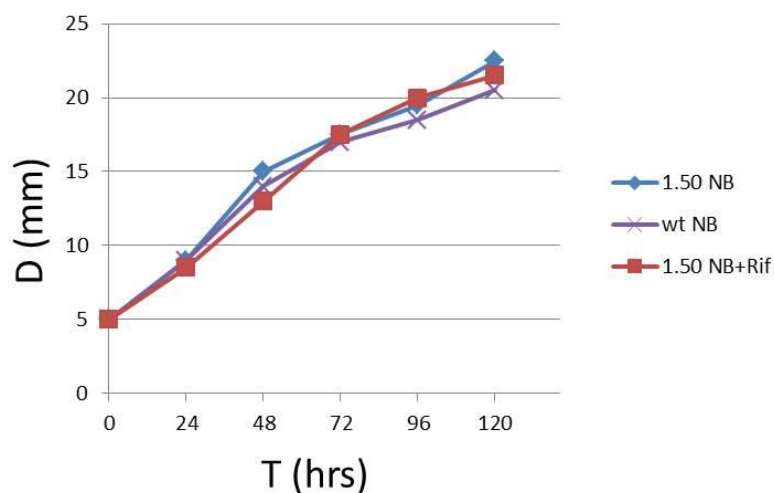
Εικόνα 20. Κινητική αύξησης των αποικιών των ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη στελεχών A (1.100, 2.100, 1.50 και 2.50) του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε ομαδική κίνηση, σε υπόστρωμα NB, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,6% w/v.

Στην Εικόνα 20, με ταυτόχρονη παρατήρηση όλων των ανθεκτικών στελεχών στη ριφαμπικίνη, κατά τη διάρκεια ανάπτυξής τους σε υπόστρωμα NB, οι αποικίες wt, 2.100 και 1.50 του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* εμφάνισαν παρόμοια αύξηση και μεγαλύτερη από τις 2.50 και 1.100, με την 2.50 να παρουσιάζει τη μικρότερη ανάπτυξη.



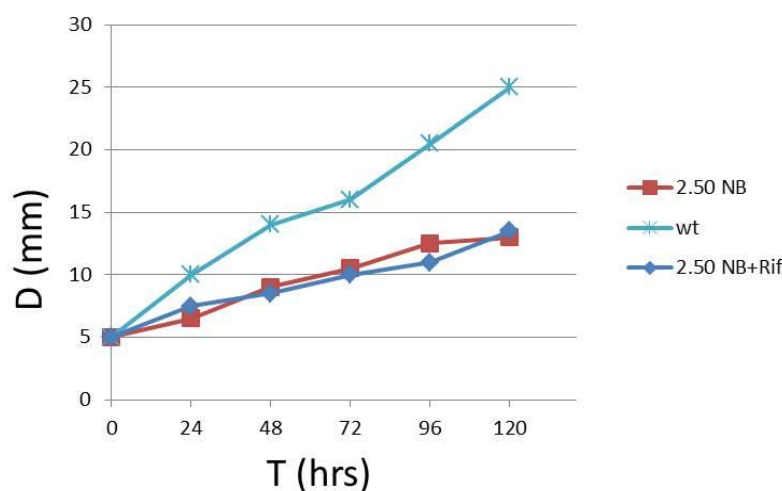
Εικόνα 21. Κινητική αύξησης των αποικιών των ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη στελεχών A (1.100, 2.100, 1.50 και 2.50) του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε ομαδική κίνηση, σε υπόστρωμα NB παρουσία ριφαμπικίνης 50 mg/ml και 100 mg/ml για τα αντίστοιχα στελέχη, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,6% w/v.

Στην εικόνα 21, με ταυτόχρονη παρατήρηση όλων των ανθεκτικών στελεχών στη ριφαμπικίνη, κατά τη διάρκεια ανάπτυξής τους σε υπόστρωμα NB, οι αποικίες wt, 2.100 και 1.50 του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* εμφάνισαν παρόμοια αύξηση και μεγαλύτερη από τις 2.50 και 1.100, με την 2.50 να παρουσιάζει τη μικρότερη ανάπτυξη.



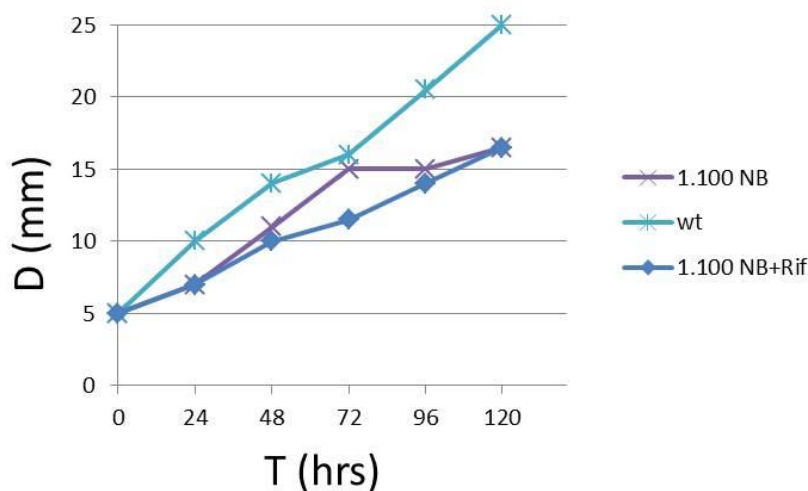
Εικόνα 22. Κινητική αύξησης των αποικιών του ανθεκτικού στη ριφαμπικίνη στελέχους A 1.50 και του στελέχους A αγρίου τύπου (wt) του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε ομαδική κίνηση, σε υπόστρωμα NB απουσία και παρουσία ριφαμπικίνης 50 mg/ml, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,6% w/v.

Στην Εικόνα 22, φαίνεται ότι το ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη στέλεχος A 1.50 του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, εμφάνισε παρόμοια αύξηση σε υπόστρωμα NB απουσία ριφαμπικίνης, σε υπόστρωμα NB παρουσία ριφαμπικίνης 50 mg/ml και με αυτή του αγρίου τύπου (wt) σε υπόστρωμα NB.



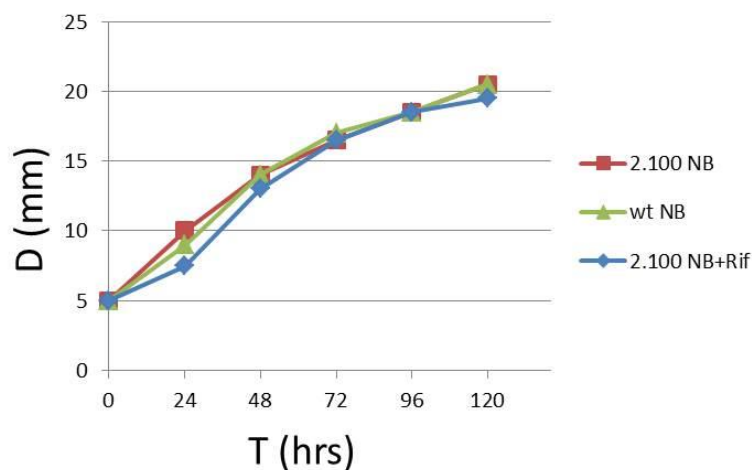
Εικόνα 23. Κινητική αύξησης των αποικιών του ανθεκτικού στη ριφαμπικίνη στελέχους A 2.50 και του στελέχους A αγρίου τύπου (wt) του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε ομαδική κίνηση, σε υπόστρωμα NB απουσία και παρουσία ριφαμπικίνης 50 mg/ml, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,6% w/v.

Στην Εικόνα 23, φαίνεται ότι το ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη στέλεχος A 2.50 του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, εμφάνισε παρόμοια αύξηση σε υπόστρωμα NB απουσία και παρουσία ριφαμπικίνης 50 mg/ml, αλλά μικρότερη από αυτή του αγρίου τύπου (wt), η οποία ήταν πολύ μεγαλύτερη σε όλη τη διάρκεια επώασης της αποικίας.



Εικόνα 24. Κινητική αύξησης των αποικιών του ανθεκτικού στη ριφαμπικίνη στελέχους A 1.100 και του στελέχους A αγρίου τύπου (wt) του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε ομαδική κίνηση, σε υπόστρωμα NB απουσία και παρουσία ριφαμπικίνης 100 mg/ml, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,6% w/v.

Το ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη στέλεχος A 1.100 του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, εμφάνισε παρόμοια αύξηση σε υπόστρωμα NB απουσία και παρουσία ριφαμπικίνης 100 mg/ml, αλλά μικρότερη από αυτή του αγρίου τύπου (wt), η οποία ήταν πολύ μεγαλύτερη (Εικόνα 24).

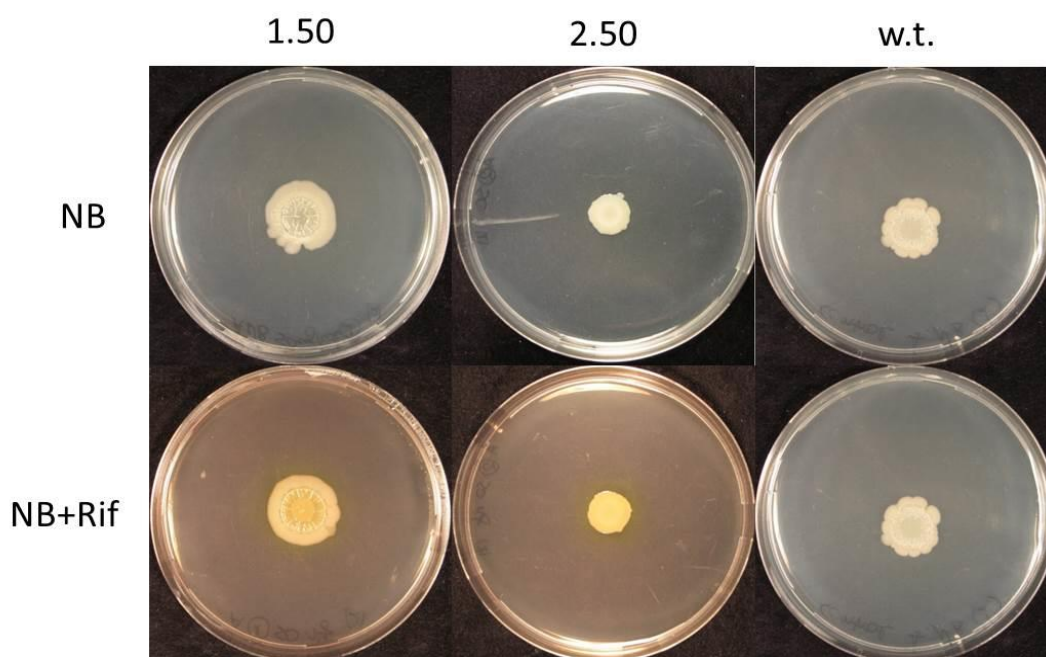


Εικόνα 25. Κινητική αύξησης των αποικιών του ανθεκτικού στη ριφαμπικίνη στελέχους A 2.100 και του στελέχους A αγρίου τύπου (wt) του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε ομαδική κίνηση, σε υπόστρωμα NB απουσία και παρουσία ριφαμπικίνης 100 mg/ml, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,6% w/v.

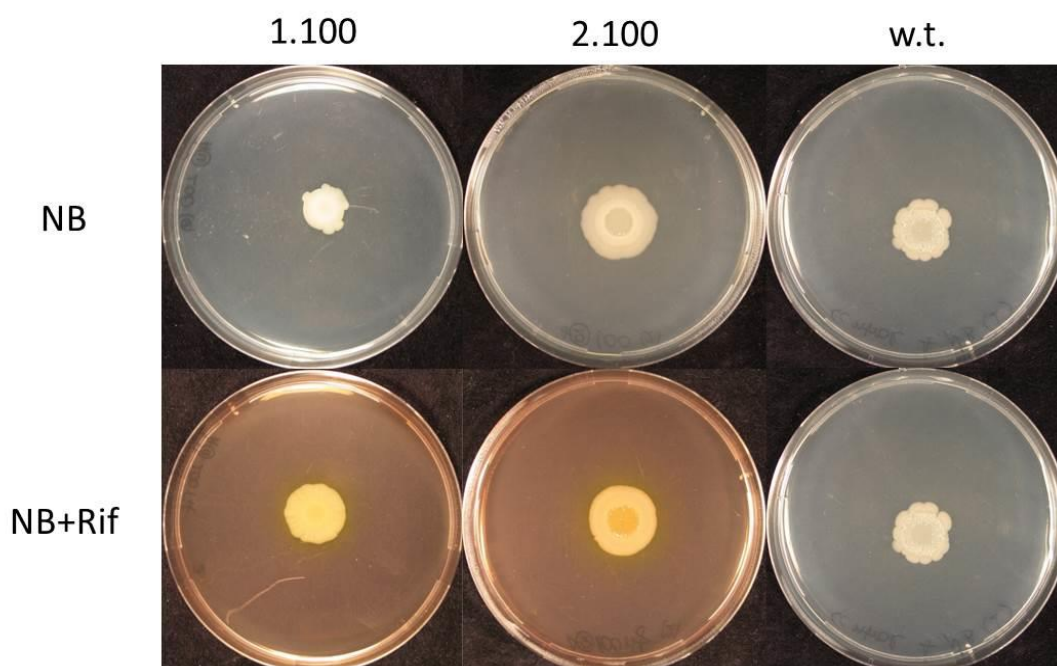
Το ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη στέλεχος A 2.100 του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, εμφάνισε παρόμοια αύξηση σε υπόστρωμα NB απουσία ριφαμπικίνης, σε υπόστρωμα NB παρουσία ριφαμπικίνης 100mg/ml και με αυτή του αγρίου τύπου (wt) σε

υπόστρωμα NB (Εικόνα 25).

Στις εικόνες 26 και 27 παρουσιάζεται φαινοτυπικά η αύξηση των μεταλλαγμένων στελεχών 1.100, 2.100, 1.50 και 2.50 και του αγρίου τύπου του στελέχους A του είδους *Azospirillum lipoferum*.



Εικόνα 26. Απεικόνιση της αύξησης των ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη στελεχών A (1.50 και 2.50) και του στελέχους A αγρίου τύπου (w.t.) του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε ομαδική κίνηση, σε υπόστρωμα NB παρουσία ριφαμπικίνης 50 mg/ml και 100 mg/ml για τα αντίστοιχα στελέχη, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,6% w/v.



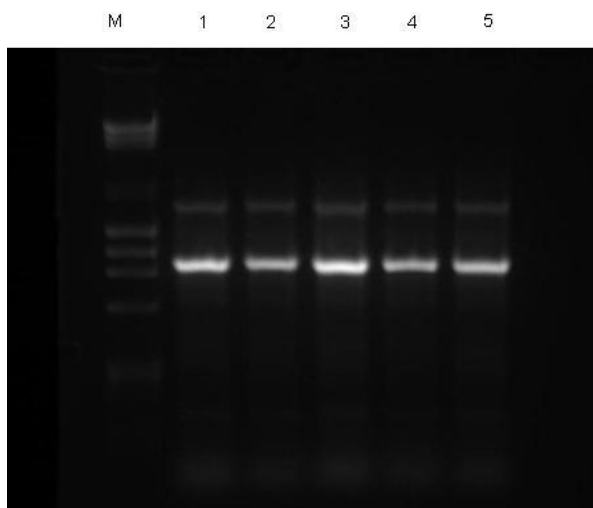
Εικόνα 27. Απεικόνιση της αύξησης των ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη στελεχών A (1.100 και 2.100) και του στελέχους A αγρίου τύπου (w.t.) του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum*, σε ομαδική κίνηση, σε υπόστρωμα

NB παρουσία ριφαμπικίνης 50 mg/ml και 100 mg/ml για τα αντίστοιχα στελέχη, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,6% w/v.

### 3.2.2. Ανάλυση του προϊόντος της PCR

Όταν συμβαίνουν μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο που ταυτοποιείται χρησιμοποιώντας ένα συγκεκριμένο πειραματικό σύστημα, οι περιοχές υψηλής σημασίας (hotspots) που προκύπτουν, θα μπορούσαν να αντανakλούν τις ιδιότητες του γονιδιακού προϊόντος και του τρόπου μετάλλαξης. Ανάλυση των αλληλουχιών των hotspots μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς της μεταλλαξιγένεσης (Rogozin και Ρανιον, 2003). Η *groB* περιοχή αποτελεί μία hotspot περιοχή του ολικού γονιδιώματος του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* και εντοπίζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 370 – 622.

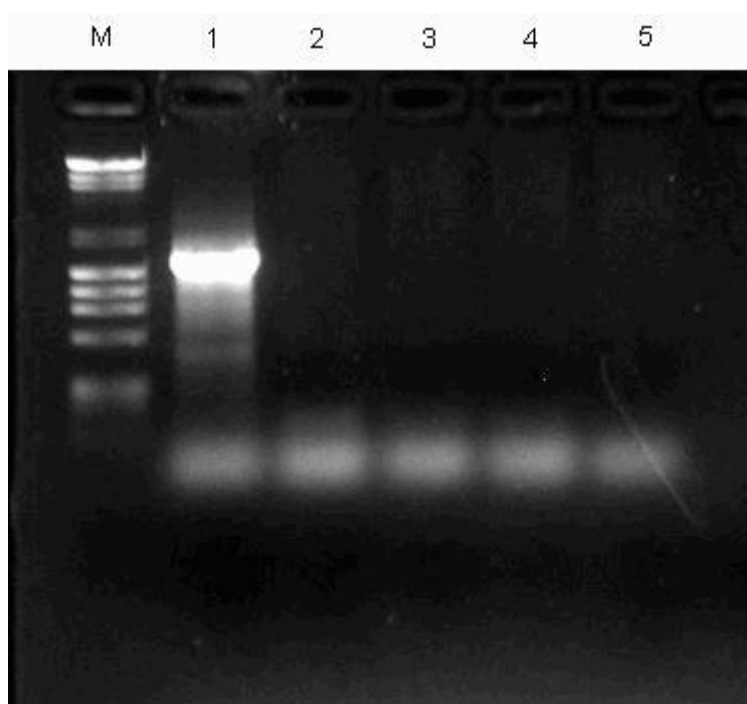
Με σκοπό την ενίσχυση της περιοχής στην οποία βρίσκεται το υπό μελέτη γονίδιο *groB*, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να φέρουν στα άκρα τους θέσεις αναγνώρισης από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *EcoRI* ώστε να είναι δυνατή η κλωνοποίηση της ένθεσης στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEM-T Easy. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και για τα πέντε βακτηριακά στελέχη (w.t., 1.100, 2.100, 1.50, 2.50). Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε αγαρόζη 1,5% με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης με σκοπό το διαχωρισμό τους με βάση το μέγεθός τους αφού πρώτα έγινε χρωματισμός του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο έχει την ικανότητα να φθορίζει όταν τεθεί σε UV ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα έδειξαν για όλα τα δείγματα μία ζώνη ως προϊόν PCR, ίδιου μεγέθους μεταξύ τους (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζη των προϊόντων ενίσχυσης PCR της *groB* περιοχής με εκμαγείο το ολικό γονιδιωματικό DNA των στελεχών 1: w.t., 2: 1.100, 3: 2.100, 4: 1.50 και 5: 2.50 του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* και όπου M (marker) ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών.

### 3.2.3.Ανάλυση της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας

Η επιθυμητή ζώνη ανακτήθηκε από το gel αγαρόζης και το προϊόν της συγκεκριμένης εργασίας ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1.5% w/v για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ένθετου τμήματος. Ακολούθησε πέψη του προϊόντος PCR (Εικόνα 29) και του φορέα έκφρασης pGEM-T Easy με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI*. Στη συνέχεια, τα απομονωμένα τμήματα κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση και στη συνέχεια έγινε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του, τόσο για το στέλεχος αγρίου τύπου (w.t.) όσο και για τα μεταλλαγμένα (1.100, 2.100, 1.50 και 2.50).



Εικόνα 29. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων πέψης των προϊόντων της PCR με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI* των στελεχών 1: w.t, 2: 1.100, 3: 2.100, 4: 1.50 και 5: 2.50 του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* και όπου M (marker) ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών.

α) Αποτελέσματα αλληλούχισης του βακτηριακού γονιδίου *rpoB*

```
>20140916AS1P1_A11_2014-09-23.ab1 wild type rpoB
TCGACATCTACCGCGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCGACCAAGGACGCCGCCGAGACCCTGTTCAACAACCTGTTCTTCAG
CGCCGAGCGTTACGATCTGTCCGCCGTTGGCCGCATGAAGTTCAACCGTCGTATCGGTTCGTACCGAGATCGAGGGTTCCGGGC
GTGCTGAGCAAGGAAGATATCGTCGAGGTCCTGAAGACCCTGGTTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTCGACGACATCG
ACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTCGTTGCGTCCGCGAGATGGCCGAGAACCAGTTCGCGTTCGGCCTGGTGCCTGTAGAGC
GCGCGGTCAAGGAACGTCTGTGATGGCGGAAAGCGAAGGCCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCG
ACGGCGGTGAAAGAGTTCCTCGTTCAGCCAGCTGTCCAGTTCGTGGACCAGAACAACCCGCTCTCCGAGATCACCCAC
AAGCGCCGCGTCTCTGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCGGCTTTGAAGTCCGTGACGTGCACCCGACC
CACTACGGCCGTGTGTGCCGATCGAGACCCTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCA
CCAACCAGTACGGCTTCTTGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCGTGTTCCTGTCCG
CCATTGAAGAAGCCGATCACGTTATCGCCC
```



>20140916AS2P1\_B11\_2014-09-23.ab1 rpoB 2:50

TCGACATCTACCGCGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCACCAAGGACGCCGCCGAGACCCTGTTCAACAACCTGTTCTTCAG  
CGCCGAGCGTTACGACTGTCCGCCGTTGGCCGCATGAAGTTCAACCGTCGTATCGGTTCGTACCGAGATCGAGGGCTCGGGC  
GTGCTGAGCAAGGAAGATATCGTCGAGGTCCTGAAGACCCTGGTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTCGACGACATCG  
ACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTTCGTTGCGTCGCGGAGATGGCCGAGAACCAGTTCCGCGTTGGCCTGGTGCGTGTAGAGC  
GCGCGGTCAAGGAACGTCTGTGATGGCGGAAAGCGAAGGCCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCG  
GCGGCGGTGAAAGAGTTCTTCGGTCCAGCCAGCTGTCCAGTTTCATGGGCCAGAACCAACCCGCTCTCCGAGATACCCAC  
AAGCGCCGCGTCTCTGACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCTGGCTTTGAAGTCCGTGACGTGCACCCGACC  
CACTACGGCCGTGTGTGCCGATCGAGACCCCTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCA  
CCAGCCAGTACGGCTTCTGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCGTGTCTCTGTCGG  
CCATTGAAGAAGCCGATCACGTTATCGCCC

>20140916AS3P1\_C11\_2014-09-23.ab1 rpoB 2:100

TCGACATCTACCGCGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCACCAAGGACGCCGCCGAGACCCTGTTCAACAACCTGTTCTTCAG  
CGCCGAGCGTTACGACTGTCCGCCGTTGGCCGCATGAAGTTCAACCGTCGTATCGGTTCGTACCGAGATCGAGGGTTCCGGC  
GTGCTGAGCAAGGAAGATATCGTCGAGGTCCTGAAGACCCTGGTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTCGACGACATCG  
ACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTTCGTTGCGACGCGGAGATGGCCGAGAACCAGTTCCGCGTTGGCCTGGTGCGTGTAGAGC  
GCGCGGTCAAGGAACGTCTGTGATGGCGGAAAGCGAAGGCCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCG  
GCGGCGGTGAAAGAGTTCTTCGGTCCAGCCAGCTGTCCAGTTTCATGGACCAGAACCAACCCGCTCTCCGAGATACCCCTCA  
AGCGCCGCGTCTCTGACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCTGGCTTTGAAGTCCGTGACGTGCACCCGACCC  
ACTACGGCCGTGTGTGCCGATCGAGACCCCTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCAC  
CAACCAGTACGGCTTCTGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCGTGTCTCTGTCGGC  
CATTGAAGAAGCCGATCACGTTATCGCCC

>20140925CS15P1.1:50

TCGACATCTACCGCGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCACCAAGGACGCCGCCGAGACCCTGTTCAACAACCTGTTCTTCAG  
CGCCGAGCGTTACGACTGTCCGCCGTTGGCCGCATGAAGTTCAACCGTCGTATCGGTTCGTACCGAGATCGAGGGTTCCGGC  
GTGCTGAGCAAGGAAGATATCGTCGAGGTCCTGAAGACCCTGGTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTCGACGACATCG  
ACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTTCGTTGCGTCGCGGAGATGGCCGAGAACCAGTTCCGCGTTGGCCTGGTGCGTGTAGAGC  
GCGCGGTCAAGGAACGTCTGTGACGCGCGGAAAGCGAGGTCCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCG  
GCGGCGGTGAAAGAGTTCTTCGGTCCAGCCAGCTGTCCAGTTTCATGGGCCAGAACCAACCCGCTCTCCGAGATACCCAC  
AAGCGCCGCGTCTCTGACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCTGGCTTTGAAGTCCGTGACGTGCACCCGACC  
CACTACGGCCGTGTGTGCCGATCGAGACCCCTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCA  
CCAACCAGTACGGCTTCTGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCGTGTCTCTGCCGG  
CCATTGAAGAAGCCGATCACGTTATCGCCC

>20140925CS16P11:100

TCGACATCTACCGCGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCACCAAGGACGCCGCCGAGACCCTGTTCAACAACCTGTTCTTCAG  
CGCCGAGCGTTACGACTGTCCGCCGTTGGCCGCATGAAGTTCAACCGTCGTATCGGTTCGTACCGAGATCGAGGGTTCCGGC  
GTGCTGAGCAAGGAAGACATCGTCGAGGTCCTGAAGACCCTGGTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTCGACGACATC  
GACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTTCGTTGCGTCGCGGAGATGGCCGAGAACCAGTTTCGCGTTGGCCTGGTGCGTGTAGAG  
CGCGCGGTCAAGGAACGTCTGTGATGGCGGAAAGCGAAGGCCTGATGCCGCAAGACCTGATCATCGCCAAGCCGGTTGCG  
GGCGGCGGTGAGAGAGTTCTTCGGTCCAGCCAGCTGTCCAGTTTCATGGACCAGAACCAACCCGCTCTCCGAGATACCCCA  
CAAGCGCCGCGTCTCTGACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCTGGCTTTGAAGTCCGTGACGTGCACCCGAC  
CCACTACGGCCGTGTGTGCCGATCGAGACCCCTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGTTCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGC  
ACCAACCAGTACGGCTTCTGAAAGCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCGTGTCTCTGTCG  
GCCATTGAAGAAGCCGATCACGTTATCGCCC

## β) Μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε αμινοξικές.

>wt

```
DIYRVMRPGEPTKDAAEFLFNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED  
IVEVLKTLVDIRNGKGIVDDIDHLGNRRVRCVGEAENQFRVGLRVERAVKERLSMAES  
EGLMPQDLINAKPVAVAVKEFFGSSQLSQFVDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG  
FEVRDVHPTHYGRVCIETPEGPNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV  
FLSAIEEADHVIA
```

>2\_50

```
DIYRVMRPGEPTKDAAEFLFNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED  
IVEVLKTLVDIRNGKGIVDDIDHLGNRRVRCVGEAENQFRVGLRVERAVKERLSMAES  
EGLMPQDLINAKPVAAAVKEFFGSSQLSQFMGQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG  
FEVRDVHPTHYGRVCIETPEGPNIGLINSLAAYARTSQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV  
FLSAIEEADHVIA
```

>2\_100

```
DIYRVMRPGEPTKDAAEFLFNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED  
IVEVLKTLVDIRNGKGIVDDIDHLGNRRVRCVGEAENQFRVGLRVERAVKERLSMAES  
EGLMPQDLINAKPVAAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITLKRVSALGPGGLTRERAG  
FEVRDVHPTHYGRVCIETPEGPNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV  
FLSAIEEADHVIA
```

>1\_50

```
DIYRVMRPGEPTKDAAEFLFNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED  
IVEVLKTLVDIRNGKGIVDDIDHLGNRRVRCVGEAENQFRVGLRVERAVKERLSTAES  
EVLMPQDLINAKPVAAAVKEFFGSSQLSQFMGQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG  
FEVRDVHPTHYGRVCIETPEGPNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV  
FLPAIEEADHVIA
```

>1\_100

```
DIYRVMRPGEPTKDAAEFLFNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED  
IVEVLKTLVDIRNGKGIVDDIDHLGNRRVRCVGEAENQFRVGLRVERAVKERLSMAES  
EGLMPQDLIIAKPVAAAVREFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG  
FEVRDVHPTHYGRVCIETPEGPNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV  
FLSAIEEADHVIA
```

Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με τον αλγόριθμο CLUSTALW με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA4. Η ανάλυση έδειξε σχετικά μικρές γενετικές αποστάσεις που δείχνουν μία στατιστικά ασήμαντη διαφοροποίηση.

## α) Αποτελέσματα ευθυγράμμισης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μέσω του προγράμματος CLUSTAL W

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

```
Wt_A.          TCGACATCTACCGCGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCGACCAAGGACGCCGCCGAGACCC  
2_100_A.      TCGACATCTACCGCGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCGACCAAGGACGCCGCCGAGACCC  
1_100_A.      TCGACATCTACCGCGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCGACCAAGGACGCCGCCGAGACCC
```

2\_50\_A. TCGACATCTACCGGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCGACCAAGGACGCCGCCGAGACCC  
1\_50\_A. TCGACATCTACCGGTCATGCGTCCAGGCGAGCCGCCGACCAAGGACGCCGCCGAGACCC  
\*\*\*\*\*

Wt\_A. TGTTCAACAACCTGTTCTTCAGCGCCGAGCGTTACGATCTGTCCGCCGTTGGCCGCATGA  
2\_100\_A. TGTTCAACAACCTGTTCTTCAGCGCCGAGCGTTACGATCTGTCCGCCGTTGGCCGCATGA  
1\_100\_A. TGTTCAACAACCTGTTCTTCAGCGCCGAGCGTTACGATCTGTCCGCCGTTGGCCGCATGA  
2\_50\_A. TGTTCAACAACCTGTTCTTCAGCGCCGAGCGTTACGATCTGTCCGCCGTTGGCCGCATGA  
1\_50\_A. TGTTCAACAACCTGTTCTTCAGCGCCGAGCGTTACGATCTGTCCGCCGTTGGCCGCATGA  
\*\*\*\*\*

Wt\_A. AGTTCAACCGTCGTATCGGTCTGACCGAGATCGAGGGTTCGGGCGTGCTGAGCAAGGAAG  
2\_100\_A. AGTTCAACCGTCGTATCGGTCTGACCGAGATCGAGGGTTCGGGCGTGCTGAGCAAGGAAG  
1\_100\_A. AGTTCAACCGTCGTATCGGTCTGACCGAGATCGAGGGTTCGGGCGTGCTGAGCAAGGAAG  
2\_50\_A. AGTTCAACCGTCGTATCGGTCTGACCGAGATCGAGGGTTCGGGCGTGCTGAGCAAGGAAG  
1\_50\_A. AGTTCAACCGTCGTATCGGTCTGACCGAGATCGAGGGTTCGGGCGTGCTGAGCAAGGAAG  
\*\*\*\*\*

Wt\_A. ATATCGTCGAGGTCTGAAGACCTGGTTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTGCGACG  
2\_100\_A. ATATCGTCGAGGTCTGAAGACCTGGTTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTGCGACG  
1\_100\_A. ATATCGTCGAGGTCTGAAGACCTGGTTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTGCGACG  
2\_50\_A. ATATCGTCGAGGTCTGAAGACCTGGTTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTGCGACG  
1\_50\_A. ATATCGTCGAGGTCTGAAGACCTGGTTCGATATCCGTAACGGCAAAGGCATTGTGCGACG  
\* \*\*\*\*\*

Wt\_A. ACATCGACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTCGTTGCGTCGGCGAGATGGCCGAGAACCAGT  
2\_100\_A. ACATCGACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTCGTTGCGTCGGCGAGATGGCCGAGAACCAGT  
1\_100\_A. ACATCGACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTCGTTGCGTCGGCGAGATGGCCGAGAACCAGT  
2\_50\_A. ACATCGACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTCGTTGCGTCGGCGAGATGGCCGAGAACCAGT  
1\_50\_A. ACATCGACCACCTGGGTAACCGTCGCGTTCGTTGCGTCGGCGAGATGGCCGAGAACCAGT  
\*\*\*\*\*

Wt\_A. TCCGCGTTGGCCTGGTGCCTGTAGAGCGCGCGTCAAGGAACGCTCTGTGATGGCCGAAA  
2\_100\_A. TCCGCGTTGGCCTGGTGCCTGTAGAGCGCGCGTCAAGGAACGCTCTGTGATGGCCGAAA  
1\_100\_A. TCCGCGTTGGCCTGGTGCCTGTAGAGCGCGCGTCAAGGAACGCTCTGTGATGGCCGAAA  
2\_50\_A. TCCGCGTTGGCCTGGTGCCTGTAGAGCGCGCGTCAAGGAACGCTCTGTGATGGCCGAAA  
1\_50\_A. TCCGCGTTGGCCTGGTGCCTGTAGAGCGCGCGTCAAGGAACGCTCTGTGATGGCCGAAA  
\* \*\*\*\*\*

Wt\_A. GCGAAGGCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCGACGGCGGTGAAAG  
2\_100\_A. GCGAAGGCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCGACGGCGGTGAAAG  
1\_100\_A. GCGAAGGCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCGACGGCGGTGAGAG  
2\_50\_A. GCGAAGGCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCGACGGCGGTGAAAG  
1\_50\_A. GCGAAGGCTGATGCCGCAAGACCTGATCAACGCCAAGCCGGTTGCGACGGCGGTGAAAG  
\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*

Wt\_A. AGTTCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCCAGTTCGTTGGACCAGAACACCCGCTCTCCGAGA  
2\_100\_A. AGTTCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCCAGTTCGTTGGACCAGAACACCCGCTCTCCGAGA  
1\_100\_A. AGTTCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCCAGTTCGTTGGACCAGAACACCCGCTCTCCGAGA  
2\_50\_A. AGTTCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCCAGTTCGTTGGACCAGAACACCCGCTCTCCGAGA  
1\_50\_A. AGTTCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCCAGTTCGTTGGACCAGAACACCCGCTCTCCGAGA  
\*\*\*\*\*

Wt\_A. TCACCCACAAGCGCCGCTCTCTGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCG  
2\_100\_A. TCACCCACAAGCGCCGCTCTCTGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCG  
1\_100\_A. TCACCCACAAGCGCCGCTCTCTGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCG  
2\_50\_A. TCACCCACAAGCGCCGCTCTCTGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCG  
1\_50\_A. TCACCCACAAGCGCCGCTCTCTGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTGCCG  
\*\*\*\*\*

Wt\_A. GCTTTGAAGTCCGTGACGTGACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCC  
2\_100\_A. GCTTTGAAGTCCGTGACGTGACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCC  
1\_100\_A. GCTTTGAAGTCCGTGACGTGACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCC  
2\_50\_A. GCTTTGAAGTCCGTGACGTGACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCC  
1\_50\_A. GCTTTGAAGTCCGTGACGTGACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCC  
\*\*\*\*\*

Wt\_A. CTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCACCAACCAGT  
2\_100\_A. CTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCACCAACCAGT  
1\_100\_A. CTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCACCAACCAGT  
2\_50\_A. CTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCGCACCAACCAGT

```

1_50_A.          CTGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCAGCCTATGCCCCACCAACCAGT
*****

Wt_A.           ACGGCTTCCTGGAAAGCCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCG
2_100_A.        ACGGCTTCCTGGAAAGCCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCG
1_100_A.        ACGGCTTCCTGGAAAGCCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCG
2_50_A.         ACGGCTTCCTGGAAAGCCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCG
1_50_A.         ACGGCTTCCTGGAAAGCCCCGTACCGCGTGGTGAAAGAAGGTGTGGTCAGCGACGACATCG
*****

Wt_A.           TGTTCCTGTTCGGCCATTGAAGAAGCCGATCAGTTATCGCCC
2_100_A.        TGTTCCTGTTCGGCCATTGAAGAAGCCGATCAGTTATCGCCC
1_100_A.        TGTTCCTGTTCGGCCATTGAAGAAGCCGATCAGTTATCGCCC
2_50_A.         TGTTCCTGTTCGGCCATTGAAGAAGCCGATCAGTTATCGCCC
1_50_A.         TGTTCCTGTTCGGCCATTGAAGAAGCCGATCAGTTATCGCCC
*****

```

Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που έχουν γίνει σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου.

## β) Αποτελέσματα ευθυγράμμισης των αμινοξικών αλληλουχιών μέσω του προγράμματος CLUSTAL W

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

WT          DIYRVMRPGEPPTKDAAEITLNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED
2_100       DIYRVMRPGEPPTKDAAEITLNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED
1_100       DIYRVMRPGEPPTKDAAEITLNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED
2_50        DIYRVMRPGEPPTKDAAEITLNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED
1_50        DIYRVMRPGEPPTKDAAEITLNNLFFSAERYDLSAVGRMKFNRRIGRTEIEGSGVLSKED
*****

WT          IVEVLKTLVDIRNGKIVDDIDHGLNRRVRCVGEAENQFRVGLVLRVERAVKERLSMAES
2_100       IVEVLKTLVDIRNGKIVDDIDHGLNRRVRCVGEAENQFRVGLVLRVERAVKERLSMAES
1_100       IVEVLKTLVDIRNGKIVDDIDHGLNRRVRCVGEAENQFRVGLVLRVERAVKERLSMAES
2_50        IVEVLKTLVDIRNGKIVDDIDHGLNRRVRCVGEAENQFRVGLVLRVERAVKERLSMAES
1_50        IVEVLKTLVDIRNGKIVDDIDHGLNRRVRCVGEAENQFRVGLVLRVERAVKERLSMAES
*****

WT          EGLMPQDLINAKPVATAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG
2_100       EGLMPQDLINAKPVAAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG
1_100       EGLMPQDLINAKPVAAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG
2_50        EGLMPQDLINAKPVAAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG
1_50        EGLMPQDLINAKPVAAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTRERAG
* ***** * : : : ***** * : : ***** * : : ***** * : : *****

WT          FEVRDVHPHPTHYGRVCPJETPEGNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV
2_100       FEVRDVHPHPTHYGRVCPJETPEGNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV
1_100       FEVRDVHPHPTHYGRVCPJETPEGNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV
2_50        FEVRDVHPHPTHYGRVCPJETPEGNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV
1_50        FEVRDVHPHPTHYGRVCPJETPEGNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVSDDIV
*****

WT          FLSAIEEADHVIA
2_100       FLSAIEEADHVIA
1_100       FLSAIEEADHVIA
2_50        FLSAIEEADHVIA
1_50        FLAIEEADHVIA
** .*****

```

Κάτω από τις αλληλουχίες είναι ένα κλειδί που δηλώνει:

– συντηρημένη αλληλουχία (\*),

- συντηρημένες μεταλλάξεις (:),
- ημι-συντηρημένες μεταλλάξεις (.) και
- μη συντηρημένες μεταλλάξεις ( )

Οι αστερίσκοι κάτω από τις βάσεις της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας δείχνουν την ομοιότητα που έχουν οι αλληλουχίες των ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη στελεχών, σε σχέση με τη νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του βακτηριακού στελέχους A αγρίου τύπου του *Azospirillum lipoferum*. Στα σημεία που δεν υπάρχουν αστερίσκοι κάτω από τις αλληλουχίες φαίνεται ότι έχει γίνει κάποια μεταλλαγή στην αλληλουχία ενός ή παραπάνω ανθεκτικών στελεχών.

**Πίνακας 7. Μεταλλαγές στα ανθεκτικά στελέχη και οι θέσεις στις οποίες εμφανίζονται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία**

w.t.	Στέλεχος				Θέση
	2.100	1.100	2.50	1.50	
T	T	T	C	T	98
T	T	T	C	T	157
T	T	C	T	T	182
T	A	T	T	T	277
T	T	T	T	C	352
A	A	A	A	G	365
G	G	G	G	T	367
A	A	T	A	A	391
A	G	G	G	G	409
A	A	G	A	A	419
G	A	A	A	A	454
A	A	A	G	G	458
A	T	A	A	A	487
C	T	T	T	T	539
A	A	T	A	A	624
A	A	A	G	A	655
T	T	T	T	C	669
<b>Σύνολο μεταλλαγών</b>	5	7	7	8	

Κατά την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών εντοπίστηκαν τα σημεία στα οποία έγιναν οι μεταλλάξεις που είχαν ως στόχο την εμφάνιση ανθεκτικότητας στη ριφαμπικίνη. Οι μεταλλάξεις αυτές στη νουκλεοτιδική αλυσίδα φαίνονται στον Πίνακα 7, ενώ στον Πίνακα 8, παρουσιάζονται οι μεταλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία.

Συνολικά παρουσιάστηκαν 27 μεταλλαγές σε σχέση με το στέλεχος A αγρίου τύπου.

Το γονίδιο *groB* τοποθετείται μεταξύ των βάσεων 370-622. Σε αυτές τις βάσεις παρουσιάστηκαν 20 μεταλλαγές για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήσαμε, 4 για το 2.100, 5 για το 1.100, 4 για το 2.50 και 4 για το 1.50. Στις θέσεις 409 (A->G), 454 (G->A) και 539 (C->T) και στα τέσσερα δείγματα, η μετάλλαξη σε κάθε θέση ήταν ίδια.

**Πίνακας 8. Μεταλλαγές στα ανθεκτικά στελέχη και οι θέσεις στις οποίες εμφανίζονται στην αμινοξική αλληλουχία.**

Στέλεχος					Θέση
w.t.	2.100	1.100	2.50	1.50	
V	D	V	V	V	32
M	M	M	M	T	117
G	G	G	G	V	122
N	N	I	N	N	130
T	A	A	A	A	136
K	K	R	K	A	139
V	M	M	M	M	151
D	D	D	G	G	152
H	L	H	H	H	162
I	I	F	I	I	208
N	N	N	S	N	218
S	S	S	S	P	243
<b>Σύνολο μεταλλαγών</b>	4	5	4	5	

**Πίνακας 9. Μεταλλαγές κωδικονίων σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα αμινοξέα συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (w.t.)**

Στέλεχος	Κωδικόνια και αντιστοίχιση αμινοξέων											
w.t.	GTC	ATG	GGC	AAC	ACG	AAA	GTG	GAC	CAC	ATC	AAC	TCG
	V	M	G	N	T	K	V	D	H	I	N	S
<b>2.50</b>					GCG		ATG	GGC			AGC	
					A		M	G			S	
<b>1.50</b>		ACG	GTC		GCG		ATG	GGC				
		T	V		A		M	G				
<b>1.100</b>				ATC	GCG	AGA	ATG			TTC		
				I	A	R	M			F		
<b>2.100</b>	GAC				GCG		ATG		CTC			
	D				A		M		L			

Από τον Πίνακα 9 φαίνεται ότι όλες οι μεταλλαγές στα κωδικόνια οδήγησαν σε αλλαγή του αντίστοιχου αμινοξέος.

Η αντιστοίχιση των αμινοξέων με τα κωδικόνια παρουσιάζεται στο Παράρτημα Α'. Επίσης στο Παράρτημα αυτό φαίνεται και η σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών του γονιδίου *groB* για τα στελέχη αυτά σε σχέση με τα αντίστοιχα γονίδια άλλων οργανισμών (*E. coli* και *P. aeruginosa*).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών οργανικών οξέων στην ομαδική κίνηση του στελέχους A του βακτηρίου *Azospirillum lipoferum* και για τα στελέχη H2 και 4a2 του βακτηρίου *Azospirillum brasilense*. Επίσης μελετήθηκε και η επίδραση του αντιβιοτικού ριφαμπικίνη στην επιβίωση του στελέχους A του βακτηρίου *A. lipoferum* και της ομαδικής κίνησης των βακτηρίων σε υποστρώματα παρουσία και απουσία αυτού του αντιβιοτικού.

Η μελέτη της κίνησης swarming των βακτηριακών στελεχών A, H2 και 4a2 πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με υπόστρωμα OAB, περιεκτικότητας 0,6% w/v άγαρ, θερμοκρασία επώασης 30 °C, pH υποστρώματος 7.0 και παρουσία διαφορετικών οργανικών οξέων (μηλικό οξύ, κιτρικό οξύ). Μετρήθηκε ο ρυθμός αύξησης της διαμέτρου των αποικιών συναρτήσει του χρόνου επώασης. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η παρουσία διαφορετικών πηγών άνθρακα επηρεάζουν με διάφορο βαθμό το ρυθμό αύξησης των αποικιών για τα διαφορετικά στελέχη. Στο υπόστρωμα παρουσία μηλικού οξέος και τα τρία στελέχη εμφάνισαν την ίδια συμπεριφορά, δηλαδή η διάμετρος των αποικιών αυτών των βακτηριακών στελεχών αυξήθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο με τον ίδιο ρυθμό. Το ίδιο παρατηρήθηκε όταν τα βακτηριακά στελέχη επωάστηκαν σε υπόστρωμα παρουσία κιτρικού οξέος, δηλαδή και σε αυτή την περίπτωση οι αποικίες αναπτύχθηκαν με τον ίδιο ρυθμό σε συνάρτηση με το χρόνο. Όμως όταν το κάθε στέλεχος ξεχωριστά συγκρίθηκε ταυτόχρονα για το μηλικό οξύ και το κιτρικό οξύ, όλα παρουσίασαν μεγαλύτερη ανάπτυξη στα τρυβλία με υπόστρωμα που περιείχε μηλικό οξύ. Από τη στιγμή που τα βακτήρια αναπτύχθηκαν κάτω από τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση υποστρώματος σε άγαρ), σαν μοναδικός παράγοντας που επηρέασε την αύξηση αυτών των αποικιών φαίνεται να είναι το είδος του οργανικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης.

Σύμφωνα με τις μελέτες των Westby *et al.* (1983) το *A. lipoferum* μπορεί να χρησιμοποιήσει είτε σάκχαρα είτε οργανικά οξέα ως πηγές άνθρακα και ενέργειας. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι το μηλικό οξύ είναι εξαιρετική πηγή άνθρακα για τα βακτήρια. Στα πειράματα αυτής της εργασίας αυτό επιβεβαιώνεται με τη μεγαλύτερη διάμετρο που παρουσιάζουν οι αποικίες στα τρυβλία με μηλικό οξύ. Οι διαφορές μεταξύ μηλικού και κιτρικού οξέος, μπορεί να οφείλονται στο ότι ο καταβολισμός κάποιας πηγής άνθρακα από τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι εξαρτώμενος από το στέλεχος.



Από τη στιγμή που τα στελέχη A, H2 και 4a2 μπορούν να κινούνται σε υποστρώματα παρουσία μηλικού ή κιτρικού οξέος, σημαίνει ότι τα στελέχη έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν και τις δύο πηγές και να καταφέρνουν να επιβιώσουν στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

Επίσης, η χρήση οργανικών οξέων ως πηγή άνθρακα μεταβάλλει το pH του μέσου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Madi και Henis, 1989) λειτουργώντας ανασταλτικά στην αύξηση των βακτηρίων. Επομένως, η μικρότερη διάμετρος των αποικιών στο κιτρικό οξύ για το παρόν πείραμα μπορεί να οφείλεται σε αυτή τη μεταβολή του pH στη διάρκεια του χρόνου.

Το στέλεχος A του βακτηρίου *A. lipoferum* μετά από επώαση σε τρυβλία με υπόστρωμα στο οποίο υπήρχε το αντιβιοτικό ριφαμπικίνη σε δύο συγκεντρώσεις 50 mg/ml και 100 mg/ml, έδωσε αποικίες ανθεκτικές στο αντιβιοτικό με διαφορετικό μέγεθος μεταξύ τους, στον ίδιο χρόνο επώασης. Πιθανόν, η εμφάνιση διαφορετικού μεγέθους στις αποικίες, να συνδέεται με το διαφορετικό βαθμό ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα νέα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσία αυτού του αντιβιοτικού. Από πειράματα των Jatsenko *et al.* (2010) διαπιστώθηκε ότι μεταλλαγμένα στελέχη του *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas putida*, τα οποία σχηματίζουν μικρές και μεγάλες αποικίες σε υποστρώματα παρουσία ριφαμπικίνης, οφείλεται σε διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα μεταλλάγματα στο αντιβιοτικό. Δηλαδή, οι μικρές αποικίες καθυστερούν να εμφανίσουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό (48 ώρες) σε αντίθεση με τις μεγάλες οι οποίες εκφράζουν την ανθεκτικότητα μέσα σε 24 ώρες.

Τα πειράματα που ακολούθησαν σχετικά με την ομαδική κίνηση έδειξαν ότι τα ανθεκτικά στελέχη στη ριφαμπικίνη παρουσίασαν σχετικά παρόμοια ανάπτυξη μεταξύ τους. Τα στελέχη που απομονώσαμε από τις μεγάλες αποικίες εμφάνισαν σχετικά μεγαλύτερη ανάπτυξη από αυτά που απομονώθηκαν από μικρές αποικίες. Βέβαια οι διαφορές μεταξύ τους είναι πολύ μικρές χωρίς ιδιαίτερη στατιστική σημαντικότητα.

Παρατηρώντας την ομαδική κίνηση και στα τέσσερα μεταλλαγμένα στελέχη μαζί με το στέλεχος A αγρίου τύπου σε υπόστρωμα NB τα 2.50 και 1.100, δηλαδή αυτά που προέρχονται από μικρές αποικίες εμφάνισαν μικρότερη ανάπτυξη σε σχέση με τα 2.100, 1.50 και το στέλεχος αγρίου τύπου. Τα τελευταία είχαν σχεδόν την ίδια ανάπτυξη μεταξύ τους. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν τα βακτήρια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με υπόστρωμα NB παρουσία ριφαμπικίνης. Οι αποικίες είχαν σχεδόν το ίδιο μέγεθος όπως και σε υπόστρωμα απουσία ριφαμπικίνης. Και σε αυτή την περίπτωση τα μεταλλαγμένα

στελέχη 2.50 και 1.100 ανέπτυξαν αποικίες μικρότερης διαμέτρου από τα στελέχη 2.100, 1.50 και αγρίου τύπου. Πιθανόν αυτή η διαφορά στην ανάπτυξη της αποικίας να οφείλεται στο ότι οι αποικίες αυτές προέρχονται από βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν από αποικίες, ανθεκτικές στη ριφαμπικίνη, διαφορετικού μεγέθους. Δηλαδή, όσα προέρχονται από αποικίες μικρού μεγέθους παρουσιάζουν λιγότερη ανθεκτικότητα με αποτέλεσμα να καθυστερεί η ανάπτυξη (Jatsenko *et al.*, 2010).

Οι μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των βακτηρίων είναι ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας ώστε οι οργανισμοί αυτοί να ανταπεξέρχονται από τη δράση των αντιβιοτικών (Turpin *et al.*, 2010). Η συχνότητα μεταλλάξεων επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού (Jatsenko *et al.*, 2010). Στην παρούσα μελέτη ο αριθμός των μεταλλάξεων ήταν περίπου ο ίδιος και στις δύο συγκεντρώσεις ριφαμπικίνης. Δεν παρατηρήθηκαν περισσότερες μεταλλάξεις υπό την επίδραση μεγαλύτερης συγκέντρωσης ριφαμπικίνης (100 mg/ml) ή το αντίστροφο. Επίσης, δε φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των μεταλλάξεων και του μεγέθους της αποικίας από την οποία προέρχονται τα βακτήρια, αφού για κάθε ανθεκτική μορφή του βακτηρίου έχει συμβεί περίπου ο ίδιος αριθμός μεταλλάξεων.

Οι μεταλλάξεις των βάσεων και κατά συνέπεια των κωδικονίων στα οποία ανήκουν, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορετικών αμινοξέων κατά τη μετάφραση των αλληλουχιών. Το νέο μεταλλαγμένο γονίδιο *groB* έχει αρκετές ομοιότητες στις μεταλλάξεις και με άλλα βακτήρια (*Pseudomonas aeruginosa* και *Escherichia coli*) για το ίδιο γονίδιο. Περισσότερες ομοιότητες εμφανίστηκαν με το είδος *P. aeruginosa*. Συγκρίνοντας τα διαφορετικά είδη μεταξύ τους εντοπίζονται αρκετές συντηρημένες περιοχές (Παράρτημα Β').

Από το μεγάλο πλήθος της διαθέσιμης σήμερα βιβλιογραφίας, είναι σαφές ότι η αλληλεπίδραση των *Azospirillum* με τα φυτά είναι ένα φυσικό φαινόμενο το οποίο εμφανίζεται σε ένα μεγάλο εύρος φυτών. Οι μελέτες που βασίζονται στη δράση των βακτηρίων αυτών θα πρέπει να συνεχιστούν αφού φαίνεται να έχουν θετικές επιδράσεις στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Επίσης η αξιολόγηση και βελτιστοποίηση των επιπτώσεων που έχουν στα φυτά και στη βιοποικιλότητα του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται είναι πολύ σημαντική. Παρά τις εξελίξεις στη βιοτεχνολογική χρήση των *Azospirillum* ως εμβόλια ή βιολογικά λιπάσματα, θα πρέπει να γίνει βελτιστοποίηση και ολοκληρωμένη μελέτη των επιπτώσεων της εφαρμογής αυτών των βακτηρίων. Οι προοπτικές της τεχνολογίας αυτής είναι πολλά υποσχόμενη, λόγω του χαμηλού κόστους και

της αποφυγής μόλυνσης του περιβάλλοντος σε αντίθεση με τα χημικά λιπάσματα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ντούνη Ε., (2010). Εργαστηριακές ασκήσεις βιοτεχνολογίας, Τμήμα γεωπονικής βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών.

Τζάμος Ε. (2007), Φυτοπαθολογία Β΄ Έκδοση. Αθήνα, Εκδ. ΑΘ. ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ.

Ahemad, M. and Khan M.S., (2012). Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi J. Biol. Sci.* 19: 451–459.

Ahemad M. and Khan M.S., (2011). *Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances growth parameters of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. *J. Pest Sci.* 84: 123–131.

Ahemad M. and Khan M.S., (2010). Phosphate-solubilizing and plantgrowth-promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves greengram performance in quizalafop-p-ethyl and clodinafop amended soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 361–372.

Akbulut M., Belman N., Golan Y., Israelachvili J., (2006). Frictional properties of confined nanorods. *Adv. Mater.*, 18: 2589 –2592.

Alberti L., Harshey R.M., (1990). Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into Swimmer and Swarmer Cells. *J. Bacteriol.*, 4322-4328.

Alhashin A. and Attitala I., (2011). Traits Biologically Interacting *Azospirillum Lipoferum* Strain R<sub>23</sub>, *IDOSI Publ.*, 5(2):103-110.

Anjum M.A., Sajjad M.R., Akhtar N., Qureshi M.A., Iqbal A., Rehman J.A. and Mahmud-ul-Hasan (2007). Response of cotton to plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation under different levels of nitrogen. *J. Agric. Res.*, 45: 135–143.

Antoun H. and Pre´vost D., 2005. Ecology of plant growth promotingrhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *PGPR: biocontrol andbiofertilization*, Springer, Dordrecht, 1–38.

Artsimovitch, I. and Vassilyev D., (2006). Is it easy to stop RNA polymerase? *Cell Cycle*, 5: 399–404.

Artsimovitch, I., Vassilyeva M.N., Svetlov D., Svetlov V., Perederina A., Igarashi N., Matsugaki N., Wakatsuki S., Tahirov T.H. and Vassilyev D.G., (2005). Allosteric modulation of the RNA polymerase catalytic reaction is an essential component of transcription control by rifamycins. *Cell*, 122: 351–363.

Bachmann B.O., Van Lanen S.G. and Baltz R.H., (2014). Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 175–184.

Badri D.V., Weir T.L., van der Lelie D. and Vivanco J.M., (2009). Rhizosphere chemical

dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6): 642–650.

Badri D.V. and Vivanco J. M., (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 32(6): 666–681.

Baltz R.H., (2011). Strain improvement in actinomycetes in the postgenomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 657–666.

Bashan Y. and de-Bashan L.E., (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth - A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 108: 77-136.

Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E., (2004). *Azospirillum*-Plant Relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 50:521-577.

Bashan Y. and Levanony H., (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation Technology as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*, 36: 591-608.

Belas R., Schneider R. and Melch M., (1998). Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: identification of *rsbA*, encoding a regulator of swarming behavior. *J. Bacteriol.*, 180: 6126–6139.

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

Bergval I.L., Klatser P.R., Schuitema A.R.J., Oskam L. and Anthony R.M., (2007). Specific mutations in the *Mycobacterium tuberculosis* *rpoB* gene are associated with increased *dnaE2* expression. *FEMS Microbiol. Lett.*, 275: 338–43.

Bhattacharyya P.N. and Jha D.K., (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327–1350.

Bhattacharyya P.N. and Jha D.K., (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microb. Biot.* 28: 1327-1350.

Bishop P.E., Jorgerger R.D., (1990). Genetics and molecular biology of an alternative nitrogen fixation system. *Plant Mol. Biol.*, 41: 109–125.

Boddey R.M. and Dobereiner J., (1988). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. *Plant soil* , 18: 53-65.

Caiazza N.C., Shanks R.M., O'Toole G.A., (2005). Rhamnolipids modulate swarming patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 187: 7351–7361.

- Campbell E.A., Korzheva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A. and Darst S.A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104: 901–12.
- Chen M. and Alexander M., (1973). Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. *Soil Biol. Biochem.*, 5: 213-221.
- Chen R., Guttenplan S.B., Blair K.M., Kearns D.B., (2009). Role of the  $\sigma^D$ -dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity. *J Bacteriol.*, 191: 5775–5784.
- Copeland M.F., Flickinger S.T., Tuson H.H. and Weibel D.B. (2010). Studying the dynamics of flagella in multicellular communities of *Escherichia coli* by using biarsenical dyes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 1241–1250.
- Dabbs E., Yazawa K., Tanaka Y., Mikami Y., Miyaji M., Andersen S., Morisaki N., Iwasaki S., Shida O., Takagi H. and Kadowaki K., (1995). Rifampicin inactivation by *Bacillus* species. *J. Antibiot.*, 48: 815–9.
- Dakora F.D. and Phillips D.A., (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245: 35–47.
- Dean D.R. and Jacobson M.R., (1992). Biochemical genetics of nitrogenase. In: Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J. (Eds.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, 763–834.
- Déziel E., Lépine F., Milot S., Villemur R., (2003). rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology.*, 149: 2005–2013.
- Doi R.H., Brown L.R., Rodgers G. and Hsu Y., (1970). *Bacillus subtilis* mutant altered in spore morphology and in RNA polymerase activity. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 66: 404–410.
- Eckert B., Weber O.B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M. and Hartmann A., (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 17-26.
- Eckford R., Cook F.D., Saul D., Aislabie J., Foght J. (2002) Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5181–5185.
- Figueiredo M.V.B., Seldin L., Araujo F.F. and Mariano R.L.R., (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag, 21–42.
- Flatten I., Morigen K. and Morigen S., (2009). DnaA protein interacts with RNA polymerase and partially protects it from the effect of rifampicin. *Mol. Microbiol.*, 71: 1018–30.
- Floss H.G., Yu T.W., (2005). Rifamycin—mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem. Rev.*, 105: 621–32.

- Fraser G.M. and Hughes C., (1999). Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2(6): 630-5.
- Garibyan L., Huang T., Kim M., Wolff E., Nguyen A., Nguyen T., Diep A., Hu K., Iverson A., Yang H. and Miller J.H., (2003). Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair (Amst)*, 2: 593–608.
- De Gennes PG. 1985. Wetting: statics and dynamics. *Rev. Mod. Phys.*, 57: 827–863.
- Gholami A., Shahsavani S. and Nezarat S., (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *Int. J. Biol. Life Sci.*, 1: 35–40.
- Gininov K., Soushko M., Goldfarb A., Nikiforov V., (1993). Rifampicin region revisited. New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 268: 14820–5.
- Glick B.R., (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, 2012: 963401.
- Glick B.R., (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2): 109–117.
- Glick B.R., Patten C.L., Holguin G. and Penrose D.M., (1999). *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Imperial College Press, London, UK.
- Goldstein B.P., (2014). Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics*, 67: 625–630.
- Gottschalk G., (1986). *Bacterial Metabolism Series: Springer Series in Microbiology*, 2nd ed., XIII, 359
- Halbleib CM. and Ludden P.W., (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *J Nutr.*, 130(5): 1081-4.
- Harshey R.M. and Matsuyama T., (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8631-8635.
- Hartman A. and Baldani J.I., (2006). The genus *Azospirillum*. In: Dworkin M., Flaknow S., Rosemberg E., Schleifer K.H., Stackerbrandt E. (eds). *The prokaryotes*, vol. 5, 3rd edn. Springer, New York, 115–140.
- Hauck Y., Fabre M., Vergnaud G., Soler C. and Pourcel C., (2009). Comparison of two commercial assays for the characterization of *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and description of new mutations conferring weak resistance to rifampicin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 64: 259–262.
- Heep M., Brandstatter B., Rieger U., Lehn N., Richter E., Rusch-Gerdes S., (2001). Frequency

of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 107–110.

Henrichsen J., (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.*, 36(4): 478-503.

Hiramatsu F., Wakita J.I., Kobayashi N., Yamakazi Y., Matsushita M., Matsuyama T., (2005). Patterns of expansion produced by a structured cell population of *Serratia marcescens* in response to different media. *Microbes Environ.*, 20: 120–125.

Hoening J.F.M., (1964). Cellular changes accompanying the swarming of *Proteus mirabilis*. I. Observation of living cultures. *Can. J. Microbiol.*, 10: 1–9.

Hu H., Zhang Q. and Ochi K., (2002). Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the rpoB gene (encoding the RNA polymerase  $\beta$  subunit) of *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.*, 184: 3984–3991.

Imai T., Watanabe K., Mikami Y., Yazawa K., Ando A., Nagata Y., Morisaki N., Hashimoto Y., Furihata K. and Dabbs E.R., (1999). Identification and characterization of a new intermediate in the ribosylative inactivation pathway of rifampin by *Mycobacterium smegmatis*. *Microb. Drug Resist.* 5: 259–64.

Inaoka T., Takahashi K., Yada H., Yoshida M. and Ochi K., (2004). RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-neotrehalosadiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 279: 3885–92.

Ishikawa J., Chiba K., Kurita H., Satoh H., (2006). Contribution of rpoB2 RNA polymerase subunit gene to rifampin resistance in *Nocardia* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50: 1342–6.

Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T. and Hattori M., (2004). The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101: 14925–30.

Jahanian A., Chaichi M.R., Rezaei K., Rezayazdi K. and Khavazi K., (2012). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). *Int. J. Agric. Crop Sci.*, 4: 923–929

Jatsenko T., Tover A., Tegova R. and Kivisaar M., (2010). Molecular characterization of Rif<sup>r</sup> mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutation Research* 683: 106-114.

Jin D.J. and Gross C.A. (1999). Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin resistant rpoB mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 171: 5229–5231.

Jin D.J. and Gross C.A. (1991). RpoB8, a rifampicin-resistant termination-proficient RNA polymerase, has an increased  $K_m$  for purine nucleotides during transcription elongation. *J. Biol. Chem.*, 266: 14478–85.



- Jin D.J., Walter W.A. and Gross C.A., (1988). Characterization of the termination phenotypes of rifampicin-resistant mutants. *J. Mol. Biol.*, 202: 245–53.
- Jin D.J., Cashel M., Friedman D.I., Nakamura Y., Walter W.A. and Gross C.A., (1988). Effects of rifampicin resistant *rpoB* mutations on antitermination and interaction with *nusA* in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 204 247–261.
- Jones D.L. and Hinsinger P., (2008). The rhizosphere: complex by design. *Plant and Soil*, 312(1-2): 1-6.
- Kageyama A., Yazawa K., Ishikawa J., Hotta K., Nishimura K. and Mikami Y., (2004). Nocardial infections in Japan from 1992 to 2001, including the first report of infection by *Nocardia transvalensis*. *Eur. J. Epidemiol.*, 19: 383–9.
- Kapulnik Y., J. Kigel Y. Okon I. Nur, and Y. Henis., (1981). Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant Soil*, 61: 65-70.
- Kang B.G., Kim W.T., Yun H.S. and Chang S.C., (2010). Use of plantgrowth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnol. Rep.* 4: 179–183.
- Kawamura N., Kurokawa K., Ito T., Hamamoto H., Koyama H., Kaito C. and Sekimizu K., (2005). Participation of Rho-dependent transcription termination in oxidative stress sensitivity caused by an *rpoB* mutation. *Genes Cells*, 10: 477–87.
- Kearns D.B. and Losick R., (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 49: 581–590.
- Kearns D.B., (2010). A field guide to bacterial swarming motility, *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(9): 634-644.
- Kearns D.B. and Losick R. (2005). Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 19(24): 3083-94.
- Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.D. and Kaiser P., (1989). *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*, 140: 679-693.
- Kim J. and Rees D.C., (1994). Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, 33: 389–397.
- Kloepper, J.W., (1994). Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: Okon, Y. (Ed.), *Azospirillum/Plant Associations*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 111–118.
- Kloepper J.W., Zablotowick R.M., Tipping E.M. and Lifshitz R., (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.), *The Rhizosphere and Plant Growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 315–326.

Kohler T., Curty L.K., Barja F., van Delden C. and Pechere J.C., (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol.*, 182: 5990–5996.

Krieg N.R. and Döbereiner J., (1984). Genus *Azospirillum*. In: N.R. Krieg, Editor, *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, 94 - 101.

Ladha J.K., de Bruijn F.J. and Malik K.A., (1997). Introduction: assessing opportunities for nitrogen fixation in rice-a frontier project. *Plant Soil* 124: 1–10.

Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A. and Grabovich M., (2010). *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60(12): 2832-7.

Lin S.Y., Liu Y.C., Hameed A., Hsu Y.H., Lai W.A., Shen F.T. and Young C.C., (2013). *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63(10): 3762-3768.

Lin S.Y., Shen F.T., Young L.S., Zhu Z.L., Chen W.M. and Young C.C., (2012). *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62(5):1185-90.

Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.M., Lai W.A., Shen F.T., Rekha P.D. and Yassin A.F., (2009). *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59: 761-5.

Lindow S.E. and Brandl M.T., (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1875-1883.

List No. 39, (1991). Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *Int J Syst. Bacteriol.*, 41(4):580–581.

Lynch J. M., (1990). In: *The Rhizosphere* (Ed. Lynch J.M.), Wiley-Interscience publication, 177-207.

Madigan M., Martinko J. & Parker J. (2007). *BROCK, Βιολογία των Μικροοργανισμών (Τόμος I)*. Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδ. Κρήτης.

Madigan M., Martinko J. & Parker J. (2007). *BROCK, Βιολογία των Μικροοργανισμών (Τόμος II)*. Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδ. Κρήτης.

Mary P., Ochin D. and Tailliez R., (1985). Rates of drying and survival of *Rhizobium meliloti* strains during storage at different relative humidities. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 207-211.

Massena Reis V., dos Santos Teixeira K.R. and Pedraza R.O., (2011). What is expected from the genus *Azospirillum* as a Plant Growth-Promoting Bacteria. Chapter 6 in: Maheshwari D.K. (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 123-138.

Matsuyama T. and Matsushita M., (2001). Population Morphogenesis by Cooperative Bacteria. *Forma*, 16(4):307-326.

Matsuyama T., Takagi Y., Nakagawa Y., Itoh H., Wakita J. and Matsushita M., (2000). Dynamic aspects of the structured cell population in swarming colony of *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.*, 182: 385–393.

Matsuyama T., Kaneda K., Nakagawa Y., Isa K., Hara-Hotta H. and Yano I., (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 174(6): 1769–1776.

McBride M.J. (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 49-75.

Magalhães F.M., Baldani J.I., Souto S.M., Kuykendall J.R. and Dobereiner J., (1983). A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Brasil.*, 55:417-430.

Mehnaz S., Weselowski B. and Lazarovits G., (2007a). *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 620-4.

Mehnaz S., Weselowski B. and Lazarovits G., (2007b). *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2805-9.

Merino S., Shaw J.G. and Tomas J.M., (2006). Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol. Lett.*, 127-135.

Mirza M., Ahmad W., Latif F., Haurat J., Bally R., Normand P. and Malik K.A. (2001). Isolation, partial characterization and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant Soil*, 237:47-54.

Morishita T. and Yura T., (1976). Altered nutritional requirements associated with mutations affecting the structures of ribonucleic acid polymerase in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.*, 125: 416–422.

Morrison R.B. and Scott A., (1966). Swarming of *Proteus*—a solution to an old problem. *Nature.*, 211: 255–257.

Moutia J.F.Y., Saumtally S., Spaepen S. and Vanderleyden J., (2010). Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant Soil*, 337: 233-242.

Munees A. and Mulugeta K., (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26: 1-20.

Nardi S., Concheri G., Pizzeghello D., Sturaro A., Rella, R. and Parvoli G., (2000). Soil organic

matter mobilization by root exudates. *Chemosphere* 5: 653–658.

Newell K.V., Thomas D.P., Brrekasis D., Paget M.S., (2006). The RNA polymerase-binding protein RbpA confers basal levels of rifampicin resistance on *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*, 60: 687–96.

Niu C., Graves J.D., Mokuolu F.O., Gilbert S.E. and Gilbert E.S., (2005). Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *J. Microbiol. Methods*, 62: 129–132.

Nosko P., Bliss L.C. and Cook F.D., (1994). The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of high Arctic graminoids. *Arctic Alpine Res* 26: 180–186.

Ochi K. and Hosaka T., (2013). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97: 87–98.

Ochi K., Tanaka Y. and Tojo S., (2014). Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41: 403–414.

Okon Y., Heytler P.G. and Hardy R.W.F., (1983). N<sub>2</sub> Fixation by *Azospirillum brasilense* and Its Incorporation into Host *Setaria italic*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(3): 694–697.

Peng G., Wang H., Zhang G. Hou W., Liu Y., Wang E.T., and Tan Z., (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 1263-71.

Perkins, A.E. and Nicholson W.L., (2007). Uncovering new metabolic capabilities of *Bacillus subtilis* using phenotypic profiling of rifampin-resistant *rpoB* mutants. *J. Bacteriol.* 190: 807–814.

Ramaswamy S. and Musser J.M., (1998). Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber. Lung. Dis.*, 79: 3–29.

Rauprich O., Matsushita M., Weijer C.J., Siegert F., Esipov S.E., Shapiro J.A., (1996). Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *J. Bacteriol.*, 178: 6525–6538.

Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R. and Blankenship R.E., 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21: 541–554.

Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thieleivians S. and Ley Z., (1987). *Azospirillum halopraeferens* sp. nov. a Nitrogen-Fixing Organism Associated with Roots of Kallar Grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth]. *IJSB*, 37: 43-51.

Reinhold R., Hurek T., Baldani I., Dobereiner J., (1988). Temperature and salt tolerance of *Azospirillum spp.* from salt affected soil in Brazil. In *Azospirillum IV: Genetics, Physiology, Ecology*, ed. by Klingmuller, W., Springer Verlag, Berlin, 234–241

Reis jr F.B., Silva M.F., Teixeira K.R.S., Urquiaga S., Reis V.M., (2006). Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. Rev. Bras. Cie^n Solo 28: 103–113.

Remans R., Beebe S., Blair M., Manrique G., Tovar E., Rao I., Croonenborgh, A., Torres-Gutierrez R., El-Howeity M., Michiels J. and Vanderleyden J., (2008). Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Soil, 302: 149–161.

Rodrigues E.P., Rodrigues L.S., de Oliveira A.L.M., Baldani V.L.D., Teixeira K.R.S., Urquiaga S. and Reis V.M., (2008). *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil, 302: 249–261.

Rogozin I.B. and Pavlov Y.I., (2003). Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. Mutat. Res., 544(1): 65-85.

Rubio L.M. and Ludden P.W., (2008). Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Annu. Rev. Microbiol. 62: 93–111.

Sachdev D.P., Chaudhari H.G., Kasure V.M., Dahavale D.D. and Chopade B.A., (2009). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. Indian J. Exp. Biol., 47: 993–1000.

Saharan B. and Nehra V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Sci. Med. Res., 21: 1-30.

Sat B., Hazan R., Fisher T., Khaner H., Glaser G. and Engelberg-Kulka H., (2001). Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger mazEF lethality. J. Bacteriol. 183: 2041–2045.

Saubidet M.I. and Barneix A.J., (1998). Growth stimulation and nitrogen supply to wheat plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. J. Plant. Nutr., 21: 2565–2577.

Schaal K.P. and Lee H-J., (1992). Actinomycete infections in humans—a review. Gene, 115: 201–11.

Sensi P., Greco A.M. and Ballotta R., (1959). Rifomycin I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. Antibiot Annu., 7: 262–70.

Severinov K., Soushko M., Goldfarb A. and Nikiforov V., (1994). RifR mutations in the beginning of the *Escherichia coli* rpoB gene. Mol. Gen. Genet., 244: 120–6.

Severinov K., Soushko M., Goldfarb A., Nikiforov V. (1993). Rifampicin region revisited. Newrifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Biol. Chem., 268: 14820–5.

Schoenborn L., Yates P. S., Grinton B. E., Hugenholtz P. and Janssen P.H., (2004). Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7): 4363–4366.

Sharma S.K., Johri B.N., Ramesh A., Joshi O.P. and Prasad S.V.S., (2011). Selection of plant growth-promoting *Pseudomonas* spp. that enhanced productivity of soybean-wheat cropping system in central India. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 1127–1142.

Shimada H., Ikeda T., Wakita J.I., Itoh H., Kurosu H., Hiramatsu F., Nakatsuchi M., Yamazaki Y., Matsuyama T. and Matsushita M., (2004). Dependence of local cell density on concentric ring colony formation by bacterial species *Bacillus subtilis*. *J. Phys. Soc. Japan.*, 73: 1082–1089.

Shivani T. and Dileep Kumar S., (2014). *Azospirillum himalayense* sp. nov., a nifH bacterium isolated from Himalayan valley soil, India. *Annals of Microbiol.*, 64(1): 259-266.

Siddiqi N., Das R., Pathak N., Banerjee S., Ahmed N., Katoch V.M. and Hasnain S.E., (2004) Mycobacterium tuberculosis isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection*, 32: 109–111.

Sivasakthivelan P. and Saranraj P., (2013). *Azospirillum* and its formulations: A Review. *International Journal of Microbiological Research*, 4(3): 275-287.

Sly L.I. and Stackebrandt E., (1999). Description of *Sermanella parooensis* gen. nov., to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *IJSB*, 49: 541.

Soberón-Chávez G., (2011). *Biosurfactants: From Genes to Applications*. New York, Pub. Springer.

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

Sonenshein A.L., Cami B., Brevet J. and Cote R. (1974). Isolation and characterization of rifampin-resistant and streptolydigin-resistant mutants of *Bacillus subtilis* with altered sporulation properties. *J. Bacteriol.*, 120: 253–65.

Stratton C.W., (2003). Dead bugs don't mutate: susceptibility issues in the emergence of bacterial resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 10–16.

Tanaka, Y., Kasahara K., Hirose, Murakami K., Kugimiy R. and Ochi K., (2013). Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 195: 2959–2970.

Tanaka Y., Yazawa K., Dabbs E., Nishikawa K., Komaki H., Mikami Y., Miyaji M., Morisaki N., and Iwasaki S., (1996). Different rifampicin inactivation mechanisms in *Nocardia* and related taxa. *Microbiol. Immunol.*, 40: 1-4

Tarrand J.J., Krieng N.R. and Döbereiner J., (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species,

- Azospirillum lipoferum* (Beigerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol., 24: 967-980.
- Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T., (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 341: 647–50.
- Thakuria D., Talukdar N.C., Goswami C., Hazarika S., Boro R.C. and Khan M.R., (2004). Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. Curr. Sci., 86: 978–985.
- Tien T.M., Gaskin M.H. and Hubbel D.H., (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol., 37(5): 1016-1024.
- Trampuz A. and Zimmerli W., (2005). New strategies for the treatment of infections associated with prosthetic joints. Curr. Opin. Investig. Drugs, 6: 185–190.
- Tremblay J., Richardson A.P., Lepine F. and Déziel E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behavior. Environ. Microbiol., 9: 2622–2630.
- Trudiger P.A. and Bud B., (1967). Microorganisms and the natural environment. Mineralium Deposita, 2(3): 147-157.
- Tupin A., Gualtieri M., Roquet-Banères F., Morichaud Z., Brodolin K. and Leonetti JP., (2010). Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. International Journal of Antimicrobial Agents, 35: 519-523.
- Turner L., Zhang R., Darnton N.C. and Berg H.C., (2010). Visualization of flagella during bacterial swarming. J. Bacteriol., 192: 3259–3267.
- Vassilyev D.G., Vassilyeva M.N., Perederina A., Tahirov T.H. and Artsimovitch I., (2007). Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. Nature, 448: 157–62.
- Vessey J.K., (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571-586.
- Vigliotta G., Tredici S.M., Damiano F., Montinaro M.R., Pulimeno R., di Summa R., Massardo D.R., Gnoni G.V. and Alifano P., (2005). Natural merodiploidy involving duplicated rpoB alleles affects secondary metabolism in a producer actinomycete. Mol. Microbiol., 55: 396–412.
- Villain-Guillot P., Bastide L., Gualtieri M. and Leonetti J.P., (2007). Progress in targeting bacterial transcription. Drug Discovery Today, 12: 200-8.
- Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E. and Vivanco J.M., (2003). Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiol., 132: 44–51.

- Wauters G., Avesani V., Charlier J., Janssens M., Vaneechoutte M. and Delmee M., (2005). Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 2624–8.
- Wegrzyn, A., Szalewska-Pałasz A., Błaszczak A., Liberek K. and Wegrzyn G., (1998). Differential inhibition of transcription from s70- and s32- dependent promoters by rifampicin. *FEBS Lett.* 440: 172–174.
- Westby C.A., Cutshall D.S. and Vigil G.V., (1983). Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, 156: 1369–1372.
- Whipps J.M., (1990). Carbon utilization in the Rhizosphere. J.M. Lynch, Ed., 59–97.
- Williams F.D., Anderson. D.M., Hoffman P.S., Schwarzhoff R.H. and Leonard S., (1976). Evidence against the involvement of chemotaxis in swarming *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.*, 127: 237–248.
- Xie C.H and Yokota A., (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 1435-8.
- Yanofsky C. and Horn V. (1981). Rifampin resistance mutations that alter the efficiency of transcription termination at the tryptophan attenuator. *J. Bacteriol.*, 145: 1334–1341.
- Yim G., Huimi H.H. and Davies J., (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 362: 1195–200.
- Young J.P.W., (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (Ed), *Biological Nitr. Fix.*, 43-86.
- Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M.J., Arun A.B., Lai W.A., Rekha P.D., Shen F.T., Hung M.H., Chen W.M. and Yassin A.F., (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 959-63.
- Zahran H.H., (2001). Rhizobia from wild legumes: Diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnol.*, 91(2-3): 143-153.
- Zambrano E.R., Jimenez Salgado T., Tapia Hernandez A. (2007) Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1–2): 322–325.
- Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L. and Hu P., (2013). *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63(7): 2618-24.
- Zhou Y.N., Wei W., Wang X., Xu L. and Lai R., (2009). *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55(1): 1-7.
- Zhou Y.N. and Jin D.J., (1998). The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like ‘stringent’ RNA polymerases in *Escherichia coli*.



Proc. Natl Acad. Sci., 95: 2908–2913.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### α) Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των μεταλλαγμένων στελεχών με τα *E.coli* και *P. aeruginosa*

wt_azosp	GSSQLSQFVDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTR
2_50	GSSQLSQFMGQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTR
2_100	GSSQLSQFMDQNNPLSEITLKRRVSALGPGGLTR
1_50	GSSQLSQFMGQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTR
1_100	GSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTR
es.coli	GSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGGLTR
<i>P.aeruginosa</i>	GSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRVSALGPGGLTR *****:.****** ***:*****
wt_azosp	ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPJETPEGPNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVS
2_50	ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPJETPEGPNIGLINSLAAYARTSQYGFLESPYRVVKEGVVS
2_100	ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPJETPEGPNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVS
1_50	ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPJETPEGPNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVS
1_100	ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPJETPEGPNIGLINSLAAYARTNQYGFLESPYRVVKEGVVS
es.coli	ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPJETPEGPNIGLINSLSVYAQTNEYGFLETPYRKVTDGVVT
<i>P.aeruginosa</i>	ERAGFEVRDVHPTHYGRVCPJETPEGPNIGLINSLATYARTNKYGFLESPYRVVKDSLVT *****:***:.*:.*:.*:*****:*** *.:.:*:
wt_azosp	DDIVFLSAIEEADHVIA
2_50	DDIVFLSAIEEADHVIA
2_100	DDIVFLSAIEEADHVIA
1_50	DDIVFLPAIEEADHVIA
1_100	DDIVFLSAIEEADHVIA
es.coli	DEIHFLSAIEEGNYVIA
<i>P.aeruginosa</i>	DEIVFLSAIEEADHVIA *: * :*.****.:***

### β) Αντιστοίχιση νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας

#### WILD TYPE

tcgacatctaccgcgatcatgctccaggcgagccgcccgaaccaaggacgcccgcgagaccctg  
D I Y R V M R P G E P P T K D A A E T L  
ttcaacaacctgttcttcagcgcgagcgttacgatctgtccgcccgttgccgcatgaag  
F N N L F F S A E R Y D L S A V G R M K  
ttcaaccgctcgtatcggctcgtaccgagatcgagggttcgggctgctgagcaaggaagat  
F N R R I G R T E I E G S G V L S K E D  
atcgtcagaggtcctgaagaccctggctcgatatccgtaacggcaaaggcattgtcgcgac  
I V E V L K T L V D I R N G K G I V D D  
atcgaccacctgggtaaccgctcgcgcttcggttcggtcggcgagatggccgagaaccagttc  
I D H L G N R R V R C V G E M A E N Q F  
cgcgcttgccctggtgctgtagagcgcgcggtcaaggaacgtctgtcgcgatggcggaaagc  
R V G L V R V E R A V K E R L S M A E S  
gaaaggcctgatgcccgaagacctgatcaacgcccaagccggttgccgacggcgggtgaaaagag  
E G L M P Q D L I N A K P V A T A V K E  
ttcttcgggttcagccagctgtcccagttcgtggaccagaacaaccgctctccgagatc  
F F G S S Q L S Q F VD Q N N P L S E I  
accacaagcgcgctctctgcactcggccctggcggtctgaccctgtgagcgtgcccggc  
T H K R R V S A L G P G G L T R E R A G  
tttgaagtcctgacgtgcaccgacccactacggcctgtgtgcccgatcagagaccct  
F E V R D V H P T H Y G R V C P I E T P

gaaggtccgaacatcgggtctg~~atc~~aactccctggcagcctatgcccgcacc~~aac~~cagtac  
E G P N I G L **I** N S L A A Y A R T **N** Q Y  
ggcttcctggaaagcccgtaccgcgtggtgaaagaaggtgtggtcagcgacgacatcgtg  
G F L E S P Y R V V K E G V V S D D I V  
ttcctg~~tcg~~gccattgaagaagccgatcacggttatcgccc  
F L **S** A I E E A D H V I A

## 2:50

**tcgacatctaccgcgtcatgcgtccaggcgagccgcccaccaaggacgccgccgagaccctg**

D I Y R V M R P G E P P T K D A A E T L  
ttcaacaacctgttcttcagcgccgagcggttacgacctgtccgccgttggccgcatgaag  
F N N L F F S A E R Y D L S A V G R M K  
ttcaaccgctcgtatcggtcgtaccgagatcgagggctcgggcgtgctgagcaaggaagat  
F N R R I G R T E I E G S G V L S K E D  
atcgtcagaggtcctgaagaccctggtcgatatccgtaacggcaaaggcattgtcgcgac  
I V E V L K T L V D I R N G K G I V D D  
atcgaccacctgggtaaccgtcgcggttcggtgctcggcgagatggccgagaaccagttc  
I D H L G N R R V R C V G E M A E N Q F  
cgcggttgccctggtgcgtgtagagcgcgcggtcaaggaacgtctgtcgcgatggcggaaagc  
R V G L V R V E R A V K E R L S M A E S  
gaaggcctgatgccgcaagacctgatcaacgcccaagccggttgcg~~gcg~~gccggtgaaagag  
E G L M P Q D L I N A K P V A **A** A V K E  
ttcttcggttccagccagctgtcccagttc~~atggggc~~cagaacaaccgctctccgagatc  
F F G S S Q L S Q F **MG** Q N N P L S E I  
accacaagcgcgcgctctctgcactcggccctggcgggtctgacctgtgagcgtgctggc  
T H K R R V S A L G P G G L T R E R A G  
tttgaagtcggtgacgtgcacccgacccactacggcctgtgtgcccgatcgagaccct  
F E V R D V H P T H Y G R V C P I E T P  
gaaggtccgaacatcgggtctgatcaactccctggcagcctatgcccgcacc~~agc~~cagtac  
E G P N I G L I N S L A A Y A R T **S** Q Y  
ggcttcctggaaagcccgtaccgcgtggtgaaagaaggtgtggtcagcgacgacatcgtg  
G F L E S P Y R V V K E G V V S D D I V  
ttcctgtcggccattgaagaagccgatcacggttatcgccc  
F L S A I E E A D H V I A

## 2.100

**tcgacatctaccgcgtcatgcgtccaggcgagccgcccaccaaggacgccgccgagaccctg**

D I Y R V M R P G E P P T K D A A E T L  
ttcaacaacctgttcttcagcgccgagcggttacgatctgtccgccgttggccgcatgaag  
F N N L F F S A E R Y D L S A V G R M K  
ttcaaccgctcgtatcggtcgtaccgagatcgaggggtcgggcgtgctgagcaaggaagat  
F N R R I G R T E I E G S G V L S K E D  
atcgtcagaggtcctgaagaccctggtcgatatccgtaacggcaaaggcattgtcgcgac  
I V E V L K T L V D I R N G K G I V D D

atcgaccacctgggtaaccgctcgcggttcggttgcgacggcgagatggccgagaaccagttc  
I D H L G N R R V R C **D** G E M A E N Q F  
cgcgttggcctggtgctgtagagcgcgcggtcaaggaacgtctgtcgcgatggcggaaagc  
R V G L V R V E R A V K E R L S M A E S  
gaaggcctgatgccgcaagacctgatcaacgccaaagccggttgcggcggcggtgaaagag  
E G L M P Q D L I N A K P V A **A** A V K E  
ttcttcggttccagccagctgtcccagttcatggaccagaacaaccgctctccgagatc  
F F G S S Q L S Q F **M** D Q N N P L S E I  
accctcaagcgcgcgctctctgcactcggccctggcggtctgaccctgtagcgtgctggc  
T **L** K R R V S A L G P G G L T R E R A G  
tttgaagtccgtgacgtgcacccgacccactacggccgtgtgtgcccgatcgagaccct  
F E V R D V H P T H Y G R V C P I E T P  
gaaggctccgaacatcggctctgatcaactccctggcagcctatgcccgcaccaaccagtac  
E G P N I G L I N S L A A Y A R T N Q Y  
ggcttccctggaaagcccgtaccgctggtgaaagaaggtgtggtcagcgcacacatcgtg  
G F L E S P Y R V V K E G V V S D D I V  
ttcctgtcggccattgaagaagccgatcacgttatcgccc  
F L S A I E E A D H V I A

### 1.50

tcgacatctaccgctcatgctccagggcgagccgcccaccaaggacgccgcccagaccctg  
D I Y R V M R P G E P P T K D A A E T L  
ttcaacaacctgttcttcagcgcgagcgttacgatctgtccgcccgttggccgcatgaag  
F N N L F F S A E R Y D L S A V G R M K  
ttcaaccgctcgtatcggctcgtaccgagatcgaggggttcgggctgctgagcaaggaagat  
F N R R I G R T E I E G S G V L S K E D  
atcgtcgcaggtcctgaagaccctggctgatatccgtaacggcaaaggcattgtcgcacgac  
I V E V L K T L V D I R N G K G I V D D  
atcgaccacctgggtaaccgctcgcggttcggttgcgctcggcgagatggccgagaaccagttc  
I D H L G N R R V R C V G E M A E N Q F  
cgcgttggcctggtgctgtagagcgcgcggtcaaggaacgtctgtcgcacggcgaaagc  
R V G L V R V E R A V K E R L S **T** A E S  
gaggtcctgatgccgcaagacctgatcaacgccaaagccggttgcggcggcggtgaaagag  
E **V** L M P Q D L I N A K P V A **A** A V K E  
ttcttcggttccagccagctgtcccagttcatgggccagaacaaccgctctccgagatc  
F F G S S Q L S Q F **MG** Q N N P L S E I  
accacaagcgcgcgctctctgcactcggccctggcggtctgaccctgtagcgtgctggc  
T H K R R V S A L G P G G L T R E R A G  
tttgaagtccgtgacgtgcacccgacccactacggccgtgtgtgcccgatcgagaccct  
F E V R D V H P T H Y G R V C P I E T P  
gaaggctccgaacatcggctctgatcaactccctggcagcctatgcccgcaccaaccagtac  
E G P N I G L I N S L A A Y A R T N Q Y  
ggcttccctggaaagcccgtaccgctggtgaaagaaggtgtggtcagcgcacacatcgtg  
G F L E S P Y R V V K E G V V S D D I V

ttcctgcccggccattgaagaagccgatcacggttatcgccc

F L P A I E E A D H V I A

1.100

tcgacatctaccgcgatcatgcgtccaggcgagccgcccaccaaggacgcccggagaccctg

D I Y R V M R P G E P P T K D A A E T L

ttcaacaacctgttcttcagcgccgagcggttacgatctgtccgcccgttggccgcatgaag

F N N L F F S A E R Y D L S A V G R M K

ttcaaccgctcgtatcggctcgtaccgagatcgagggttcgggctgctgagcaaggaagac

F N R R I G R T E I E G S G V L S K E D

atcgtcgaggtcctgaagaccctggctcgatatccgtaacggcaaaggcattgtcgacgac

I V E V L K T L V D I R N G K G I V D D

atcgaccacctgggtaaccgctcgcgttcggttgcgtcggcgagatggccgagaaccagttt

I D H L G N R R V R C V G E M A E N Q F

cgcgttggcctggtgcgtgtagagcgcgcggtcaaggaacgtctgtcgatggcggaagc

R V G L V R V E R A V K E R L S M A E S

gaaggcctgatgccgcaagacctgatcatcgcccaagccggttgcggcggcggtgagagag

E G L M P Q D L I **I** A K P V A **A** A V R E

ttcttcggttcagccagctgtcccagttcatggaccagaacaaccgctctccgagatc

F F G S S Q L S Q F **M** D Q N N P L S E I

accacaagcgcgctctctgcactcggccctggcggtctgaccctgtagcgtgctggc

T H K R R V S A L G P G G L T R E R A G

tttgaagtcggtgacgtgcacccgacccactacggcctggtgtgcccgatcgagaccct

F E V R D V H P T H Y G R V C P I E T P

gaaggtcggaacatcggctctgttcaactccctggcagcctatgcccgcaccaaccagtac

E G P N I G L **F** N S L A A Y A R T N Q Y

ggcttcctggaaagcccgtaccgctggtgaaagaagggtgtggtcagcgacgacatcgtg

G F L E S P Y R V V K E G V V S D D I V

ttcctgctcggccattgaagaagccgatcacggttatcgccc

F L S A I E E A D H V I A