

ΑΝΩΤΑΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΣΩΤΟΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΣΤΗ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ

ΤΩΝ ΣΙΤΗΡΩΝ

ΥΠΟ

KRISTAQ SINI

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ

ΣΤΗΝ ΑΝΩΤΑΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

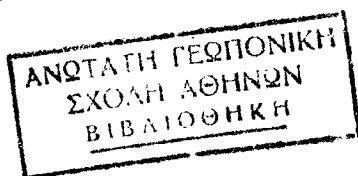
ΑΘΗΝΑ 1989

ΑΝΩΤΑΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΑΣΩΤΟΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΣΤΗ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ

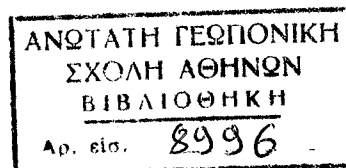
ΤΩΝ ΣΙΤΗΡΩΝ

ΥΠΟ

KRISTAQ SINI

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ



ΣΤΗΝ ΑΝΩΤΑΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ 1989

ΑΝΩΤΑΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής : Καθηγητής Κωνσταντίνος Μπαλής

Τ Ι Τ Λ Ο Σ

ΔΙΑΣΤΟΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΣΤΗ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ ΤΩΝ ΣΙΤΗΡΩΝ

ΥΠΟ

Κ Ρ Ι Σ Τ Α Ο Σ Σ Ι Ν Ι

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- |                          |           |
|--------------------------|-----------|
| 1. ΜΠΑΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ   | ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ |
| 2. ΚΟΥΓΕΑΣ ΒΕΝΕΤΣΑΝΟΣ    | ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ |
| 3. ΝΙΑΒΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ   | ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ |
| 4. ΚΑΡΑΜΑΝΟΣ ΑΝΤΡΕΑΣ     | ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ |
| 5. ΠΑΝΑΓΙΩΠΟΥΔΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ | ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ |

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβλήθηκε στην Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 1989

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιθυμώ να εκφράσω την βαθύτατη εκτίμηση και ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ.Κ.Μπαλή, για την υπόδειξη του θέματος και για το συνεχές ενδιαφέρον του, την καθοδήγησή του, την βοήθεια και τις ερευνητικές ευκολίες που μου παρείχε.

Στην διδάκτορα κ.Φ.Φλουρή εκφράζω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου για την τόσο σημαντική και πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε σ'όλα τα στάδια της εργασίας μου.

Ευχαριστώ επίσης την κ.Μ.Φραγκίσκου για την συμμετοχή της στην δακτυλογράφηση και επιμέλεια των σχημάτων και τον κ.Ι.Χατζηπαυλίδη για την βοήθεια που μου παρείχε σε ορισμένα στάδια των πειραμάτων.

Τέλος εκφράζω τις ευχαριστίες μου προς όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας για την συνεργασία και τη συμπαράσταση του, καθώς και στο προσωπικό του εργαστηρίου Γεωργίας για τα υλικά και τις πληροφορίες που έθεσε στη διάθεσή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

1. Γενικό μέρος.....	1
1.1. Εισαγωγή.....	1
1.2. Βιολογικά συστήματα δέσμευσης ατμοσφαιρικού αζώτου.....	5
1.3. Ριζοκοινωνία των <i>Azospirillum</i> .....	10
1.4. Ταξινόμηση των <i>Azospirillum</i> .....	13
1.5. Η εγκατάσταση στο ριζικό σύστημα.....	16
1.6. Απομόνωση των <i>Azospirillum</i> .....	19
1.7. Εξειδίκευση ξενιστών.....	21
1.8. Φυσιολογία των <i>Azospirillum</i> .....	25
1.9. Βιοχημεία της αζιτοδέσμευσης.....	35
1.10. Ανίχνευση της αζιτοδέσμευσης.....	37
1.11. Ο εμβολιασμός των σιτηρών με <i>Azospirillum</i> . Η σημασία των <i>Azospirillum</i> .....	42
1.12. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ <i>Azospirillum</i> και άλλων μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα των σιτηρών.....	45
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	48
2.1. Θρεπτικά υλικά.....	48
2.2. Απομόνωση ειδών του γένους <i>Azospirillum</i> .....	51
2.3. Μέθοδοι ταυτοποίησης των απομονώσεων στελεχών <i>Azospirillum</i> .....	53
2.3.1. Έλεγχος της ικανότητας χρησιμοποίησης γλυκόζης σαν μόνη πηγή άνθρακα.....	53
2.3.2. Έλεγχος των απαιτήσεων σε βιοτίνη.....	53
2.3.3. Διαφορά στον πλειομορφισμό μεταξύ <i>A. lipoferum</i> και <i>A. brasilense</i> .....	54
2.3.4. Αυξογραφική μέθοδος για μεμονωμένες πηγές άνθρακα.....	54
2.3.5. Παραγωγή οξέος σε θρεπτικό υλικό πεπτόνης-γλυκόζης.....	55

2.3.6. Ζυμωτική ικανότητα.....	55
2.4. Βιοχημικές δοκιμές χαρακτηριστικές των ειδών του γένους <i>Azospirillum</i> .....	56
2.4.1. Οξειδάση.....	56
2.4.2. Καταλάση.....	57
2.4.3. Υδρόλυση εσκουλίνης.....	57
2.4.4. Φωσφατάση.....	57
2.4.5. Ροζ χρωστική σε BMS άχαρ.....	57
2.4.6. Αναερόβια αύξηση με νιτρικά σε θρεπτικό υλικό πεπτόνης...	57
2.4.7. Υδρόλυση αμύλου.....	58
2.4.8. Ουρεάση.....	58
2.4.9. Υδρόλυση ζελατίνης.....	58
2.4.10. Δοκιμή υδρόλης.....	59
2.4.11. Ανάπτυξη σε 1% οξυχάλακτος.....	59
2.4.12. Ανάπτυξη σε παρουσία 3% NaCl.....	59
2.4.13. Δοκιμή Voges-Proskauer 2% γλυκόζης.....	59
2.4.14. Απονίτρωση.....	59
2.4.15. Παραγωγή οξέων από σάκχαρα.....	60
2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των <i>Azospirillum</i> ....	61
2.5.1. Επίδραση της πηγής άνθρακα.....	61
2.5.2. Επίδραση της απουσίας, παρουσίας αζώτου.....	61
2.5.3. Επίδραση της θερμοκρασίας.....	61
2.6. Η επίδραση της ποσότητας άνθρακα και της θερμοκρασίας στην αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα.....	62
2.7. Παραγωγή αυξητικών ουσιών και η επίδρασή τους στη βλάστηση μήκος ριζιδίων και κολεοπτίλων του σιταριού.....	63
2.8. Η επίδραση του εμβολιασμού με <i>Azospirillum</i> στην αύξηση του σιταριού.....	64

2.9. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ <i>Azospirillum</i> και <i>P. radicum</i> var. <i>graminicola</i> σε καθαρή καλλιέργεια.....	65
2.10. Επίδραση του υγρού καλλιέργειας του μύκητα <i>P. radicum</i> var. <i>graminicola</i> στην αύξηση των <i>Azospirillum</i> .	65
2.11. Ικανότητα χρησιμοποίησης της ασπαραγίνης και ασπαρτικού οξέος σαν πηγή άνθρακα.....	67
2.12. Η επίδραση των αλληλεπιδράσεων <i>Azospirillum-Phialophora</i> <i>radicum</i> var. <i>graminicola</i> στην αύξηση του σιταριού.....	67
3. Αποτελέσματα.....	69
3.1. Απομόνωση βακτηρίων του γένους <i>Azospirillum</i> .....	69
3.2. Ταυτοποίηση καλλιεργειών <i>Azospirillum</i> .....	70
3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των <i>Azospirillum</i> ....	78
3.3.1. Επίδραση της πηγής άνθρακα στην κινητική αύξησης των <i>Azospirillum</i> .....	79
3.3.2. Επίδραση της παρουσίας, απουσίας αζώτου στην κινητική αύξησης των <i>Azospirillum</i> .....	84
3.3.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην κινητική αύξησης των <i>Azospirillum</i> .....	88
3.4. Αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα των <i>Azospirillum</i> σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος και θερμοκρασία επίασης.....	93
3.5. Παραγωγή αυξητικών ουσιών και η επίδραση τους στη βλάστηση και το μήκος ριζιδίων και κολεοπτίλων του σιταριού.....	96
3.6. Η επίδραση του εμβολιασμού με <i>Azospirillum</i> στην αύξηση φυτών σιταριού.....	99
3.7. Η επίδραση του υπερκε(μένου υγρού καλλιέργειας του μύκητα <i>P. radicum</i> var. <i>graminicola</i> (ATCC 28231) στην αύξηση των <i>A. brasilense</i> (ATCC 29145) και <i>A. lipoferum</i> (ATCC 29707)....	105

3.8. Η χρησιμοποίηση της ασπαραγίνης και ασπαρτικού οξέος σαν πηγή άνθρακα από το <i>A. brasilense</i> και το <i>A. lipoferum</i> ...	110
3.9. Έλεγχος της ικανότητας χρησιμοποίησης της ασπαραγίνης σαν μόνη πηγή άνθρακα. ....	118
3.10. Απομόνωση βακτηρίου συνόδου του μύκητα <i>P. radiciticola</i> <i>var. graminicola</i> (ATCC 28231).....	119
3.11. Η συνέπεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των <i>Azospirillum</i> και <i>P. radiciticola var. graminicola</i> στην αύξηση του σιταριού.	123
4. Συζήτηση.....	127
5. Περίληψη.....	149
6. Βιβλιογραφία.....	152



## 1. Γενικό Μέρος

### 1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το άζωτο αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία για την ύπαρξη των έμβιων όντων στη γη. Στη φύση απαντάται είτε υπό μοριακή μορφή (σαν συστατικό του ατμοσφαιρικού αέρα σε ποσοστό 78% περίπου) είτε σε διάφορες ανόργανες και οργανικές ενώσεις.

Η μετατροπή του μοριακού N σε οργανικές ενώσεις στη φύση γίνεται με τη βιολογική δέσμευση του από μία εξειδικευμένη ομάδα προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Με τη σειρά τους οι οργανικές μορφές N, μετατρέπονται σε  $\text{NH}_3$  και  $\text{NO}_3^-$ , δηλαδή μεταπίπτουν σε ανόργανες μορφές. Η μετατροπή του σε  $\text{NH}_3$  ονομάζεται αμμωνιοποίηση. Η οξειδωση δε αυτής της ένωσης σε  $\text{NO}_3^-$  λέγεται νιτροποίηση. Η χρησιμοποίηση των  $\text{NH}_3$  και  $\text{NO}_3^-$  από τους μικροοργανισμούς εδάφους και τα φυτά συνιστά αντίστοιχα την ακινητοποίηση και αφομοίωση. Ο κύκλος ολοκληρώνεται με την επιστροφή αζώτου στην ατμόσφαιρα σαν μοριακό άζωτο με διεργασίες όπως η βιολογική απονιτρίωση. (Εικόνα 1).

Ο εμπλουτισμός του εδάφους σε άζωτο γίνεται μέσω της δέσμευσης του μοριακού N από μικροοργανισμούς και μέσω της επιστροφής της αμμωνίας και των νιτρικών με βρόχινα νερά. Οι απώλειες σε  $\text{N}_2$  επέρχονται μέσω της συσκομιδής των προϊόντων, απόπλυσης και εξάτμισης.

Οι κύριοι ρόλοι του αζώτου στην διατροφή του φυτού περιλαμβάνουν: 1. συστατικά στοιχεία της χλωροφύλλης, 2. συστατικά μέρη στα αμινοξέα, τα δομικά υλικά των πρωτεϊνών, 3. απαραίτητα υλικά για την χρησιμοποίηση των υδατανθράκων, 4. συστατικό στοιχείο των ενζύμων, βιταμινών και ορμονών, 5. διεγερτικός στην ανάπτυξη και δραστηριότητα των ριζών και 6. βοηθητικός στην κίνηση προς τα πάνω

άλλων θρεπτικών στοιχείων.

Η συνεχής κατανάλωση του εδαφικού αζώτου από τα φυτά συνεπάγεται την εξάντληση των αποθεμάτων αζώτου που υπάρχουν στο έδαφος. Ο ρυθμός με τον οποίο το άζωτο επιστρέφει στο έδαφος υπό μορφή νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων μετά τον θάνατο και αποσύνθεση των φυτών και των ζώων είναι μικρότερες από το ρυθμό χρησιμοποίησης του για την θρέψη των φυτών. Το γεγονός αυτό έχει μεγαλύτερη σημασία στην γεωργική πράξη, όπου με την συσκομιδή απομακρύνονται κάθε φορά μεγάλα ποσά αζώτου που δεν επιστρέφουν.

Στην γεωργική πράξη ο εφοδιασμός του εδάφους και των φυτών με άζωτο επιτυγχάνεται με την εφαρμογή αζωτούχων λιπασμάτων, κυρίως με την μορφή νιτρικών ή αμμωνιακών ενώσεων. Χάρη στην εφαρμογή τους επιτυγχάνονται υψηλότερες αποδόσεις με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής.

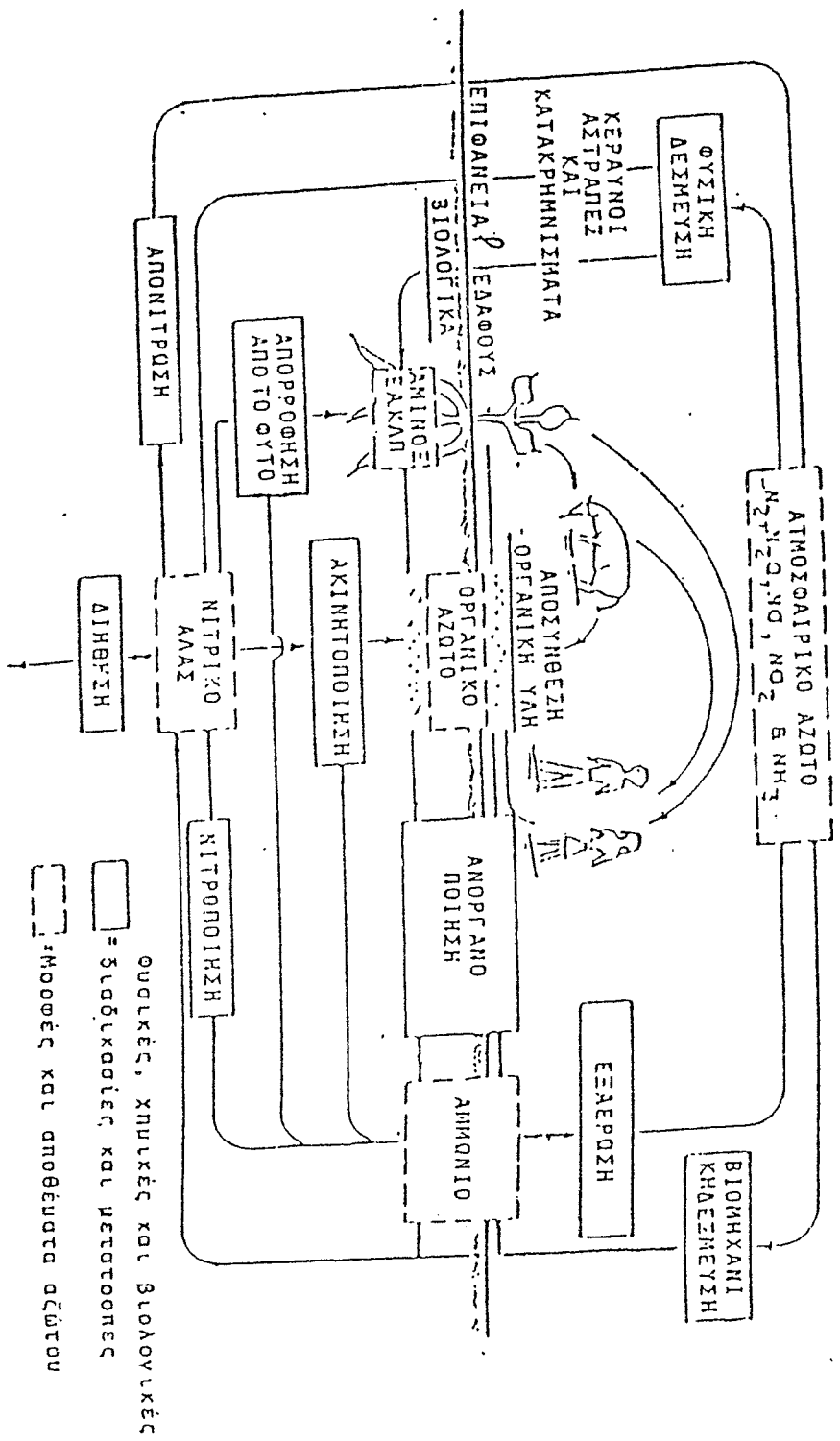
Σε αντίθεση με τα πλεονεκτήματα αυτά όμως, η χημική αζωτούχος λίπανση παρουσιάζει μία σειρά από μειονεκτήματα οικονομικά και περιβαλλοντικά

Υπερβολική χρήση του αζώτου μπορεί να προξενήσει αύξηση της συγκεντρώσεως των νιτρικών στις τροφές και σιτηρέσια με ενδεχόμενες δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία ανθρώπων και ζώων. Μερικές φορές νιτρώδη σχηματίζονται με αναγωγή νιτρικών στο πεπτικό σύστημα και αυτά μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό νιτροσαμινών οι οποίες μπορεί να είναι καρκινογόνες. Τα δεδομένα σχετικά με το θέμα είναι περιορισμένα. Επίσης το νερό οικιακής χρήσης περιέχει πάντα μία ποσότητα νιτρικών ιόντων σε ίχνη.

Σε μερικές περιοχές τοπικά η συκέντρωση σε νιτρικά ιόντα στο εδαφικό νερό, παρουσιάζεται αισθητά αυξημένη λόγω χρήσης λιπασμάτων ή αποχετευτικών εγκαταστάσεων ή και άλλων αιτιών. Η

υιοθέτηση όμως ανεκτών οριών χιιά τις συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων στο εδαφικό νερό είναι κάτι αρκετά δύσκολο να γίνει. Συχνουρα πάντως σε μερικές περιπτώσεις το νερό παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε νιτρικά που φτάνει να το καθιστά επικίνδυνο.

Η αναγωγή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία διενεργείται είτε χημικά είτε βιολογικά μέσω μιάς αντίδρασης που καταλύεται από ένα ενζυμικό σύμπλοκο, την νιτροχενάση. Η άμεση σύγκριση των δεδομένων της χημικής με τη βιολογική δέσμευση του αζώτου καταδειχνει την σπουδαιότητα της δεύτερης αντίδρασης. Έτσι η χημική αντίδραση γνωστή με το όνομα των Haber-Bosch είναι σε μεγάλο βαθμό ενδοθερμική, καθόσον είναι δυνατή υπο πίεση 200 atm και θερμοκρασία μεταξύ 400-600 C, ενώ μοριακό υδρογόνο και άζωτο με την παρουσία και μεταλλικού καταλύτη μετατρέπονται σε αμμωνία αποδίδοντας χύρω στο 13%. Η εκτίμηση της παγκόσμιας κατανάλωσης λιπασμάτων το 1974 ήταν της τάξης των  $30 * 10^6$  t/yr (Burns and Hardy 1975), αριθμός που ήταν 10 φορές πιά μεγάλος από την αντίστοιχη κατανάλωση του 1950. Είναι παραδεκτό (Sprend 1979) ότι απαιτούνται περίπου 1,5 kg υγρού πετρελαίου χιιά να αποδοθεί 1 kg αζώτου υπο μορφή λιπάσματος στο χωράφι. Ανάλογα (με παρόμοια σύγκριση) οι ποσότητες αζώτου που προέρχονταν από βιολογική δέσμευση (σε  $10^6$  t/yr) βρέθηκε να είναι  $175 * 10^6$  t/yr (Burns and Hardy 1975) και  $170-270 * 10^6$  t/yr (Soderlund and Svensson 1976). Οι τιμές αυτές ίσως είναι και μικρότερες των πραγματικών, καθόσον η συμβολή των μικροοργανισμών αζωτοδέσμευσης, χιιά το θαλάσσιο ισοζύχιο αζώτου είναι ακόμη σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. Παρότι η βιολογική αντίδραση γίνεται με την κατανάλωση κυτταρικής ενέργειας, απαιτεί μόνο 1 atm και θερμοκρασίες αυτές που



Ελκ.1. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου του αζώτου σε αγρο-οικοσυστήματα. Διασκευάστηκε από τον Hornsby (1973).

επικρατούν στο περιβάλλον. Αυτός ίσως είναι και ο λόγος που το θέμα της αζωτοδέσμευσης έχει πολύ εκλαικευθεί επιστημονικά και έχει δώσει ένα πλήθος δημοσιεύσεων και μία μεγάλη ποικιλία δημοσιευμένων βιβλίων (Potstgate 1971, 1978; Quispel 1974; Ayanaba and Dart 1977; Burns and Hardy 1975; Sprent 1979).

## 1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Από το σύνολο των μικροοργανισμών λίγα σχετικά είναι τα αθροίσματα εκείνα που έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο (Πίνακας 1). Ακόμα και σήμερα ο πίνακας αυτός ίσως είναι ατελής. Νέοι μικροοργανισμοί έχουν πρόσφατα βρεθεί και οπωσδήποτε και άλλοι θα έρθουν στο φως στο άμεσο μέλλον. Εξετάζοντας τον πίνακα 1 επισημαίνουμε δύο πράγματα: πρώτον, δεν βλέπουμε να υπάρχει παράδειγμα ευκαρυωτικού μικροοργανισμού αζωτοδέσμευσης. Δεύτερον, η αζωτοδεσμευτική ικανότητα δεν απαντάται συχνά αλλά και όταν αυτό συμβαίνει, οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί ανήκουν σε διάφορα αθροίσματά με λίγα κοινά σημεία. Και επειδή ο χαρακτήρας αυτός αποτελεί παραδεκτό στοιχείο συστηματικής ταξινόμησης τουλάχιστον προς το παρόν για την βακτηριολογία, οι μικροοργανισμοί αζωτοδεσμεύσης αναφέρονται σύμφωνα μόνο με το φυσιολογικό χαρακτηριστικό της αντίδρασης δέσμευσης (Bothe et al, 1983).

Η καλλιέργεια των ψυχανθών που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν φυμάτια με βακτήρια του γένους Rhizobium spp και Bradyrhizobium spp έχει πολύ μεγάλη βιολογική και οικονομική σπουδαιότητα. Ο βακτηριογενής σχηματισμός των φυματίων του ριζικού συστήματος και ο ρόλος τους στην αζωτοδέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου είχε γίνει γνωστός με την εργασία των Hellriegel και Will-

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Κατάλογος γενών αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών

Γένος ή τύπος	Είδη
A. Ελεύθερα διαβιούντες αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί	
1. Υποχρεωτικά αερόβιοι	
Azotobacter	vinelandii, chroococcum, paspali, beijerinckii
Beijerinckia	indica
Derxia	gummosa
Azotococcus	agilis
2. Υποχρεωτικά αερόβιοι που δεσμεύουν άζωτο μόνο σε χαμηλές πιέσεις οξυγόνου	
Azospirillum	brasilense, lipoferum, amazonense, halopraeferens
Xanthobacter	autotrophicus, flavus
Thiobacillus	ferro-oxidans
Rhizobium	cowpea group
Methylosinus	sporium
Methylococcus	capsulatus
Herbaspirillum	seropedicae
3. Προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που δεσμεύουν άζωτο μόνο σε αναερόβιες συνθήκες	
Klebsiella	pneumoniae
Bacillus	polymyxa, macerans
Propionibacterium	shermanii, petersonii
Eschericia	intermedia
Citrobacter	freundii
Enterobacter	cloacae, aglomerans
Erwinia	herbicola
4. Υποχρεωτικά αναερόβια	
Clostridium	pasteurianum, butyricum
Desulfovibrio	desulfuricans, vulgaris gigas
Desulfotomaculum	ruminis
5. Φωτοτροφικά βακτήρια	
α. Rhodospirillaceae	
Rhodospirillum	rubrum, tenue, fulvum, molischianum, photometricum
Rhodopseudomonas	palustris, viridis, capsulata spheroides
β. Chromatiaceae	
Chromatium	vinosum, gracile, minus, violacea
Thiocystis	violacea
Thiocapsa	roseopersicina, pfennigii
Amoebobacter	roseus
Ectothiorhodospira	spaposhnikovii

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 (Συνέχεια)

Γένος ή τύπος	Είδη
γ. Chlorobiaceae Chlorobium Pelodiction	limicola, vibrioforme luteulum
6. Κυανοπράσινα φύκη ή Κυανοβακτήρια	
α. Μονοκύτταρα, αερόβια δεσμεύοντα στελέχη	
Gloeotheca (προηγούμενη ονομασία Gloeocapsa) Aphanothece	alpicola (5 στελέχη)
β. Νηματόμορφα είδη που σχηματίζουν ετεροκύστες και δεσμεύουν αερόβια και αναερόβια	
Nostoc Anabaena Aphanizomenon Cylindrospermum Calothrix	muscorum, commune cylindrica, variabilis flos-aquae διάφορα στελέχη διάφορα στελέχη
γ. Νηματόμορφα είδη που δεν σχηματίζουν ετεροκύστες και δεσμεύουν μικροαερόβια	
Plectonema Oscillatoria Pseudanabaena Lyngbya Phormidium	boryanum διάφορα στελέχη διάφορα στελέχη διάφορα στελέχη διάφορα στελέχη
B. Συμβιωτικά και συνεργιστικά αζωτοδεσμευτικά συστήματα	
Οικογένεια ξενιστή Γένος ξενιστή Αζωτοδεσμευτικός οργανισμός	
α. Συμβιώσεις των Rhizobium	
Leguminosae	τα περισσότερα είδη Rhizobium
Ulmaceae	Parasponia Rhizobium
β. Συμβιώσεις εκτός των Rhizobium	
Betulaceae	Alnus
Myricaceae	Myrica, Comptonia
Eleagnaceae	Eleagnus, Hippophae
Rhamnaceae	Shepherdia Ceanothus, Trevoa, Discaria Σε όλες τις περιπτώσεις Actinomycetes "Frankia"
Rosaceae	Dryas, Cercocarpus, Purshia
Coriariaceae	Coriaria, Colleta
Casuarinaceae	Casuarina
γ. Λειχνίνες	Collema, Peltigera Dendriocaulon Nostoc Scytonema

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 (Συνέχεια)

Οικογένεια ξενιστή	Γένος ξενιστή	Αζωτοδεσμευτικός οργανισμ
δ. Ηπατικά βρυόφυτα	Anthoceros, Blasia Cavicularia	Nostoc sphaericum
ε. Υδρόβιες φτέρες	Azolla	Anabaena azollae
φ. Κυκάδες	Cycas, Ceratozamia Encephalartos, Dioon Macrozamia κ.λ.	Nostok, Anabaena
η. Ανώτερα φυτά Haloragaceae	Gunnera	Nostoc punctiforme
κ. Συνεργιστικές συμβιώσεις και περιστασιακοί συνεργισμοί		
Philosphere	Φύλα	Azotobacter spp
Rhizosphere	Ρίζες των σιτηρών Paspalum notatum Zea mays	Azotobacter paspali Azospirillum

Ο πίνακας συμπληρώθηκε με τα δεδομένα των Dobereiner (1983) Baldani et al, 1986 και Reinhold et al, 1987.



-fard το 1898. Στον ίδιο χρόνο ο Beijerinck πέτυχε την απομόνωση των σχετικών βακτηρίων. Τα βακτήρια που στην συμβιωτική τους φάση χαρακτηρίζονται ως βακτηριοειδή, δεσμεύουν άζωτο, το περίσσειμα του οποίου προσφέρεται στο φυτό ύπο μορφή αμμωνιακών ιόντων. Από τη πλευρά του το φυτό παρέχει στα βακτηριοειδή όλους τους άλλους παράγοντες ανάπτυξης (πηγή άνθρακα, ιχνοστοιχεία), έτσι ώστε να δημιουργείται μιά στενή σχέση αλληλεξάρτησης και αμοιβαίας ωφέλειας των δύο οργανισμών που χαρακτηρίζεται με τον όρο συμβίωση.

Φυμάτια που έχουν σχηματισθεί από είδη Rhizobium spp έχουν βρεθεί και σε ψυχανθή του γένους Parasponia (Trinick 1973; Akkermans et al, 1978). Ακόμη έχουν εντοπισθεί ακτινομύκητες με αζωτοδεσμευτική δράση όπως το γένος Frankia στις ρίζες ανωτέρων φυτών που δεν έχουν καμμία συσχενική σχέση από άποψη συστηματικής μεταξύ τους. Επίσης διάφορα κυανοφύκη αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις σε μιά σειρά ευκαρυωτικών ξενιστών (Alexander, 1961).

Από τους ελεύθερα διαβιούντες μικροοργανισμούς τα βακτήρια του γένους Azotobacter είναι εκείνα που έχουν μελετηθεί περισσότερο. Υπάρχουν σε όλα τα εδάφη αν και σε μικρούς πληθυσμούς διότι, δύσκολα βρίσκουν ευνοϊκές συνθήκες διαβίωσης, ανάπτυξης και δέσμευσης του αζώτου και κυρίως αφθονία υδατανθράκων και οξυγόνο που τους είναι απαραίτητα. Τα Azotobacter όπως είναι γνωστό έχουν το υψηλότερο αναπνευστικό πηλίκο ανάμεσά στα βακτήρια. Από την άλλη μεριά πρέπει να προστατέψουν την νιτροχενάση τους από το οξυγόνο στο οποίο είναι ευαίσθητη (Bothe et al, 1983).

Τα βακτήρια του γένους Beijerinckia είναι αερόβια, αναπτύσσονται καλά σε χαμηλά pH και απαντώνται κυρίως σε τροπικές περιοχές (Alexander 1961).

Τα Clostridium spp είναι αναερόβια βακτήρια με pH ανάπτυξης 5-9 και με αποτελεσματικότητα 6-8mg N<sub>2</sub>/gr οξειδούμενου σακχάρου (Alexander 1961).

Επίσης αζωτοδεσμευτική ικανότητα διαθέτουν μερικά είδη από τα φωτοσυνθέτοντα βακτήρια όπως είδη των γενών Chromatium, Rhodospirillum και Chlorobium.

Από τα μη φωτοσυνθετικά μικροαερόφιλα βακτήρια αναφέρονται : Xanthobacter flavus (προηγούμενα ονομασία : Mycobacterium flavus); Xanthobacter autotrophus (προηγούμενα ονομασία : Corynebacterium autotrophicum) και τα Azospirillum spp.

Η ευρεία διάδοση των ειδών του γένους Azospirillum κυρίως στη ριζόσφαιρα των αχροστωδών έχει προκαλέσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον πιθανό ρόλο που μπορεί να παίξουν στην οικονομία του αζώτου στο έδαφος, αλλά και σε ότι αφορά άλλες ενδιαφέρουσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και φυτών.

### 1.3. ΡΙΖΟΚΟΙΝΩΝΙΑ ΤΩΝ Azospirillum

Ο προσδιορισμός μιάς συνεργιστικής σχέσης ανάμεσα στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και τις ρίζες των φυτών, η ριζοκοινωνία όπως ονομάστηκε (Interwork Shop Associative N<sub>2</sub>-Fixation Piracicaba, 1979) προϋποθέτει και την κατανόηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε φυτό-βακτήριο (Dobereiner, 1983). Η απλή απομόνωση ενός ή περισσότερων ειδών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων από την ριζόσφαιρα του φυτού είναι ανεπαρκής για τη κατανόηση του φαινομένου έστω κι αν τέτοια βακτήρια υπάρχουν σε μεγάλος πληθυσμός (Dobereiner, 1983).

Η ύπαρξη συνεργιστικής σχέσης φυτού-Azospirillum φαίνεται να είναι πολύ συχνό φαινόμενο σε τροπικές περιοχές. Όμως

απαντώνται . και στα εύκρατα κλίματα και η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια(Dobereiner et al, 1976; van Berkum, Bohlool, 1980; Vlasak, Reynders, 1981)(Πίνακας 2). Μεγάλοι πληθυσμοί αυτών των βακτηρίων βρέθηκαν στην περιοχή της ριζόσφαιρας και στις ρίζες πολλών φυτών λειμώνων π.χ. Panicum maximum, Brachiaria spp, Pennisetum purpureum, Digitaria spp) επίσης σε καλλιέργειες κεχριού, σόργου, ρυζιού και σικάλης σε εκτεταμένες περιοχές της κεντρικής και Νότιας Βραζιλίας(Dobereiner et al, 1976; da Silva and Dobereiner 1978). Από μία έρευνα στην Ινδία βρέθηκαν βακτήρια του γένους Azospirillum spp σε ανάλογες καλλιέργειες αλλά και σε πολλά άλλα μη αχροστώδη(Lakshmi-kurami et al, 1976).

Ο ρόλος των Azospirillum στην δέσμευση του μοριακού αζώτου σε φυτά του γένους Digitaria(Day and Dobereiner, 1976) και αραβοσίτου(Dobereiner and Baldani, 1980) επιβεβαιώθηκε από πολύ ακριβείς συγκρίσεις ανάμεσα στην δράση της νιτρογενάσης ριζικών τμημάτων τους και την ανάλογη δράση καθαρών καλλιεργειών Azospirillum που είχαν απομονωθεί από τα ίδια ριζικά τμήματα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

ΟΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ Azospirillum (Vlassak and Reynders, 1981).

Χώρα	Αριθμός Δειγμάτων	+	-	% +
<b>1. ΕΥΚΡΑΤΕΣ</b>				
Ελλάς (#)	8(7)	6(5)	2(2)	75(71)
Βέλγιο	87	49	38	56
Καναδάς	17	6	11	35
Ισλανδία	9	0	9	0
Λουξεμβούργο	4	0	4	0
Ολλανδία	1	0	1	0
Γαλλία	7	3	4	43
Ελβετία	2	2	0	100
Η. Π. Α	5	4	1	80
Νέα Ζηλανδία	3	1	2	33
Σύνολο	143	71	72	50
<b>2. ΤΡΟΠΙΚΕΣ</b>				
Αίγυπτος	1	1	0	100
Ινδία	7	5	2	71
Σρι Λάνκα	4	4	0	100
Ινδονησία	3	2	1	67
Σύνολο	15	12	3	80

(#). Οι τιμές μέσα στις παραθέσεις αφορούν πειραματικά δεδομένα από τη πτυχιακή μελέτη του Γ. Παπουτσή (1987). (Εργαστήριο Μικροβιολογίας ΑΓΣΑ.)

#### 1.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ Azospirillum

Ο Beijerinck (1925) περιέγραψε σαν Spirillum lipoferum αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς που τους απομόνωσε από εδάφη στην Ολλανδία. Του ήταν όμως αδύνατο να καταδείξει την ύπαρξη της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας σε καθαρή καλλιέργεια. Ο Schroder (1932) ερχαζόμενος με μονοκυτταρικές απομονώσεις που καλλιεργούσε σε θρεπτικό υλικό γλυκόζης και μηλικού νατρίου, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, ακόμη και σε μέσα εμπλουτισμένα με χουμικές ενώσεις δεν ήταν ικανές να δεσμεύουν άζωτο. Έτσι, η αζωτοδεσμευτική ικανότητα του οργανισμού αυτού αγνοήθηκε. Ο Becking (1963) πέτυχε επίσης ενσωμάτωση μοριακού αζώτου σε βακτήρια του γένους "Vibrio ή Spirillum" που πιθανώς να ήταν ο ίδιος μικροοργανισμός (Day and Dobereiner, 1976). Όμως το ουσιαστικό ενδιαφέρον για τους οργανισμούς αυτούς άρχισε να προκαλείται μετά τις εργασίες των Dobereiner και Day (1976) οι οποίοι τους απομόνωσαν από ρίζες διαφόρων αχροστωδών στη Βραζιλία, ΗΠΑ και Αφρικανικές χώρες. Διαπιστώθηκε, εφαρμόζοντας τη μέθοδο αναγωγής του ακετυλενίου ότι, οι οργανισμοί αυτοί διαθέτουν αξιόλογη ικανότητα δέσμευσης μοριακού αζώτου (Dobereiner et al, 1976). Βασισμένος σε παράλληλες μελέτες πάνω στο DNA 60 στελεχών ο Tarrand και άλλοι το 1978 περιέγραψαν ένα καινούριο γένος, το γένος Azospirillum με δύο είδη, το A. lipoferum (πιθανώς ίδιο με το S. lipoferum του Beijerinck) και το άλλο A. brasilense. Σαν κύρια διαφοροποιητικά χαρακτηριστικά βρέθηκαν: α. οι απαιτήσεις για βιοτίνη και η χρήση γλυκόζης και α-κετογλουταρικού σαν μόνη πηγή άνθρακα και β. οι τυπικά μεγάλες σπειροειδείς μορφές των κυττάρων του A. lipoferum, σε πάλιες

καλλιέργειες σε αλκαλικό περιβάλλον.

Και τα δύο είδη περιέχουν δύο ομάδες, μιά ομάδα διαθέτει την ικανότητα της απονίτρωσης(nir+) και μία δεύτερη που στερείται αυτή τη δράση(nir-). Η διαφοροποίηση ανάμεσα στα δύο είδη και τις ομάδες (nir) έγινε δυνατή με την χρησιμοποίηση της τεχνικής φθοριζόντων αντισωμάτων (De Polli et al, 1980). Τα κύρια χαρακτηριστικά των δύο ειδών Azospirillum spp παρουσιάζονται περιληπτικά στον πίνακα 3.

Οι Tarrand et al(1978) αναφέρουν στη περιγραφή του χένους Azospirillum ότι τα βακτήρια είναι κινητά σε υγρά μέσα, όμως άλλοι ερευνητές έχουν απομονώσει στέλεχος Azospirillum που δεν είναι κινητό(Balandreau, 1983; Bally et al, 1983).

Τελευταία περιγράφηκε ένα καινούριο είδος που απομονώθηκε στη νότια Αμερική και ονομάζεται A. amazonense. Το κύριο χαρακτηριστικό του είδους αυτού είναι η μη χρησιμοποίηση του κιτρικού οξέος σαν μόνη πηγή άνθρακα. Έχει προταθεί επίσης η θέσπιση ενός ακόμη είδους με το όνομα A. halopraeferans(Reinhold, B et al, 1987), που σαν κύριο χαρακτηριστικό έχει την αύξηση σε παρουσία 3 % NaCl και την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 41 C.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 (Krieg and Dobereiner, 1984)  
 Άλλα χαρακτηριστικά των Azospirillum spp. (\*)

Χαρακτηριστικά	1.lipof.	2.bras.	3.amaz.	4.halopr.
Οξειδάση	+	+	+	+
Καταλάση	d	+	+	+
Υδρόλυση εσκουλίνης	+	+	+	+
Φωσφατάση	+	+	+	+
Σχηματισμός ρόδινων χρωστικών σε BMS άχαρ	+	+	-	+
Αναερόβια αύξηση με νιτρικά σε θρεπτικό υλικό πεπτόνης	+	+	-	-
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> σε NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	+	+	+
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> σε N <sub>2</sub> O	d	d	d	d
N <sub>2</sub> O σε N <sub>2</sub>	+	+	+	+
Υδρόλυση αμύλου	-	-	-	-
Ουρεάση	+	+	+	+
Υδρόλυση ζελατίνης	-	-	-	-
Ινδόλη	-	-	-	-
Αύξηση παρουσία 1% οξυχάλακτος	+	+	+	+
Αύξηση παρουσία 3% NaCL	d	-	-	+
Δοκιμή Voges-Proskauer	d	-	-	d
Αερόβια παραγωγή οξέων από υδατάνθρακες				
Φρουκτόζη	+	+	+	+
Γαλακτόζη, αραβινόζη	+	d	d	+
Μανιτόλη, σορβιτόλη, ριβόζη, i-ινοσιτόλη, ξυλόζη	d	-	-	-
Ραμνόζη, δουλσιτόλη, ερυθριτόλη, μαλτόζη, κελλοβιόζη, μελιβιόζη, λακτόζη	-	-	-	-
σακχαρόζη	-	-	+	-
Μοναδικές πηγές άνθρακα με πηγή αζώτου θειικό αμμώνιο				
Ηλεκτρικό, μηλικό, γαλακτικό, πυροσταφυλικό, οξαλοξικό, φουμαρικό, γλυκονικό, γλυκερόλη, β-υδροξυβουτυρικό, φρουκτόζη, προπιονικό, κιτρικό	+	+	+	+
α-κετοχλουταρικό	+	-	-	-
Γλυκόζη	+	-	+	-
Γαλακτόζη, αραβινόζη	d	d	d	d
Μαννιτόλη, σορβιτόλη, ριβόζη	d	-	d	-
Μηλονικό	-	-	-	-

(\*) Ο πίνακας συμπληρώθηκε με τα δεδομένα από των Baldani (1986), και Reinhold et al, 1987.

d. θετικά από 11-89% των στελεχών.

+. θετικά περισσότερο από 90% των στελεχών.

-. αρνητικά περισσότερο από 90% των στελεχών.

## 1.5. Η ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΟ ΡΙΖΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Σε μιά συμβίωση όπως αυτή των ψυχανθών, το πρώτο βήμα είναι ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων επιλεκτικά και η εγκατάστασή τους διά μέσου των ριζικών τριχιδίων μέσα στις ρίζες.

Βακτήρια του γένους Azospirillum, στη ριζόσφαιρα των σιτηρών εγκαθίστανται στις ρίζες και πολλαπλασιάζονται. Επικόλληση του A. brasilense πάνω σε ριζικά τριχίδια και σε αδιοφοροποίητα επιδερμικά κύτταρα παρατηρήθηκε σε περίπτωση φυταρίων Panicum maximum (Umali-Garcia et al, 1978). Γενικά τα φυτά έχουν πιο πλούσιο ριζικό σύστημα και εμφανίζουν μεγαλύτερη έκπτυξη πλαχίων βλαστών. Επίσης η παρουσία των βακτηρίων προκαλεί τη παραγωγή ιξώδους ουσίας στις ρίζες των φυτών, πολύ περισσότερης από τα μη εμβολιασθέντα φυτά (Garcia et al, 1980; 1981). Δεν είναι γνωστό σε πιο ποσοστό συμμετέχουν τα βακτήρια και οι ρίζες στην παραγωγή της ιξώδους αυτής ουσίας. Όσον αφορά τον ρόλο που αυτή διαδραματίζει στο συνεργισμό έχουν διατυπωθεί οι απόψεις: α. ότι μεσολαβεί στην ανταλλαγή ιόντων μεταξύ του εδαφικού περιβάλλοντος και της επιφάνειας των ριζών ή των μικροοργανισμών, β. ότι συμβάλλει στη δημιουργία καταλλήλων συνθηκών για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, γ. συντελεί στη παρεμπόδιση του αποικισμού των ριζών από άλλους μικροοργανισμούς, δ. πιθανόν είναι επίσης να ευνοεί την αζωτοδέσμευση δημιουργώντας πρόσφορες συνθήκες όσον αφορά τη συκέντρωση του οξυγόνου (Garcia et al 1981). Λόγω της παρουσίας της ουσίας αυτής, τα βακτήρια προσφύονται στενά στη καλύπτρα της ρίζας, τα ριζικά τριχίδια και το ριζικό άξονα. Αντίθετα άλλα είδη βακτηρίων (Rhizobium spp., Escherichia coli, Pseudomonas fluorescent, Klebsiella pneumoniae) προσκολλώνται πιο χαλαρά ή



και καθόλου στις ριζικές επιφάνειες.

Τα Azospirillum ακόμη μετατρέπουν, όπως και τα Rhizobium την τρυπτοφάνη σε ινδολοοξικό οξύ (Vlassak and Reynders, 1978) μιά ένωση που έχει σχέσει με την ανάπτυξη των ψυχανθών και συμβάλλει στην εγκατάσταση των ριζοβίων. Παράχονται επίσης μικρές αλλά βιολογικά σημαντικές ποσότητες χιβερελλίνων, καθώς επίσης και τρεις κυτοκινίνες. Η επίδραση των ρυθμιστών αυτών αύξησης στη μορφολογία της ρίζας είναι σημαντική. Ο αριθμός των πλευρικών ριζών και των ριζικών τριχιδίων αυξάνεται σημαντικά (Hubbell et al, 1981; Tien et al, 1979).

Οι μηχανισμοί διά των οποίων εκδηλώνεται η ευεργετική δράση μέσω του συνεργισμού δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Μερικοί ερευνητές διατείνονται ότι πράγματι υπάρχει θετική αντίδραση εμβολιασθέντων φυτών όσον αφορά τις αποδόσεις και την αζωτοπεριεκτικότητα των φυτών που εξέτασαν (Karulnik et al, 1985; Subba Rao, 1985; van Berkum and Bohloul, 1980). Όμως, όπως αναφέραμε προηγουμένως, οι θετικές αυτές επιδράσεις είναι πιθανόν να οφείλονται στην επίδραση των ρυθμιστών αύξησης παραχομένων από τα Azospirillum ή και τα ίδια τα φυτά σαν αντίδραση στο βακτηριακό αποικισμό (Karulnik et al, 1985).

Έχει διαπιστωθεί η δυνατότητα προσβολής του ριζικού συστήματος αποστειρωμένων φυταρίων αραβοσίτου (Burris, 1977), ρυζιού και μηδικής (Subba Rao, 1981) και εγκατάστασης στο ενδοκυτταρικό και διακυτταρικό χώρο βακτηρίων ειδών του γένους Azospirillum. Επίσης σε φυτά Digitaria decumbens (Day and Dobereiner, 1976) και αραβοσίτου (Patriquin and Dobereiner, 1978) που αναπτύχθηκαν στο χωράφι έχουν διαπιστωθεί ποιομοιότυπα βακτήρια τα οποία ανάχουν το τετραζόλιο και είναι εντοπιζόμενα στο διακυτταρικό και

ενδοκυτταρικό χώρο της εντεριώνης και βλαστού. Σε ρίζες σίτου και ρυζιού (Baldani and Dobereiner, 1980) που αναπτύσσονται υπό στείρες συνθήκες ο πληθυσμός των Azospirillum στην επιφάνεια των ριζών ήταν σχεδόν αμιγής. Ενώ σε αναποστειρωτές ρίζες εμφανίζονται κατά το πλείστον μικτοί πληθυσμοί. Σε αποστειρωμένες ρίζες αραβοσίτου που έχουν υποστεί μηχανικά τραύματα ο πληθυσμός των Azospirillum ήταν κατά  $10^3 - 10^4$  μεγαλύτερος απ'ότι στις ρίζες που έμειναν ανέπαφες (Okon et al 1977). Το σύνολο όλων αυτών των παρατηρήσεων, επιβεβαιώνουν την ένδο- και διακυτταρική φύση αυτής της ριζοκοινωνίας (Patriquin and Dobereiner, 1978).

Θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι σε ευνοϊκές συνθήκες διαθεσιμότητας υποστρώματος και συκέντρωσης οξυγόνου η αζωτοδέσμευση εντός των ριζών είναι πιο σημαντική και αποτελεσματική από εκείνη που ενεργείται από βακτήρια στην επιφάνεια του ξενιστή ή βακτήρια που δρουν ελεύθερα στο έδαφος (Burris et al, 1978).

Έξ' άλλου οι συνθήκες που επικρατούν στη ριζόσφαιρα των σιτηρών ευνοούν στην ανάπτυξη των Azospirillum. Τα Azospirillum δεν είναι σε θέση να χρησιμοποιούν δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Αντίθετα, οι μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη χρησιμοποιούνται εύκολα από το A. lipoferum και σε μικρότερο βαθμό από το A. brasilense. Έχει διαπιστωθεί ότι οι ρίζες εκκρίνουν ένζυμα που υδρολύουν υδατάνθρακες στη ριζόσφαιρα των σιτηρών. Ο Gatzle και Martin έχουν δείξει την παρουσία ενζύμων χύρω από τις ρίζες, ικανών να υδρολύουν πολυσακχαρίτες και δισακχαρίτες σε μονοσακχαρίτες. Η ιμπερτάση, η κελλοβιάση, και η αμυλάση είναι ένζυμα που έχουν ανιχνευθεί στη ριζόσφαιρα αραβοσίτου. Υπάρχουν βέβαια

διαφορές όσον αφορά την ικανότητα υδρόλυσης σακχάρων από τα διάφορα είδη αχροστωδών. Γίνεται λοιπόν κατανοητή η ευνοϊκή επίδραση που τα εκκρινόμενα από τις ρίζες ένζυμα ασκούν στην ανάπτυξη των Azospirillum (Gatzle and Martin, 1981)

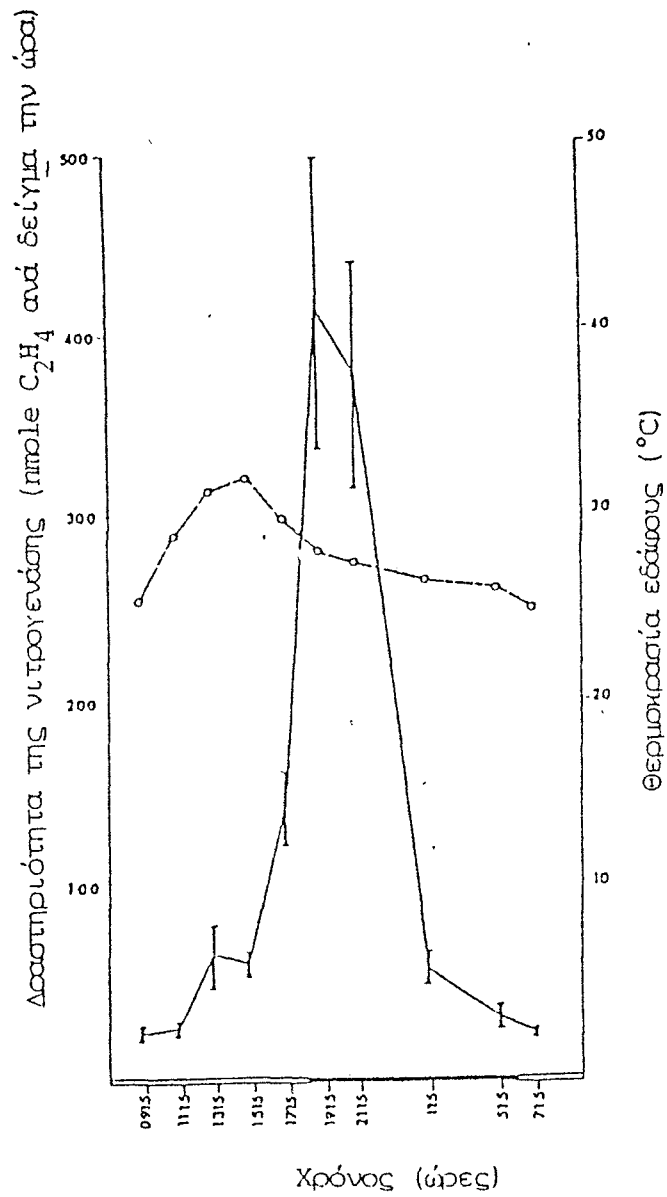
Οι αλληλεπιδράσεις λοιπόν μεταξύ Azospirillum και αχροστωδών φαίνεται ότι βασίζονται σε φυσιολογικές ιδιότητες των δύο συμβαλλόντων μερών που ευνοούν την ανάπτυξη τόσο του βακτηρίου όσο και του φυτού.

#### 1.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ Azospirillum

Βακτήρια του γένους Azospirillum έχουν απομονωθεί από την ριζόσφαιρα ενός μεγάλου αριθμού φυτικών ειδών και από δείγματα εδάφους από τροπικές και εύκρατες περιοχές. Η μέθοδος απομόνωσης τους βασίζεται στην χρησιμοποίηση ημιστερεών εκλεκτικών θρεπτικών μέσων ελευθέρων αζώτου τα οποία εμβολιάζονται με τεμάχια ριζών ή κόκκους χώματος από δείγματα τα οποία παρουσίασαν υψηλή δραστηριότητα της νιτροχενάσης.

Για τον σκοπό αυτό έχει αναπτυχθεί κατάλληλη μεθοδολογία όσον αφορά τη συλλογή των δειγμάτων ριζών για την ορθή εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας και για την ευκολότερη απομόνωση των βακτηρίων (Balandreau et al, 1974; Day et al, 1975; Dobereiner and Day, 1975).

Είναι γνωστό ότι παρατηρείται ημερήσια και εποχιακή διακύμανση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας στο ριζικό σύστημα των σιτηρών ( van Berkum and Bohlool, 1980; Wani et al, 1983). Συγκεκριμένα, για την ημερήσια διακύμανση έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζει υψηλούς ρυθμούς κατά την διάρκεια της



Εικ.2: Ημερήσια διακύμανση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης (-) στο φυτό *Panicum miliaceum* cv NIH-3 (Wani et al, 1983)

φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φυτών και εν συνεχεία ο ρυθμός μειώνεται (Εικ. 2). Γιά να εξουδετερωθούν τα σφάλματα που μπορεί να προκληθούν εξ αιτίας της ημερήσιας διακύμανσης της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας έχει υιοθετηθεί οι δειγματοληψίες να γίνονται το απόγευμα (Day et al, 1975).

Η απομόνωση των Azospirillum από δείγματα ριζών με θετική ένδειξη αναχωχής του ακετυλενίου επιτυγχάνεται με τη χρήση θρεπτικού υλικού ελεύθερου αζώτου, ημιστερεού με πηγή άνθρακα μηλικό νάτριο (Dobereiner et al, 1976; Rodriguez Ceceras, 1982). Τα Azospirillum αναπτύσσονται λίγα χιλιοστά κάτω από την επιφάνεια υπό μορφή στοιβάδας (Dobereiner et al, 1976; Rodriguez Ceceras, 1982). Στο στάδιο αυτό είναι δυνατό να εκτιμηθεί η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα, οπότε τα δείγματα με θετική ένδειξη χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των Azospirillum μετά από επανειλημμένες χημικές διασπορές σε τρυβλία με εκλεκτικό υλικό (Dobereiner et al, 1976).

Γιά την επιτυχή απομόνωση των Azospirillum λαμβάνονται υπ' όψιν κατ' αρχήν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των αποικιών του χένους αυτού.

#### 1.7. ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

Οι παθογενείς, συνεργιστικές ή συμβιωτικές σχέσεις των φυτών κατά τις οποίες εμφανίζεται και προσβολή των ριζών παρουσιάζουν όλους τους βαθμούς εξειδίκευσης. Δεν πρέπει επομένως να μας εκπλήσσει το γεγονός ότι ένας κάποιος βαθμός εξειδίκευσης από τη μεριά του ξενιστή-φυτού θα πρέπει να έχει βρεθεί επίσης και στη περίπτωση της ριζοκοινωνίας Azospirillum (Baldani and

Dobereiner, 1980; Dobereiner and De Polli, 1980). Έτσι από ένα μεγάλο αριθμό απομονώσεων που έγιναν σε μιά σειρά φυτά λειμώνων που αναπτύχθηκαν σε έδαφος που περιείχε και τις τρεις ομάδες Azospirillum, διαπιστώθηκε ότι ο αραβόσιτος, σόργο και διάφορα άλλα C<sub>4</sub> -φυτά προσβάλλονται από το A. lipoferum, ενώ τα C<sub>3</sub> -δημητριακά, σιτάρι, κριθάρι, βρώμη, σίκαλη και ρύζι προσβάλλονται σχεδόν αποκλειστικά από A. brasilense. Μόνη εξαίρεση ήταν το ζαχαροκάλαμο (Πίνακας 4).

Η εξειδίκευση είναι σχεδόν απόλυτη χιιά τα βακτήρια που εγκαθίστανται μέσα στους ιστούς των ριζών, ενώ στην περίπτωση που ζούν στη ριζόσφαιρα, απλώς κάποιο είδος υπερτερεί του άλλου όσον αφορά τον πληθυσμό του. Έτσι, στον αραβόσιτο απομονώσεις από το εσωτερικό των ριζών (μετά από επιφανειακή απολύμανση με chloramine-T) ήταν 90% A. lipoferum κατά τους Baldani και Dobereiner (1981), ενώ στις απομονώσεις από χειτονικό της ριζόσφαιρας χύμα καθώς και από τη ριζόσφαιρα, απλώς υπερτερούσε το A. lipoferum. Στο σιτάρι οι απομονώσεις από το εσωτερικό των ριζών ανήκαν αποκλειστικά στο A. brasilense, ενώ σ' αυτές από τη ριζόσφαιρα υπερτερούσε το A. brasilense (Baldani and Dobereiner, 1981). Στο σόργο, οι απομονώσεις από το εσωτερικό των ριζών δείχνουν, απόλυτη εξειδίκευση, προσδιοριζόμενες ως A. lipoferum, ενώ στις απομονώσεις από τη ριζόσφαιρα υπερτερεί το A. brasilense (Rocha et al, 1981).

Όταν εξειδικευμένα στελέχη Azospirillum που σημάνθηκαν γενετικά χιιά αντοχή στη στρεπτομυκίνη (20 μg/ml) και μετά εμβολιάστηκαν σε φυτά αραβοσίτου και σιταριού στο χωράφι, περισσότερο από 80% του πληθυσμού της ριζόσφαιρας και της ριζικής επιφάνειας προέρχονταν από τα εμβολιασθέντα

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Εξειδίκευση ξενιστών στη μόλυνση ριζών των σιτηρών από *Azospirillum spp* σε φυτά αναπτυσσόμενα στον αγρό και σε γλάστρες (Dobereiner, 1983)

Δείγμα	Τύπος φωτοσύν.	Αριθμός απομονώσεων	% απομόνωσης ριζών(^) προσδιο.ώς			
			<i>A. lipoferum</i>		<i>A. brasilense</i>	
			nir(+)	nir(-)	nir(+)	nir(-)
Αραβόσιτος	C <sub>4</sub>	49	55	41	17	3
Σόργο	C <sub>4</sub>	19	20	80	0	0
Σιτηρά χιό(#)	C <sub>4</sub>	45	33	70	0	7
Ζακχαροκάλαμο	C <sub>4</sub>	24	0	0	0	100
Σιτάρι	C <sub>3</sub>	50	0	0	7	93
Βρώμη	C <sub>3</sub>	5		20	0	80
Σίκαλη	C <sub>3</sub>	22		18	0	82
Κριθάρι	C <sub>3</sub>	11		18	0	82

^, -Ρίζες αποστειρωμένες σε χλωροαμίνη χιό 0.5 έως 60 min ανάλογα με τη δομή της ρίζας κάθε είδους. Τα δείγματα εδάφους σε όλες σχεδόν της συκκομιδής περιείχαν και τις τρεις ομάδες *Azospirillum* #, -*Panicum maximum*, *Cynodon dactylon*, *Pennisetum purpureum* *Digitaria decumbens*, *Hemarthria altissima*.

στελέχη(Baldani and Dobereiner, 1980).

Αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα φυτά που διαθέτουν την μεταβολική οδό του κύκλου των δικαρβοξυλικών οξέων στη φωτοσύνθεση (φυτά τύπου  $C_4$  ) ικανοποιούν καλύτερα τις ενεργειακές ανάγκες των Azospirillum. Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια αυτά δείχνουν προτίμηση στο μηλικό οξύ και σε άλλα οργανικά οξέα σαν πηγές άνθρακα. Το μηλικό οξύ είναι ένα από τα αρχικά προϊόντα της φωτοσύνθεσης σε μερικά από τα φυτά του τύπου  $C_4$  . Είναι πιθανή η μεταφορά του πλεονάζοντος μηλικού οξέος από το υπέρχειο τμήμα στις ρίζες και η χρησιμοποίηση του ακολούθως από τα Azospirillum. Όμως δεν έχει ακόμη αποδειχθεί ότι η συσώρευση μαλικού άλατος στις ρίζες των  $C_4$  σιτηρών, συνεπάγεται την παροχή ενέργειας και την ενεργοποίηση του μηχανισμού αζωτοδέσμευσης από τα Azospirillum(van Berkum and Bohloul, 1980).

Η έκκριση βιοτίνης από τις ρίζες των σιτηρών επιδρά στην ανάπτυξη του A. lipoferum, καθώς απαιτεί βιοτίνη για να αναπτυχθεί. Έχει πράγματι αποδειχθεί ότι η απελευθερούμενη βιοτίνη από τις ρίζες των σιτηρών υποβοηθεί καθοριστικά στην ανάπτυξη του A. lipoferum(Gatzle and Martin, 1981).

Το θέμα πάντως της εξειδίκευσης των ειδών Azospirillum ως προς τους ξενιστές τους παραμένει ανοικτό. Η κατανόηση του φαινομένου αυτού θα βοηθήσει ίσως στην προσπάθεια εξεύρεσης στελεχών κατάλληλων για εφαρμογές στον αγρό.



### 1.8. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ Azospirillum

Η μελέτη της φυσιολογίας των Azospirillum spp σε "in vitro" συνθήκες βοηθά στην κατανόηση του φαινομένου του συνερχισμού στη ριζόσφαιρα των σιτηρών.

Τα κύτταρα των Azospirillum spp είναι παχέα ραβδία (plump) που φέρουν με ελαφριά κύρτωση ή είναι ίσια, διαμέτρου περίπου 1.0 μm και μήκος 2.1-3.8 μm, συχνά με μυτερά άκρα. Gram αρνητικά αλλά και ποικίλλοντα κατά Gram. Το πολύ-β-υδροξυβουτυρικό οξύ μπορεί να συμμετέχει στην σύνθεση από 25-50 % του βάρους των κυττάρων όταν καλλιεργούνται σε θρεπτικά υλικά ελεύθερα αζώτου. Σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υλικά με αμμωνιακό άλας σαν πηγή αζώτου, η παραπάνω ένωση αποτελεί μόνο το 0.5-1.0 % του βάρους τους (Okon et al, 1976). Τα Azospirillum έχουν ένα και μοναδικό πολικό μαστίγιο όταν καλλιεργούνται σε υγρό υλικό MPSS\*. Εάν όμως καλλιεργηθούν σε στερεό MPSS στους 30 C εκπτύσσονται και μία σειρά άλλα πλάγια μαστίγια πέραν του πολικού. Η λειτουργία των πλαγίων μαστιγίων δεν είναι γνωστή. Σε ημιστερεά θρεπτικά υλικά ελεύθερα αζώτου με μηλικό οξύ σαν πηγή άνθρακα (Nfb) το A. lipoferum αναπτύσσει κυρίως πλειομορφικά κύτταρα μέσα σε 48 ώρες σε αντίθεση με το A. brasilense όπου έχουμε διατήρηση του σπειροειδούς σχήματος. Το A. lipoferum αναπτύσσει επιμήκη κύτταρα (1.4-1.7 \* 5 μm με μήκος περισσότερο από 30 μm) τα οποία δεν είναι κινητά και έχουν σχήμα "S" ή σπειροειδές. Σε θρεπτικό υλικό που περιέχει τη χρωστική κόκκινο του Κοχκό τα κύτταρα απορροφούν τη χρωστική αυτή και χρωματίζονται έντονα κόκκινα σε αντίθεση με αποικίες άλλων ειδών βακτηρίων (Rodrigues Caceras 1982).

Σε BMS\* άχαρ, μετά από 1-2 εβδομάδες επώαση στους 33-35 C οι \* θρεπτικά υλικά που αναφέρονται στα Υλικά και Μεθόδοι (Σελ 48 )

αποικίες των Azospirillum έχουν χρώμα ρόζ, είναι αδιαφανείς με σχήμα ακανόνιστο ή στρογγυλό συχνά συρρικνωμένο (Dobereiner et al, 1976; Dobereiner and Baldani 1979). Το χρώμα των αποικιών σε BMS άχαρ γίνεται πιο έντονο όταν η επώαση γίνεται στο φώς. Μερικά στελέχη του A. brasilense σχηματίζουν αποικίες που έχουν χρώμα βαθύ ρόζ (Eskew et al, 1977; Tarrand et al, 1978). Σ' ένα τέτοιο στέλεχος (ATCC 29729) αυτό το έντονο χρώμα οφείλεται στο σχηματισμό αρκετών καροτινοειδών χρωστικών οι οποίες παρουσιάζονται μόνο κάτω από αερόβιες συνθήκες και πιθανώς σχετίζονται με την προστασία της νιτροχενάσης από οξειδωτική καταστροφή (Nur et al, 1981). Το πιο τυπικό ροδίνο χρώμα άλλων στελεχών του A. brasilense μπορεί πιθανώς να οφείλεται στο κυτόχρωμα C που περιέχει (Nur et al, 1981).

Τα Azospirillum είναι υποχρεωτικά αερόβια και αδυνατούν να αυξηθούν απουσία οξυγόνου με εξαίρεση την περίπτωση παρουσίας νιτρικών ( $\text{NO}_3^-$ ) και μιας οργανικής πηγής N (Neyra and van Berkum, 1977). Οι απαιτήσεις σε  $\text{O}_2$  είναι πολύ χαμηλές και ένα επίπεδο διαλυμένου  $\text{pO}_2$  της τάξης του 0.003 atm είναι απαραίτητο για τη δράση της νιτροχενάσης (Nelson and Knowles, 1978). Από την άλλη μεριά η γρήγορη ανάπτυξη σε συνεχείς ή κλειστές καλλιέργειες καταναλώνει τόσο  $\text{O}_2$ , ώστε αφού η οπτική πυκνότητα φθάσει περίπου στο τιμή 0.3 (στα 560 nm) τα Azospirillum μπορούν να αυξάνουν στον αέρα συνεχώς με γρήγορη ανάδευση (Dobereiner 1977, Volpon et al, 1981), εφ' όσον η τροφοδοσία με  $\text{O}_2$  ανταποκρίνεται στην κατανάλωση  $\text{O}_2$  και το διαλυμένο  $\text{pO}_2$  διατηρείται κάτω από το προαναφερθέν επίπεδο. Η καλλιέργεια των Azospirillum σε ημιστερεά θρεπτικά υλικά παρακάμπτει αυτό το πρόβλημα χάρη στο ρυθμό διάχυσης του  $\text{O}_2$ . Οι ευκίνητοι οργανισμοί μετακινούνται προς τη ζώ-

νη με το κατάλληλο  $pO_2$  όπου και πολλαπλασιάζονται. Όταν οι ανάγκες σε  $O_2$  αυξηθούν η στοιβάδα των βακτηρίων μετακινείται πλησιέστερα προς την επιφάνεια.

Η αντοχή των Azospirillum στο  $O_2$  μεταβάλλεται με την ηλικία της καλλιέργειας και οργανισμοί με μεγάλη φάση υστέρησης είναι πιο ανθεκτικοί στο  $O_2$  σε σχέση με κύτταρα μικρής φάσης υστέρησης (Stephan et al, 1981; Volpon et al, 1981). Η αυξημένη αντοχή είναι περισσότερο έντονη στο A. lipoferum και εμφανίζεται όταν η συκέντρωση της γλυκόζης ή αλάτων γαλακτικού οξέος στο θρεπτικό υλικό είναι σε επίπεδα χαμηλότερα από 0.05% (Stephan et al, 1981; Volpon et al, 1981).

Η αντοχή σε αυξημένες συγκεντρώσεις  $O_2$  αποδίδεται σε μιά τριπλάσια αύξηση της δράσης της υδροχενάσης (HUP), η οποία φτάνει σε πολύ ψηλότερα επίπεδα απ' αυτά που παρατηρούνται στα βακτηροειδή του Rhizobium (Majer et al, 1979). Η ανακύκλωση του υδροχόνου φαίνεται να είναι πλήρης στα Azospirillum spp αλλά κανένα ίχνος έκλυσης  $H_2$  δεν παρατήρηθηκε στα παραπάνω πειράματα. Δεν είναι όμως αρκετά σαφές σε πιάο βαθμό ακριβώς η οξειδωση  $H_2$  προκαλεί χένεση ATP και κατανάλωση οξυχόνου όπως κάτι τέτοιο έχει αναφερθεί χιά την περίπτωση των βακτηροειδών Rhizobium (Ruiz-Argueso et al, 1979).

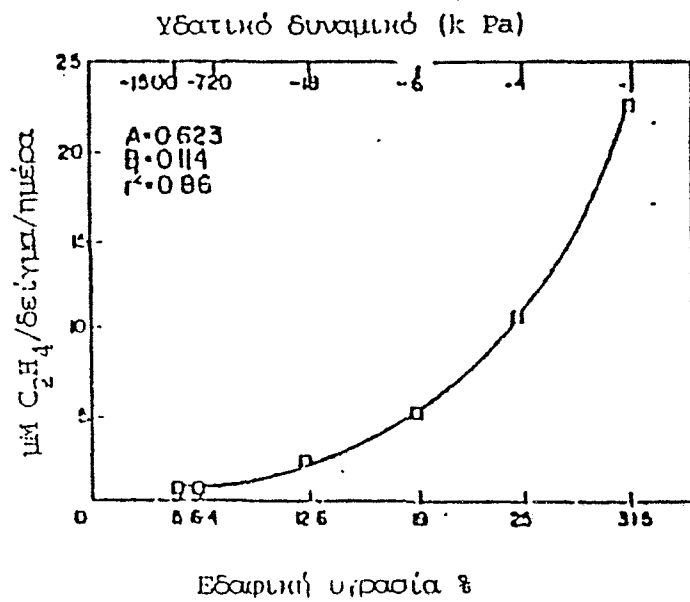
Δόχω της ιδιαίτερης ευαισθησίας που παρουσιάζει η νιτροχενάση στο οξυχόνο, η λειτουργία του μηχανισμού της αζωτοδέσμευσης δεν είναι δυνατή ύπο πλήρες αερόβιες συνθήκες και αν δεν ληφθούν μέτρα προστασίας χιά το ίδιο το ένζυμο. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν χίνει αφορούν την αζωτοδέσμευση κάτω από συνθήκες ψηλών τιμών  $pO_2$  έχιναν με τα βακτήρια A. chroococcum και A. vinelandii. Το Azotobacter μπορεί να δεσμεύει άζωτο στην

ατμόσφαιρα λόγω αναπνευστικής και ανατομικής προφύλαξης της νιτροχενάσης του και λόγω της θέσης του ενζύμου μέσα στο κύτταρο (Yates M.G. 1977). Κανένας απ' αυτούς τους μηχανισμούς δεν βρέθηκε στον A. paspali. Αναμφίβολα όμως υπάρχουν αφού τα βακτήρια αυτά μπορούν να δεσμεύουν άζωτο και να ζούν στον αέρα (Dobereiner and Day, 1975). Παρόλα αυτά η δραστηριότητα της νιτροχενάσης που σχετίζεται με το ριζικό σύστημα του P. notatum είναι ευαίσθητη σε αλλαγές  $pO_2$  (Dobereiner et al, 1972).

Έχει αναφερθεί ότι η μικροαεροφιλία αποτελεί και έναν ακόμα μηχανισμό με τον οποίο ορισμένα βακτήρια μπορούν να εκφράζουν την αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα. Καμία αναπνευστική προστασία δεν μπορεί να παρασχεθεί απ' αυτούς τους μικροοργανισμούς, υπάρχουν όμως σοβαρές ενδείξεις για μία ανατομική προστασία της νιτροχενάσης τους.

Η ικανότητα δέσμευσης αζώτου μεταβάλλεται στη διάρκεια του κύκλου αυξησεως. Έχει διαπιστωθεί ότι στο A. lipoferum οι τιμές δέσμευσης από 20 mg N/gr χλωκόζης που ήταν στην αρχή της λογαριθμικής φάσης αυξήθηκαν στο 48 mg κατά το τέλος της λογαριθμικής και στην έναρξη της φάσης στασιμότητας. Οι αντίστοιχες τιμές για το A. brasilense ήταν 15 mg και 90 mg/N γαλακτικού (Stephan et al, 1981).

Έχει αναφερθεί ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ εδαφικής υγρασίας και δραστηριότητας της νιτροχενάσης (Weier, 1980). Η εικόνα 3 δείχνει τη σχέση που έχει διαπιστωθεί μεταξύ αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας στη ριζόσφαιρα των σιτηρών και της υγρασίας του εδάφους. Μία ανάλογη επίδραση της εδαφικής υγρασίας αναμένεται λοιπόν και στη δραστηριότητα των Azospirillum. Υποτίθεται ότι η ευνοϊκή επίδραση της εδαφικής



Εικ.3: Σχέση μεταξύ εδαφικής υγρασίας και αζωτοδραστικής δραστηριότητας στο φυτό *Paspalum notatum* (Weier, 1980)

Η σχέση περιγράφεται από την εξίσωση  $y = \lambda e^{Bx}$

υγρασίας οφείλεται στην αναεροβίωση η οποία προκαλείται στα εδάφη με μεγαλύτερη υγρασία, έτσι ώστε η μικρή μερική τάση του οξυγόνου να ευνοεί υψηλότερους ρυθμούς αζωτοδέσμευσης (van Berkum and Bohlool, 1980).

Τα Azospirillum, όπως όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί προτιμούν την αμμωνία σαν πηγή αζώτου και παρουσιάζουν ταχεία ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό με πηγή αζώτου την αμμωνία, χωρίς να δεσμεύουν άζωτο. Είναι όμως δυνατόν σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας ή παρουσία αμμωνίας να δράσει ευνοϊκά στα αρχικά στάδια, διότι με την παρουσία της διευκολύνεται η ταχεία ανάπτυξη του πληθυσμού, γεγονός που συνεπάγεται την εξάντληση του μέσου σε αμμωνία και ο αυξημένος πιά πληθυσμός εισέρχεται σε φάση δέσμευσης μοριακού αζώτου (van Berkum and Bohlool, 1980).

Τα Azospirillum spp. συμμετέχουν σε όλα τα στάδια του κύκλου αζώτου εκτός της φάσης νιτροποίησης. Μπορούν και δεσμεύουν μοριακό άζωτο, επίσης επιτελούν τις αναχωχικές και αναπνευστικές λειτουργίες δια μέσου των νιτρικών. Έχουμε ακόμη αφομοίωση των νιτρικών με την βοήθεια του ενζύμου αναβολική ρεδουκτάση των νιτρικών (Neyra and van Berkum, 1977). Σε υγρά καλλιέργειες και υπό αναερόβιες συνθήκες το Azospirillum χρησιμοποιεί νιτρικά, νιτρώδη και υπονιτρώδη οξέα, ανάγει δε αυτά αντίστοιχα σε νιτρώδη, υπονιτρώδη ή μοριακό άζωτο ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος και του στελέχους (Nelson and Knowles, 1978; Tibelins and Knowles, 1984; Bothe et al, 1981; Zimmer et al, 1984; Stephan et al, 1984).

Η ρεδουκτάση των νιτρωδών (nir) αποτελεί το ένζυμο-κλειδί για την απονίτρωση (Magalhaes et al, 1978). Τα στελέχη (nir-) που δεν κάνουν απονίτρωση, εγκαθίστανται σχεδόν αποκλειστικά στις

ρίζες . Κι από τα δύο είδη Azospirillum έχουν απομονωθεί μεταλλάξεις ανθεκτικές στα ιόντα χλωρίου αλλά στερούμενες την αναβολική ρεδουκτάση των νιτρικών (nir-mutants) ή στερούμενοι την ρεδουκτάση των νιτρωδών (nir-mutants). Η τέτοια δραστηριότητα της νιτροχενάσης διατηρείται σ' αυτές τις μεταλλάξεις και συνεχίζεται ακόμη και με την παρουσία νιτρικών της τάξης των 10mM (Ferreira et al, 1987). Σε θρεπτικά υλικά με πεπτόνη τα Azospirillum αναπτύσσονται πολύ καλά και υπό αναερόβιες συνθήκες εξ αιτίας της δράσης της καταβολική ρεδουκτάση των νιτρικών που ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη ή νιτρώδη οξέα και αέριο άζωτο.

Ενώσεις που χρησιμεύουν σαν μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας σε υποστρώματα ελεύθερα αζώτου είναι τα οξέα : μηλικό, ηλεκτρικό, πυροσταφυλικό, γαλακτικό, και η φρουκτόζη. Για την περίπτωση δε του A. lipoferum είναι επίσης και η γλυκόζη και το α-κετοχλουταρικό. Αναφέρεται ακόμη πως ένας συνδυασμός οξέος (του καρβοξυλικού κύκλου) με πεντόζη αυξάνει την δραστηριότητα της νιτροχενάσης (Child and Kurz, 1978).

Το A. lipoferum όταν χρησιμοποιεί γλυκόζη ή φρουκτόζη ως πηγή άνθρακα δείχνει μικρή ζυμωτική δραστηριότητα σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν κάποια πηγή αζώτου. Γενικά όμως οι απομονώσεις αυτές αναπτύσσονται πολύ καλύτερα υπό αερόβιες παρά αναερόβιες συνθήκες. Το A. lipoferum επίσης είναι σε θέση να καθιστά όξινο το θρεπτικό υλικό με γλυκόζη ή φρουκτόζη, να παράγει μικρές ποσότητες αερίου σε καλλιέργειες με σωληνίσκους Durham, να δείχνει μικρή ανάπτυξη σε υγρά θρεπτικά υλικά με γλυκόζη ή φρουκτόζη υπό αναερόβιες συνθήκες και να σχηματίζει μικροσκοπικές αποικίες πάνω σε στερεό θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα γλυκόζη ή φρουκτόζη κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Για μερικά στελέχη τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών

μπορεί να διαφέρουν. Επίσης είναι δυνατόν να επιλεχούν στελέχη με μειωμένη ικανότητα ζύμωσης σάκχαρων. Αυτά τα στελέχη συνεχίζουν να έχουν απαιτήσεις σε βιοτίνη, να χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα σε υλικά ελεύθερα αζώτου και εμφανίζουν πλειομορφισμό που αποτελεί χαρακτηριστικό χι' αυτό το είδος (Krieg and Dobreiner, 1985).

Με την βοήθεια της αυξογραφικής μεθόδου και την χρήση θρεπτικών υλικών που περιείχαν θειικό αμμώνιο ως πηγή αζώτου (Tarrand et al, 1978) βρέθηκε ότι οι παρακάτω ενώσεις χρησιμεύουν σαν μόνες πηγές άνθρακα χι' όλα τα είδη και στελέχη Azospirillum : μηλικό, ηλεκτρικό, πυροσταφυλικό, φουμαρικό, β-υδροξυβουτυρικό, γλυκονικό (οξέα ή άλατα γενικά), γλυκερόλη, και φρουκτόζη. Το αν όμως όλες οι παραπάνω ενώσεις χρησιμοποιούνται από τα Azospirillum όταν αναπτύσσονται σε υλικά χωρίς άζωτο, είναι κάτι που δεν μπορεί να το ισχυρισθεί κανείς με σιγουριά μέχρι σήμερα.

Η γλυκόζη χρησιμοποιείται από όλα τα στελέχη του A. lipoferum αλλά από πολύ λίγα του A. brasilense. Εν τούτοις, το A. brasilense δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει την γλυκόζη σαν αποκλειστική και μοναδική πηγή άνθρακα όταν αναπτύσσεται σε θρεπτικά υλικά ελεύθερα αζώτου και δεν προκαλεί οξίνιση του υλικού όπως το A. lipoferum (Tarrand et al, 1979).

Οι απεκκρίσεις των ριζών που περιέχουν κυρίως οργανικά οξέα, σάκχαρα (υδατάνθρακες) και αμινοξέα συνιστούν την κύρια πηγή θρεπτικών υλικών χι' τη μικροχλωρίδα της ριζόσφαιρας. Τα οργανικά οξέα βοηθούν την χρήσθη ανάπτυξη και την αζωτοδεσμευτική δράση των Azospirillum, αλλά τα ίδια τα βακτήρια διαφέρουν σημαντικά ως προς την ικανότητα τους να χρησιμοποιούν τους



διάφορους υδατανθράκες (Krieg and Dobereiner, 1984). Από τη μιά μεριά το A. brasilense δεν αναπτύσσεται και ούτε δεσμεύει άζωτο στους πιά πολλούς υδατάνθρακες, ενώ το A. lipoferum από την άλλη, χρησιμοποιεί αποτελεσματικά την γλυκόζη και το A. amazonense την σακχαρόζη (Martinez-Drets et al, 1984).

Η επίδραση των αμινοξέων στην αζωτοδέσμευση από το Azospirillum δεν έχει τύχει λεπτομερούς μελέτης (Rao and Venkateswarly, 1982). Έχει όμως πειραματικά διαπιστωθεί σε περιπτώσεις άλλων μικροοργανισμών ότι τα αμινοξέα επηρεάζουν την αζωτοδεσμευτική τους δραστηριότητα (Tubb, R. S. 1976; Yoch and Pengra, 1966).

Όπως έχει διαπιστωθεί, η χρησιμοποίηση των αμινοξέων στην ανάπτυξη και η επίδρασή τους στην αζωτοδέσμευση παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στα διάφορα στελέχη των Azospirillum (Hartman et al, 1988). Έτσι, το A. brasilense αναπτύσσεται φτωχά ή καθόλου στις περιπτώσεις που το θρεπτικό υλικό περιείχε γλουταμικό, ασπαρτικό, σερίνη ή ιστιδίνη σαν μοναδικές πηγές άνθρακα. Αντίθετα το A. lipoferum και A. amazonense ύπο τις ίδιες ακριβώς συνθήκες αναπτύσσονται πολύ καλά αξιοποιώντας άριστα τις ίδιες ουσίες σαν πηγές αζώτου και άνθρακα. Με την παρουσία όμως μαλικών αλάτων ή σακχαρόζης η αζωτοδέσμευση έπεφτε απότομα και παρακωλύετο σοβαρά από τα ίδια παραπάνω αμινοξέα. Διαπιστώθηκε λοιπόν η άποψη ότι η ανάπτυξη των Azospirillum σε υλικό με ιστιδίνη σαν μόνη πηγή αζώτου-άνθρακα και ενέργειας θα μπορούσε να χρησιμοποιήθει για ταξινομικούς σκοπούς και για επιλεκτική απομόνωση του A. lipoferum (Hartman et al, 1988). Τα A. brasilense και A. lipoferum παρουσίασαν ιδιαίτερη προτίμηση στην χορήγηση γλουταμικών. Οι

τιμές του συντελεστού  $K_m$  ήταν 8 και 40  $\mu M$  αντίστοιχα, ενώ η μέγιστη τιμή  $V(V_{max})$  ήταν έξι φορές υψηλότερη στο A. lipoferum απ' ό τι στο A. brasilense (Hartman et al, 1988) στη σχέση  $V = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$ .

Τα Azospirillum διαφέρουν σημαντικά στον μεταβολισμό των αμινοξέων τόσο από ποιοτική όσο και από ποσοτική άποψη. Η διαφορετική χρησιμοποίηση των αμινοξέων από τα Azospirillum spp. μπορεί να αποδειχθεί σημαντική χιιά την εγκατάστασή τους στη ριζόσφαιρα όπως επίσης και χιιά την συνερχιστική δέσμευση του αζώτου με τους αντίστοιχους ξενιστές.

Οι παρακάτω βιοδοκιμές χιιά όλα τα Azospirillum είναι θετικές: οξειδάση, φωσφατάση, ουρεάση, υδρόλυση εσκουλίνης, ικανότητα αναερόβιας ανάπτυξης με νιτρικά σε θρεπτικό υλικό πεπτόνης, ικανότητα αφομοίωσης των νιτρικών σε νιτρώδες ή υπονιτρώδες οξύ και αέριο άζωτο. Οι παρακάτω δοκιμές είναι αρνητικές: υδρόλυση αμύλου και ζελατίνης, παραχωχή υδατοδιαλυτών χρωστικών, παραχωχή ινδολίου και οξύνιση θρεπτικών υλικών που περιέχουν λακτόζη, σακχαρόζη, ραμνόζη, κελλοβιόζη, ερυθριτόλη και δουλσιτόλη. Η αντίδραση της καταλάσης κυμαίνεται από έντονη μέχρι που μη ανιχνεύσημη.

Η άριστη θερμοκρασία αύξησης, με μοριακό άζωτο σαν μόνη πηγή αζώτου χιιά τα Azospirillum θεωρείται ότι είναι μεταξύ 32-40C. Ανάλογες άριστες θερμοκρασίες αύξησης έχουν παρατηρηθεί και χιιά όλα τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια από τροπικές περιοχές. Η δράση της νιτροχενάσης στη ριζόσφαιρα μειώνεται ή και αναστέλλεται σε θερμοκρασίες κάτω των 18 C (Day and Dobereiner, 1976). Η μελωση αυτή αποδίδεται στις δυσμενείς επιπτώσεις των χαμηλών θερμοκρασιών πάνω στα φυτά τα οποία φιλοξενούν στις ρίζες τους τα Azospirillum (van Berkum and Bohlool, 1980).

Το άριστο pH για την αζωτοδεσμευτική δράση κυμαίνεται μεταξύ 6.8 και 7.8. Η δράση των Azospirillum εντοπίζεται στα κύτταρα ή την επιφάνεια των κυττάρων της ρίζας όπου απαντώνται τέτοιες τιμές pH. Η παρουσία των Azospirillum στο έδαφος εξαρτάται από το pH, όμως οι ρίζες των σιτηρών προσφέρουν άριστες συνθήκες ανάπτυξης από πλευράς pH, έστω και αν το εδαφικό pH είναι χαμηλό (van Berkum and Bohlool, 1980).

#### 1.9. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Η βιολογική δέσμευση αζώτου είναι μιά ενζυματική αντίδραση κατά την οποία το ατμοσφαιρικό άζωτο ανάχεται σε αμμωνία. Η δέσμευση αζώτου καταλύεται από το ένζυμο νιτροχενάση, το οποίο απαιτεί ενέργεια υπό μορφή ATP και μιά βιολογικά ισχυρή αναγωγική ουσία για το σχηματισμό της αμμωνίας.

Η νιτροχενάση αποτελείται από δύο πρωτεϊνικά τμήματα, ένα μεγαλύτερου μοριακού βάρους, μη ευπαθές στο οξυγόνο που περιέχει Fe και Mo σε σχέση 17:1, και ένα μικροτέρου μοριακού βάρους, ευπαθές στο οξυγόνο, που περιέχει μόνο Fe (Ludden et al, 1978).

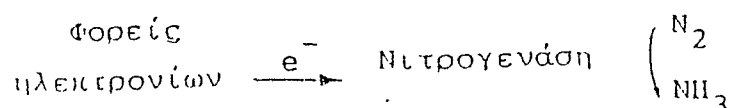
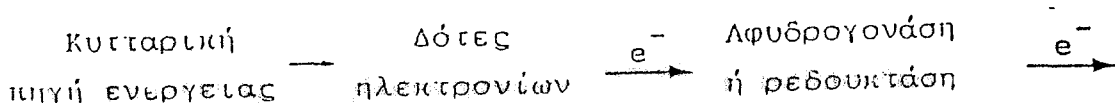
Η αναλογία των δύο τμημάτων δεν είναι γνωστή, όμως κατά τους Eady, Smith, Cook και Potsgate στο Klebsiella pneumoniae η σχέση 1:1 των πρωτεϊνικών τμημάτων Fe-Mo:Fe βρέθηκε να δίνει στο ένζυμο τη μεγαλύτερη δραστητικότητα (Brown et al, 1974). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η σχέση 2:1 Fe-Mo:Fe πρωτεϊνών είναι εκείνη που δίνει τη μεγαλύτερη δραστητικότητα στη νιτροχενάση (Beneman and Valentine, 1972)

Η νιτροχενάση ενεργεί προσθέτοντας κάθε φορά δύο ηλεκτρόνια

στο υπόστρωμα που καταλύει. Υπάρχουν ξεχωριστές θέσεις στο ένζυμο στις οποίες λαμβάνει χώρα η υδρόλυση του ATP, η οξειδωση της αναγωγικής ουσίας και η αναγωγή του υποστρώματος.

Έξ αιτίας της ευπάθειας της νιτρογενάσης στο οξυγόνο, οι μικροοργανισμοί έχουν τους εξής τρόπους προστασίας από το οξυγόνο: α. το οξυγόνο εμποδίζεται να φθάσει στη θέση αζωτοδέσμευσης λόγω της υψηλής αναπνευστικής δραστηριότητάς τους, β. προστασία λόγω αλλαγής της διαμορφώσεως του ενζύμου, αποτέλεσμα της οποίας είναι η προστασία των ευαίσθητων θέσεων του ενζύμου διότι χίνονται απροσπέλαστες στο οξυγόνο, (με τη προσωρινή, όμως, ανερχοποίηση του ενζύμου) γ. όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε μέσα με μοριακό άζωτο σχηματίζουν μία εκτεταμένη εσωτερική μεμβράνη που προστατεύει το ένζυμο από το οξυγόνο (Brown et al, 1974). Συγκεκριμένα χιά τη νιτρογενάση του A. brasilense έχει βρεθεί ότι αποτελείται από τρία τμήματα, από τις δύο πρωτεΐνες Fe και Fe-Mo που αναφέραμε και ένα παράχοντα δραστηριοποίησης της Fe πρωτεΐνης (van Berkum and Bohloul, 1980). Ο δραστηριοποιητικός παράχοντας είναι εναλλάξιμος με εκείνον του Rhodospirillum rubrum. Το σύστημα νιτρογενάσης του Azospirillum δεν απελευθερώνει in vivo  $H_2$  γιατί αυτό το τελευταίο υφίσταται ανακύκλωση με την βοήθεια της υδρογονάσης (Berlier and Lespinat, 1980; Chan et al, 1980; Volpon et al, 1981).

Η αμμώνια είναι το ενδιαμέσο προϊόν της δέσμευσης του αζώτου. Μετά το σχηματισμό της αμμωνίας αυτή ενώνεται με οργανικές ενώσεις. Πρώτη οργανική ένωση με την οποία θεωρείται ότι ενώνεται είναι το α-κετοχλουταρικό οξύ με προϊόν το γλουταμινικό οξύ:



Από το τελευταίο σχηματίζονται τα άλλα αμινοξέα μέσω των μεταβολικών οδών των κυττάρων (Alexander, 1961).

#### 1.10. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της δέσμευσης ατμοσφαιρικού αζώτου περιλαμβάνονται αυτές που στηρίζονται: α. σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά αύξησης, β. σε αναλύσεις αζώτου (περιλαμβανόμενης και της ισοτοπικής μεθόδου) και γ. στην αναγωγή εναλλακτικών υποστρωμάτων της νιτροχενάσης (π.χ. ακετυλένιο).

Οι πιο απλές μέθοδοι είναι αυτές που μετρούν την αύξηση των αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών χρησιμοποιώντας σαν παράμετρο τη παραχόμενη βιομάζα ή την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε θρεπτικά υλικά ελεύθερα αζώτου. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την επιλογή αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών. Όμως, οι μέθοδοι αυτές πολλές φορές έχουν οδηγήσει σε εσφαλμένη ταξινόμηση ιδιαίτερα σε περιπτώσεις οργανισμών με μικρές απαιτήσεις σε άζωτο και ικανούς να χρησιμοποιούν τα υπολείμματα αζώτου στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Η παρουσία κυττάρων καλουμένων ετεροκύστεις συσχετίζεται με την αζωτοδέσμευση στα κυανοφύκη χωρίς αυτό όμως, να είναι απόλυτο (μορφολογικό χαρακτηριστικό).

Οι μέθοδοι οι οποίες συνιστώνται στην ανάλυση αζώτου είναι ακριβέστερες.

Η μέθοδος Kjeldahl, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αζώτου δεν μπορεί να διαχωρίσει μεταξύ αζώτου που προήλθε από δέσμευση και αυτού από άλλες πηγές. Στην περίπτωση όμως των Rhizobium χρησιμοποιούνται μη εμβολιασθέντες μάρτυρες για τη

διόρθωση ως προς το άζωτο που προέρχεται από άλλες πηγές (Hardy et al, 1973).

Η ισοτοπική μέθοδος  $^{15}\text{N}_2$  δεν παρουσιάζει το μειονέκτημα αυτό, και είναι χίλιες φορές πιο ευαίσθητη από τη μέθοδο Kjeldahl (Hardy et al, 1973). Κατ'αυτή τη μέθοδο το αέριο  $^{15}\text{N}_2$  παρασκευάζεται από  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  με προσθήκη άλατος αλκαλίου υποβρωμιώδους οξέος ύπο κενό. Το ελευθερούμενο άζωτο  $^{15}\text{N}_2$  μεταφέρεται σε δοχείο αποθήκευσης αφού περάσει από υγρή παχίδα υπολειμμάτων  $\text{N}_2\text{O}$  ή  $\text{NH}_3$ . Το πείραμα εκτελείται σε αεροστεγείς χώρους, οι οποίοι αφού εκκενωθούν μέχρι μιας ορισμένης πίεσης, δέχονται αέριο μείγμα  $^{15}\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  και Ar. Η σύνθεση της αέριας φάσης ελέγχεται με βαλβίδα ρύθμισης και όλη η αέρια φάση ανακυκλώνεται. Με τη μέθοδο αυτή το δεσμευόμενο άζωτο είναι  $^{15}\text{N}_2$  που προσδιορίζεται με ανάλυση φασματογράφου μάζας. Με τον τρόπο αυτό δίδεται η δυνατότητα προσδιορισμού του αζώτου που αφομοιώθηκε από τα φυτά από συμβιωτική ή μη δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου. Για το σκοπό αυτό τα φυτά απομακρύνονται από το έδαφος, πλένονται προσεκτικά, ξηραίνονται στους 65 C και κονιοροποιούνται. Το άζωτο ελευθερώνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Dumas και το ισοτοπικό άζωτο ανιχνεύεται με φασματογράφο μάζας (De Polli et al, 1977).

Άλλη μέθοδος ανίχνευσης της δέσμευσης αζώτου είναι αυτή που χρησιμοποιεί εναλλακτικά υποστρώματα της νιτρογενάσης και εν συνεχεία εκτίμηση της δράσης της ανιχνευόντας τα προϊόντα. Σαν υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές ουσίες, όπως το ακετυλένιο, νιτρίλια, ισονιτρίλια και η μετατροπή του  $\text{H}^+$  σε  $\text{H}_2$ . Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα είναι το ακετυλένιο. Το προϊόν που παράχεται από την αναγωγή του ακετυλένιου με τη δράση της

νιτρογενάσης είναι το αιθυλένιο. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, και σ' αυτό οφείλεται η ευρεία διάδοση της. Η ευαισθησία της σε σχέση με την ισοτοπική μέθοδο είναι 1000 έως 10.000 φορές μεγαλύτερη, είναι απλή, διότι το προϊόν λαμβάνεται σαν δείγμα από την αέριο φάση και αναλύεται αμέσως χωρίς τη μεσολάβηση άλλων χειρισμών (Hardy et al, 1973).

Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοσθεί στα σιτηρά για την επιτόπου εκτίμηση της ικανότητας αζωτοδέσμευσης, όπως επίσης σε εδαφικά δείγματα, σε φυτά καλλιεργούμενα σε δοχεία στο θερμοκήπιο ή και σε τεμάχια ριζών.

Η σύνθεση της αέριας φάσης στα δείγματα για ανίχνευση της αζωτοδέσμευσης, εξαρτάται από τις ιδιότητες των οργανισμών των οποίων τη δράση θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί και οι φωτοσυνθέτοντες απαιτούν έλλειψη οξυγόνου ενώ οι μικροαερόφιλοι (σ' αυτούς περιλαμβάνονται τα Azospirillum) απαιτούν πολύ χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου. Το αρχό ή το ήλιο άλλα και το άζωτο χρησιμοποιούνται για την αντικατάσταση του αέρα, ενώ για τους αερόβιους οργανισμούς χρησιμοποιείται μείγμα αρχού, οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα (0,8:0,2:0,04) κατόπιν προστίθεται η επιθυμητή αναλογία ακετυλενίου (συνήθως 10%) αφού αφαιρεθεί ανάλογη ποσότητα αερίου μείγματος.

Η θεωρητική σχέση μετατροπής της αναγωγής του ακετυλενίου σε δεσμευμένο άζωτο είναι τρία (ακετυλένιο ανηχμένο: άζωτο δεσμευμένο) καθότι το άζωτο απαιτεί 6 ηλεκτρόνια για την αναγωγή του ενώ το ακετυλένιο δύο. Η πειραματικά προσδιορισμένη σχέση συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 2,4 και 4,3 αν και έχουν αναφερθεί και ακραίες τιμές (25) (Hardy et al, 1973).

Τα προβλήματα της μεθόδου είναι αρκετά και χι'αυτό έχει δεχθεί αρκετές κριτικές.

Έξ αιτίας της αδυναμίας των εδαφικών δειγμάτων να ανάχουν το ακετυλένιο αμέσως, προτάθηκε να αφήνονται αυτά μετά τη συλλογή χιιά 1-3 ημέρες ώστε να ισορροπήσουν, πρώτου υποβληθούν στη δοκιμή της αναχωής του ακετυλενίου (Tien et al, 1979). Άλλοι πάλι ισχυρίζονται πως, αν τα εδαφικά δείγματα φυλάσσονται και ποτίζονται χιιά μερικές ημέρες πριν τη δοκιμή, παρατηρούνται εσφαλμένα υψηλότεροι ρυθμοί δέσμησης αζώτου (van Berkum and Bohlool, 1980).

Η ικανότητα παραχωής αιθυλενίου από μικροοργανισμούς του εδάφους είναι χνωστή κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Η οξείδωση του παραχόμενου αιθυλενίου από άλλους μικροοργανισμούς λαμβάνει χώρα με ρυθμό 50 φορές μεγαλύτερο από τη παραχωή του αιθυλενίου, έτσι ώστε να μη παρατηρείται σημαντική συσσώρευση του στο έδαφος. Όμως το ακετυλένιο αποτελεί ανασταλτικό παράχοντα της οξείδωσης του αιθυλενίου ώστε να είναι πιθανή η συσσώρευσή του στα δείγματα που δέχθηκαν ακετυλένιο. Είναι προφανές ότι οι μάρτυρες χωρίς ακετυλένιο δεν έχουν νόημα (van Berkum and Bohlool, 1980).

Η αρχική διάχυση του αιθυλενίου και του ακετυλενίου στο έδαφος και ο ρόλος του ακετυλενίου ως ανταγωνιστικού παρεμποδιστή της αζωτοδέσμησης θεωρούνται άλλοι δύο παράχοντες που κλονίζουν την αξιοπιστία της μεθόδου. Αν και η επίδραση της επώασης με ακετυλένιο στη βιοχημεία της νιτροχενάσης είναι πολύπλοκη, θεωρείται ότι συμβάλνει μία αύξηση του ρυθμού αναχωής του ακετυλενίου σε σχέση με την πραχματική δέμευση του αζώτου. Το χεχονός αυτό προκαλεί μία υπερεκτίμηση της δέσμησης αζώτου στο έδαφος.



Είναι γενικά αποδεκτό ότι δοκιμές μικρής χρονικής διάρκειας είναι πιο αξιόπιστες από εκείνες που προέρχονται από παρατεταμένη επώαση σε ακετυλένιο (van Berkum and Bohlool, 1980).

Το κυριότερο πρόβλημα της μεθόδου της αναχωχής του ακετυλενίου σε τεμάχια ριζών από σιτηρά, είναι η καθυστέρηση αναχωχής του ακετυλενίου για 8-18 ώρες από την έναρξη της επώασης των ριζών. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με την κινητική της αναχωχής του ακετυλενίου από όλους τους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς. Η χρονική αυτή υστέρηση εξαρτάται από την εποχή, τη λίπανση με άζωτο και την πορεία ανάπτυξης του φυτού. Για την άρση του φαινομένου αυτού εφαρμόζεται προεπώαση των ριζών από το βράδυ χωρίς ακετυλένιο σε χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου. Κατ' αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η άμεση ανίχνευση της αναχωχής του ακετυλενίου.

Καμμία λοιπόν μέθοδος ανίχνευσης της αζωτοδέσμευσης δεν θα μπορούσε να χαρακτηριστεί τέλεια. Η μέθοδος αναχωχής του ακετυλενίου έχει επικρατήσει λόγω της εύκολης και χρήσιμης εφαρμογής και της μεγαλύτερης ευαισθησίας. Χρειάζεται όμως να βελτιωθεί για να αρθούν οι αδυναμίες που αναφέρθηκαν.

### 1.11. Ο ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΙΤΗΡΩΝ ΜΕ Azospirillum.

#### Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ Azospirillum.

Μιά σημαντική δυσκολία με την οποία ερχόμαστε αντιμέτωποι όταν αναλύουμε αποτελέσματα πειραμάτων με Azospirillum είναι η παντελής σχεδόν έλλειψη χρησιμοποίησης τεχνικών με  $^{15}\text{N}_2$  ή άλλων ποσοτικών μεθόδων ανίχνευσης του δεσμευόμενου μοριακού αζώτου. Είναι αδύνατο συνεπώς να γνωρίζουμε αν ο αυξημένος εμπλουτισμός του εδάφους σε άζωτο προέρχεται από αζωτοδέσμευση ή άλλες πηγές αζώτου.

Οι Vlassak και Reynders (1981) έχουν συμπεράνει ότι ο εμβολιασμός στο χωράφι με Azospirillum spp. είναι ένας σημαντικός παράγοντας αύξησης της παραγωγής και απόδοσης ακόμα και σε καλλιεργητικά συστήματα όπου το εδαφικό άζωτο δεν αποτελεί το κύριο πρόβλημα. Παρατήρησαν όμως πως η "παραγωγή αυξητικών ουσιών από Azospirillum spp. φαίνεται να έχει πολύ πιο μεγάλη σημασία απ' ότι έχει η οποιαδήποτε αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα".

Είναι γνωστό πως οι γιβερελλίνες και οι αυξίνες (Tien et al, 1979) επιδρούν ευνοικά στην συνολική ανάπτυξη του φυτού αλλά η συμβολή του εμβολιασμού με Azospirillum είναι αμφισβητήσιμη (Vose P.B. 1983). Οι Tien et al (1978) βρήκαν πως, εμβολιασμός του Penisetum americanum με Azospirillum είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των ριζικών τριχιδίων καθώς και του βάρους των βλαστών χωρίς να παρατηρηθεί καμμία δραστηριότητα της νιτροχενάσης (Vose P.B. 1983).

Σε μερικές περιπτώσεις τα αποτελέσματα του εμβολιασμού ήταν σχεδόν ασήμαντα ή ακόμα κατέληξαν σε μία μικρή ελάττωση της

φυτικής παραγωγής και του συνολικού αζώτου (Bouton et al, 1979; Ruschel et al, 1982). Σε μερικά πειράματα όμως, παρουσιάστηκε δυνατότητα αζωτοδέσμευσης όταν χονότυποι εμβολιασμός με Azospirillum spp. O Nur et al (1980) σε πειράματά τους πέτυχαν τόσο αύξηση του βάρους, όσο και την συνολική περιεκτικότητα σε αζώτο φυτών Setaria italica και αραβοσίτου όταν τα εμβολίασαν με Azospirillum σε έδαφος υπό συνθήκες θερμοκηπίου. Ενώ οι Cohen et al (1980) πέτυχαν αύξηση της ξηρής ουσίας και του συνολικού αζώτου όταν εμβολίασαν φυτά αραβοσίτου καλλιεργούμενα υπό στείρες συνθήκες σε ειδικά βάζα χωνοστά σαν Leonard jars.

Σε πειράματά τους με Setaria italica και αραβόσιτο, εμβολιασμένα με A. brasilense στο χωράφι, οι Kapulnik et al, (1983) αναφέρουν σημαντική αύξηση τόσο του ξηρού βάρους όσο και του περιεχόμενου αζώτου. Οι Nur et al, (1980) έκαναν μιά σειρά πειραμάτων στο χωράφι στο Ισραήλ στα οποία εμβολίασαν με A. brasilense συνδιάζοντας ταυτόχρονα και διάφορες δόσεις αζωτούχου λιπασμάτος. Στην Αίγυπτο μετά από εμβολιασμό με A. brasilense του σιταριού στο χωράφι, οι Hegazi et al, (1983) βρήκαν πως αύξανε ο αριθμός των ώριμων αδελφών, και κατά συνέπεια η συσκομιδή καθαρού σπόρου και σανού. Οι Rinaudo et al, (1981) βρήκαν ακόμη πως τα αποτελέσματα εμβολιασμού στο ρύζι εξαρτώνταν από το είδος του στελέχους Azospirillum, τον χονότυπο του φυτού και τον τύπο του εδάφους. Βρήκαν ακόμη στο ίδιο πείραμα πως η παρουσία ακτινομυκήτων μείωνε σημαντικά την δραστηριότητα αναγωγής του ακετυλενίου. Επίσης στη νότιο Γαλλία υπό Μεσογειακό κλίμα, από πειράματα με σιτάρι (Triticum aestivum) σε χλάστρες ή στο χωράφι διαπιστώθηκε ότι ο εμβολιασμός των φυτών με A. brasilense (Warenbourg et al, 1987) είχε σημαντική επίδραση στην αύξηση

του αριθμού των βλαστών και ριζών καθώς και αύξηση του λόγου της βιομάζας ξηρό βάρος βλαστών : ξηρό βάρος ριζών.

Έχουν αναφερθεί τρεις κύριοι μηχανισμοί για την ερμηνεία του συνεργισμού (O'Hara et al, 1987):

α. Η διάθεση του δεσμευμένου αζώτου από το βακτήριο στο φυτό (Rennie, 1980)

β. Παραγωγή αυξητικών ορμονών από τα βακτήρια (Tien et al, 1979)

γ. Αύξηση της απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων από τα φυτά οφειλόμενη επίσης στα βακτήρια (Lin et al, 1983).

Κατά συνέπεια για να μπορούμε να πετύχουμε έναν παραχωχικό συνεργισμό μεταξύ Azospirillum και ριζικού συστήματος πρέπει να είμαστε σε θέση να κάνουμε και τις κατάλληλες επεμβάσεις σ' αυτά τα συστήματα.

Στον πίνακα 5 δίνονται μερικοί παράγοντες για πιθανούς μελλοντικούς χειρισμούς που στοχεύουν σε αποτελεσματικότερο συνεργισμό.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 5

1. Επιλογή ενεργών στελεχών <u>Azospirillum</u>
μεγάλη δυνατότητα προσβολής και εγκατάστασης στις ρίζες μεγάλη ανταγωνιστική ικανότητα μεγάλη δραστηριότητα και αποτελεσματικότητα νιτρογενάσης άριστη παραγωγή φυτικών ορμονών
2. Επιλογή των κατάλληλων φυτικών ειδών και ποικιλιών
να παρέχουν άριστα χαρακτηριστικά ενδοριζόσφαιρας χαμηλό $pO_2$ , ουδέτερο pH μεγάλη διαθεσιμότητα ενέργειας στο ριζικό σύστημα χωρίς να επιδρά στη αναμενόμενη παραγωγή
3. Πρόβλεψη για άριστες περιβαλλοντικές συνθήκες
υψηλή θερμοκρασία και μόνωση ουδέτερα και υγρά εδάφη εφαρμογή της κατάλληλης αρχικής δόσης αζωτούχων λιπασμάτων μεγάλη περιεκτικότητα Mo και σχετικά χαμηλή K στο έδαφος παρουσία των συνεργιστικών οργανισμών στο ριζικό σύστημα

1.12. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ Azospirillum ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ ΤΩΝ ΣΙΤΗΡΩΝ

Τα Azospirillum spp. στη ριζόσφαιρα των σιτηρών αλληλεπιδρούν τόσο με τις ρίζες όσο και με τους άλλους μικροοργανισμούς, μύκητες βακτήρια, κ.λ.π.. Οι σχέσεις αυτές μπορεί να είναι συνεργιστικές (Tilak et al, 1982; Chamber et al, 1980) ή ανταγωνιστικές (Boven et al, 1979; Sivasithamparam et al, 1979).

Σε συνθήκες αχρού έχουν ερευνηθεί οι πιθανές συνεργιστικές σχέσεις μεταξύ δύο ελεύθερων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, Azospirillum-Azotobacter (Tilak et al, 1982) καθώς μεταξύ συμβιωτικών και ελεύθερων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, Azotobacter-Rhizobium και Azospirillum-Rhizobium (Jazek Pazinski and Barry R. Golfe, 1985) τα οποία χωρίς να σχηματίζουν φυμάτια, αυξάνουν σημαντικά την απόδοση των ψυχανθών.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλη σημασία έχουν δοθεί στις συνεργιστικές σχέσεις μεταξύ μυκορριζών και συμβιωτικών ή ελεύθερων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Έχουν ερευνηθεί οι πιθανές ευνοϊκές σχέσεις, σε γλάστρες ή σε συνθήκες αχρού μεταξύ Rhizobium-V.A.M. (vesicular-arbuscular-mycorrhiza) (Aguilar and Barea, 1981; Chamber et al, 1980) και Azospirillum-V.A.M. (Barea et al, 1983; Subba Rao et al, 1985; Pakovski et al, 1985).

Από τους μύκητες που έχουν χρησιμοποιηθεί το κυριότερο γένος που έχει αναφερθεί είναι το γένος Glomus (G. moscae, G. fasciculatum κ.λ.π.).

Δεν υπάρχει όμως καμία πληροφορία σχετική με τον μη παθογόνο μύκητα Phialophora radicicola var. graminicola, ο οποίος αν και δεν είναι αυστηρά μυκορριζικός φιλοξενείται κατά κανόνα στο ριζι-

κο σύστημα των σιτηρών (Balis, 1969; Scott, 1970). Ο τρόπος εκκατάστασης του είναι όμοιος μ' αυτών του παθογόνου Gaeumannomyces graminis. Σε καλλιέργεια ο μύκητας είναι σαφώς διαφορετικός από τον G. graminis έχει περίπου το μισό ρυθμό γραμμικής αύξησης σε P.D.A. και στους 25 C και σχηματίζει περισσότερο εναέριο μυκήλιο. Οι αποικίες είναι χρώματος ανοικτού γκρι μέχρι σκούρο γκριζοπράσινο αποτελούμενες από υφές λεπτές, υαλώδης, διαμέτρου 1-3 μm. Παρατηρούνται επίσης υφές με σκούρα κυτταρικά τοιχώματα, διαμέτρου 2-4 μm, οι οποίες σχηματίζουν μερικές φορές δέσμες ή ομάδες σφαιρικών έως ελλειψοειδών κύτταρων με σκούρα κυτταρικά τοιχώματα (η μεγάλη διάμετρος φθάνει τα 20 μm), τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους με ευδιάκριτους κυκλικούς πόρους. Δεν έχει διαπιστωθεί τέλεια μορφή, αλλά σχηματίζονται κονίδια κατά κεφαλές στις κορυφές των φιαλιδίων τα οποία δημιουργούνται πλαγίως ή επακρίως από υαλώδης ή σκοτεινοχρώμους απλούς ή διακλαδιζόμενους κονιδιοφόρους. Το μέγεθος των φιαλιδίων κυμαίνεται 5-20 μm μήκος \* 1-3 μm διάμετρος στο πιο διεσταλμένο σημείο.

Ο P. radicicola απομονώθηκε για πρώτη φορά από το Mc Keen (1952) από τις ρίζες αραβοσίτου. Ο Deacon τον μετονόμασε σε P. radicicola Cain var. graminicola Deacon και τον συνέκρινε με τον μύκητα G. graminis που προκαλεί την αδρομύκωση (take-all disease) των σιτηρών και με άλλους μύκητες που σχηματίζουν επιφανειακές διατρέχουσες υφές πάνω στις ρίζες των σιτηρών. Έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία του P. radicicola στο ριζικό σύστημα των αχροστωδών ασκεί παρεμποδιστική δράση επί του G. graminis (Balis, 1970).

Έχει αναφερθεί επίσης ότι, σε υποστρώματα με ασπαραχίνη ή ασπαρατικό οξύ ο μύκητας P. radicicola var. graminicola παράγει βιοτίνη. (Balis, 1969)

Μολονότι η φυσιολογική σχέση μεταξύ P. radicicola var. graminicola και φυτού έχει μελετηθεί αρκετά, η πιθανή σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ των P. radicicola και Azospirillum δεν έχει διερευνηθεί. Επειδή και οι δύο μικροβιακοί πληθυσμοί συμμερίζονται τον ίδιο ξενιστή και υπόκεινται στους ίδιους φυσικούς, χημικούς, γενικά εδαφικούς παράγοντες, είναι πιθανόν να υφίστανται σχέσεις αλληλεπίδρασεως οι οποίες ενδεχόμενα να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών ξενιστών.

Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί η αμοιβαία συμβιωτική ικανότητα διαφόρων στελεχών του γένους Azospirillum, οι βιοχημικές ιδιοτητές τους, η επίδραση τους στην ανάπτυξη του σιταριού, καθώς και οι πιθανές συνεργιστικές σχέσεις με τον μη παθογόνο μύκητα Phialophora radicicola var. graminicola.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση, καλλιέργεια, βιοδοκιμές, μικροσκοπικές παρατηρήσεις, έλεγχο της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας και διατήρηση των καλλιεργειών:

1. Υλικό διατήρησης ελεύθερο αζώτου με την ακόλουθη σύσταση:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4gr,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1gr,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2gr,  $\text{NaCl}$  0,1gr,  $\text{CaCl}_2$  0,02gr,  $\text{FeCl}_3$  0,01gr,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,002gr, μηλικό οξύ 5gr, εκχύλισμα ζύμης 0,005%, απεσταχμένο νερό 1λίτρο. pH 7,2-7,4. (Κατάλογος ATCC 1982).

Στις περιπτώσεις που χρειάστηκε, χρησιμοποιήθηκε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε ποσότητα 15gr άχαρ. Το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε και για την αρχική ανάπτυξη (αναχένηση) των λυοφιλιωμένων καλλιεργειών.

2. Εκλεκτικό υλικό ελεύθερο αζώτου (RC) (Rodrigues Caceras 1982) με την ακόλουθη σύσταση:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5gr,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2gr,  $\text{NaCl}$  0,1gr, εκχύλισμα ζύμης 0,5gr,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,015gr, μηλικό οξύ 5gr,  $\text{KOH}$  4,8gr, άχαρ 20gr, απεσταχμένο νερό 1 λίτρο. pH 7,0 με τη προσθήκη διαλύματος  $\text{KOH}$  0,1N. Προστέθηκαν επίσης 15ml 1/400 υδατικού διαλύματος χρωστικής κόκκινο του κόκκο ανά λίτρο που αποστειρώθηκε χωριστά και προστέθηκε πριν τη χρήση. Χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση στελεχών Azospirillum.

3. Μη εκλεκτικό υλικό (BMS) (Baldani and Dobereiner, 1980) με την ακόλουθη σύσταση: μηλικό οξύ 2,5gr, σακχαρόζη 2,5gr,  $\text{KOH}$  2gr, εκχύλισμα 200gr πατάτας, διάλυμα βιταμινών 1ml περιέχοντας 10mg βιοτίνης και 20mg πυριδοξίνης (B) ανά 100ml νερό, δεικτής κυανού



βρωμοθυμόλης (0,5% σε αιθανόλη). Το pH ρυθμίστηκε στο 7,0 με καυστικό κάλι. Προστέθηκαν 17gr άχαρ και απεσταχμένο νερό μέχρι όγκου 1 λίτ. Χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο καθαρότητας των στελεχών Azospirillum.

4. Ημιστερεό θρεπτικό υλικό ελεύθερο αζώτου (SS) με την εξής σύσταση:  $K_2HPO_4$  6gr,  $KH_2PO_4$  4gr,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2gr, NaCl 0,1gr,  $CaCl_2$  0,02gr, μηλικό οξύ 5gr, NaOH 3gr, εκχύλισμα ζύμης 0,1gr,  $FeCl_3$  10mg,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  2mg,  $MnSO_4$  2,1mg,  $H_3BO_3$  2,8mg,  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$  0,04 mg,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,24mg, pH 6,8. Προστέθηκε 0,5gr άχαρ στο λίτρο για τη δημιουργία του επιδιωκόμενου ημιστερεού μέσου που εξασφαλίζει μικροαερόφιλες συνθήκες ανάπτυξης (Okon et al, 1977). Χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας των καλλιεργειών και για μικροσκοπικές παρατηρήσεις.

5. Ημιστερεό θρεπτικό υλικό ελεύθερο αζώτου (SSS). Η σύστασή του είναι εκείνη του ημιστερεού υλικού SS με προσθήκη 200mg θειικής στρεπτομυκίνης ανά λίτρο θρεπτικού υλικού (Bashan and Levano, 1985). Χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ειδών του γένους Azospirillum.

6. Θρεπτικό υλικό (MPSS) με την ακόλουθη σύσταση ανά λίτρο: ηλεκτρικό οξύ 1gr,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1gr,  $(NH_4)_2SO_4$  1gr,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,002gr,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0,002gr, πεπτόνη 5gr, pH 6,8 (Caraway and Krieg, 1974). Χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αναγκών σε βιοτίνη.

7. Ημιστερεό θρεπτικό υλικό (Nfb medium) ελεύθερο αζώτου με την ακόλουθη σύσταση: μηλικό οξύ 5gr,  $K_2HPO_4$  0,5gr,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2gr, NaCl 0,1gr,  $CaCl_2$  0,02gr, διάλυμα ιχνοστοιχείων ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0,2gr,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,235gr,  $H_3BO_3$  0,28gr,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,008gr,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,024gr, απεσταχμένο νερό 1 λίτρο) 2,0ml, κυανόν της βρωμοθυμόλης (διάλυμα 0,5% σε νερό (διαλυμένο σε 0,2N KOH)) 2,0ml, FeEDTA

(διάλυμα 1,64%) 4ml, διάλυμα βιταμινών (βιοτίνη 0,01gr, πυριδοξίνη 0,02gr, απεσταχμένο νερό 1 λίτρο) 1,0ml, ΚΟΗ 4gr, pH 6,8 με τη προσθήκη του ΚΟΗ, άχαρ 1,75gr, απεσταχμένο νερό 1 λίτρο (Krieg and Dobereiner, 1985). Χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας των καλλιεργειών και για μικροσκοπικές παρατηρήσεις.

## 2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ Azospirillum.

Γιά το σκοπό αυτό έγινε δειγματοληψία φυτών από τον πειραματικό αγρό του εργαστηρίου Γεωργίας της ΑΓΣΑ. Η δειγματοληψία έγινε το απόγευμα (Μάρτιος 1986) (Day et al, 1975). Συλλέχθηκαν φυτά με το ριζικό τους σύστημα από τα εξής είδη: Panicum miliaceum, Hordeum vulgare spp. distichum, Triticum turgidum spp. durum, Zea mays. Μετά τη μηχανική απομάκρυνση της περίσσειας του εδάφους από το ριζικό σύστημα, οι ρίζες ξεπλύθηκαν με νερό και στεχνώθηκαν με διηθητικό χαρτί.

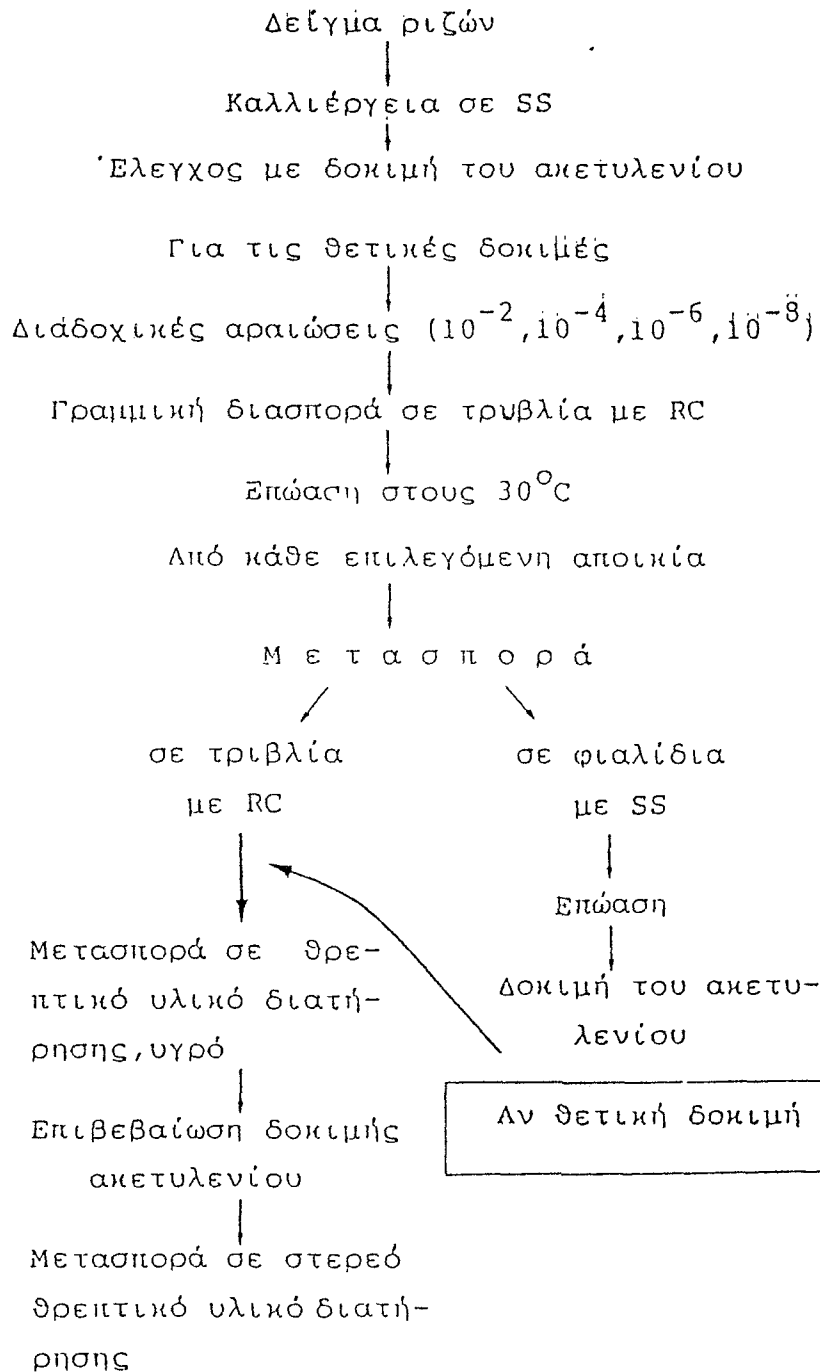
Μικρά τμήματα ριζών, κόκκοι εδάφους κολλημένοι με τις ρίζες και κόκκοι εδάφους από τα δείγματα αυτά μεταφέρθηκαν εις τριπλούν υπό ασηπτικές συνθήκες σε φιαλίδια όγκου 7ml με εκλεκτικό ημιστερεό υλικό SSS. Τα φιαλίδια επώασθηκαν στους 30 C. Μετά 4 ημέρες και αφού είχε αναπτυχθεί μικροβιακός πληθυσμός στα φιαλίδια προσθέσαμε ακετυλένιο σε αναλογία 10% της αέριας φάσης χιά να διαπιστωθεί σε ποιά φιαλίδια υπάρχουν αζωτοδεσμευτικοί πληθυσμοί. Από τα φιαλίδια χιά κάθε είδος φυτού που έδειξαν τη μεγαλύτερη ένδειξη αναγωγής του ακετυλενίου πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ , και από κάθε αραιώση έγινε γραμμική διασπορά (streaking) σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό RC με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου.

Και στις δύο περιπτώσεις δειγματοληψίας ριζών και χύματος επιχειρήθηκε με επανειλημμένες γραμμικές διασπορές σε τρυβλία με RC, η απομόνωση σε καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων του γένους Azospirillum με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών και την αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα.

Η γενική πορεία που ακολουθήθηκε δίδεται στο σχήμα Α.

### Σχήμα Α

Πορεία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση βακτηρίων του γένους *Azospirillum*



### 2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ Azospirillum.

Γιά την κατάταξη των απομονώσεων σε περιγραφέντα είδη Azospirillum brasilense και Azospirillum lipoferum (Tarrand et al, 1978), εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες βιοχημικές δοκιμές (Krieg and Doberiner, 1984):

2.3. 1. Έλεγχος της ικανότητας χρησιμοποίησης γλυκόζης σαν μόνη πηγή άνθρακα. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Από καλλιέργειες διατήρησης εμβολιάσθηκαν φιαλίδια με ημιστερεό θρεπτικό υλικό SS και επώασθηκαν στους 37 C για 3 ημέρες. Από τις καλλιέργειες αυτές εμβολιάσθηκαν 4 δοκιμαστικοί σωλήνες για κάθε στέλεχος που περιείχαν ημιστερεό θρεπτικό υλικό της παρακάτω σύστασης:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4gr,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1gr,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2gr,  $\text{NaCl}$  0,1gr,  $\text{CaCl}_2$  20mg,  $\text{FeCl}_3$  10mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2mg, άχαρ 1,75gr, βιοτίνη 0,1mg, γλυκόζη 10gr απεσταχμένο νερό 1 λίτρο. Η επώαση έγινε στους 37 C και η παρατήρηση για ανάπτυξη ή μη έγινε μετά από τρεις ημέρες. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

2.3. 2. Έλεγχος των απαιτήσεων σε βιοτίνη. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: θρεπτικό υλικό MPSS εμβολιάστηκε από καλλιέργειες διατήρησης από τα υιό εξέταση στελέχη και επώασθηκε στους 37 C. Οι καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν στο MPSS, μεταφέρθηκαν σε 25 ml θρεπτικό υλικό "Nutrient broth" αραιωμένο κατά το 1/4 και επώασθηκαν στους 37 C για 48 ώρες. Κατόπιν τα κύτταρα συσκομίσθηκαν με φυχοκέντριση και ξεπλύθηκαν δύο φορές με απεσταχμένο αποστειρωμένο νερό. Τα εκπλυθέντα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό δοκιμαστικών σωλήνων που περιείχαν το θρεπτικό υλικό της παρακάτω σύστασης:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5gr, ηλεκτρικό οξύ 5gr,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01gr,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,002gr,  $\text{MgSO}_4$

$7\text{H}_2\text{O}$  0,2gr,  $\text{NaCl}$  0,1gr,  $\text{CaCl}_2$   $2\text{H}_2\text{O}$  0,026gr,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,0gr, απεσταχμένο νερό 1 λίτρο, pH 7,0. Ετοιμάσθηκαν δύο σειρές σωλήνων  $A_1$  και  $A_2$ . Η πρώτη σειρά  $A_1$  περιείχε το παραπάνω θρεπτικό υλικό και η  $A_2$  επιπροσθέτως 0,0001gr βιοτίνης ανά λίτρο. Οι βιοδοκιμές έγιναν εις τριπλούν και το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές χιά την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

2.3. 3. Διαφορά στον πλειομορφισμό μεταξύ *A. lipoferum* και *A. brasilense*. Από μιά καλλιέργεια 24 ωρών σε υγρά θρεπτικό υλικό MPSS μεταφέρεται με την βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου μιά ποσότητα και εμβολιάζεται σε δοκιμαστικό σωλήνα με ημιστερεό θρεπτικό υλικό ελεύθερου αζώτου το οποίο περιέχει άλατα μαλικού οξέος (Nfb medium). Οι καλλιέργειες εξετάζονται στο μικροσκόπιο μετά από επώαση 24-48 ωρών στους 37 C.

2.3. 4. Αυξοχρωφική μέθοδος χιά μεμονωμένες πηγές άνθρακα.

Σε 500 ml απεσταχμένου νερού διαλύονται τα παρακάτω συστατικά:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,0gr,  $\text{MgSO}_4$   $7\text{H}_2\text{O}$  1,0gr,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,0gr,  $\text{FeCl}_3$   $6\text{H}_2\text{O}$  0,004gr,  $\text{MnSO}_4$   $\text{H}_2\text{O}$  0,0025gr,  $\text{ZnSO}_4$   $7\text{H}_2\text{O}$  0,00072gr,  $\text{CuSO}_4$   $5\text{H}_2\text{O}$  0,000125gr,  $\text{CoSO}_4$   $7\text{H}_2\text{O}$  0,00014gr,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,000031gr και  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   $2\text{H}_2\text{O}$  0,000245 gr. Το pH ρυθμίζεται στο 7,0 με KOH. Προστίθενται 0,0001gr βιοτίνης και 0,001gr  $\text{CaCO}$  και το θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται στο αυτόκλειστο στους 121 C χιά 20'. Το αποστειρωμένο υλικό μεταφέρεται ασηπτικά σε ίσο όγκο αποστειρωμένου διαλύματος άχαρ (15gr άχαρ σε 500 ml απεσταχμένου νερού αποστειρωμένου στο αυτόκλειστο στους 121 C χιά 20') θερμοκρασίας 45-50 C. Τα κύτταρα προετοιμάζονται όπως χιά το προσδιορισμό των αναγκών σε βιοτίνη εκτός του ότι το τελικό αιώρημα πρέπει να είναι πιό πυκνό. Δύο ml αιωρήματος κυττάρων χρησιμοποιούνται χιά να αναμιχθούν με 20 ml λυωμένου θρεπτι-

κου υλικού θερμοκρασίας 45-50 C μέσα σε τρυβλία Petri. Μετά τη στερεοποίηση του υλικού, αποστειρωμένοι δίσκοι χαρτιού διαμέτρου 7 mm εμβαπτίζονται σε υδατικά διαλύματα 5 % (w/v) πηχών άνθρακα που έχουν αποστειρωθεί με διήθηση (Τα διαλύματα οργανικών οξέων ρυθμίζονται σε pH 7,0 με KOH πριν από την αποστείρωση). Στη συνέχεια οι εμποτισμένοι δίσκοι τοποθετούνται σε τρυβλία (4 δίσκοι / τρυβλίο στην επιφάνεια των οποίων έχουν διασπαρεί τα κύτταρα του υπό δοκιμή πληθυσμού. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 C για 72 ώρες. Κάθε ορατή ζώνη θολώτητας χύρω από τους δίσκους όπως διαπιστώνεται κρατώντας τα τρυβλία μπροστά από ένα μαύρο φόντο και φωτίζοντας τα από μπροστά και λόξα θεωρείται ότι αποτελεί θετική ανταπόκριση αυξήσεως.

### 2.3. 5. Παραχωχή οξέος σε θρεπτικό υλικό πεπτόνης-γλυκόζης.

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο θρεπτικό υλικό (gr/l): πεπτόνη 2,0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,0,  $(NH_4)_2SO_4$  1,0,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0,002,  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  0,002 κυανού της βρωμοθυμόλης (διαλυμένο σ' αραιό KOH) 0,025. Το θρεπτικό υλικό παρασκευάζεται σ' έναν όγκο 950 ml, ρυθμίζεται σε pH 7,0 και αποστειρώνεται στο αυτόκλειστο. Αφού κρυώσει προστίθενται ασηπτικά 50 ml διαλύματος 20 % (w/v) γλυκόζης (αποστειρωμένου με διήθηση). Ο σχηματισμός ενός κίτρινου χρώματος, μετά 96 ώρες επώαση στους 37 C δείχνει την παραχωχή οξέος.

### 2.3. 6. Ζυμωτική ικανότητα.

Γιά τον έλεγχο της ζυμωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό που περιγράφηκε προηγουμένως για την παραχωχή οξέων, και εφαρμόσθη η ακόλουθη διαδικασία.

Δοκιμαστικοί σωλήνες με θρεπτικό υλικό πεπτόνης γλυκόζης ή φρουκτόζης εμβολιάζονται και τοποθετούνται σε αναερόβια δοχεία (Gas Pak BBL). Τα δοχεία εκκενώνονται από τον αέρα και

εκπλένονται μία φορά με άζωτο και ακολούθως τρεις φορές με υδροχόνο. Ο σωλήνας του αποχρωματισμένου δείκτη παρασκευάζεται ως εξής: ετοιμάζονται τρία έτοιμα διαλύματα: α. ένα διάλυμα 6% γλυκόζης σε απεσταχμένο νερό β. 6 ml N/10 NaOH αραιωμένων σε 100 ml με απεσταχμένο νερό και γ. 3 ml 0,5% υδατικού διαλύματος κυανού του μεθυλενίου αραιωμένων σε 100 ml με απεσταχμένο νερό (0,015%). Κάθε φορά που χρειάζεται διάλυμα δείκτη αναμιχνούνται ίσα μέρη από τα τρία έτοιμα διαλύματα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα και το μείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας βρασμού μέχρις αναχωχής του κυανού του μεθυλενίου.

Ο σωλήνας του αποχρωματισμένου δείκτη τοποθετείται αμέσως στον εξωτερικό πλευρικό σωλήνα του αναερόβιου δοχείου. Η επώαση γίνεται στους 37 C για δύο εβδομάδες. Ο σχηματισμός κίτρινου χρώματος υποδηλώνει την παραγωγή οξέος.

#### 2.4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ Azospirillum.

##### 2,4. 1. Οξειδάση (Smibert and Krieg, 1981)

Ένα τεμάχιο διηθητικού χαρτιού υγραίνεται με μερικές σταχόνες διαλύματος 1% διυδροχλωριούχου τετραμεθύλ-π-φαινυλενοδι-αμίνης το οποίο παρασκευάζεται την ίδια ημέρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Με ένα πλατινένιο μικροβιολογικό κρίκο (κρίκος από συνηθισμένος σύρμα χρωμονικελίνης μπορεί να δώσει ψεύτικη θετική αντίδραση) παραλαμβάνεται μικροβιακή μάζα από την επιφάνεια του "Nutrient agar" και απλώνεται στην επιφάνεια του χαρτιού που έχει υγρανθεί. Θετική αντίδραση: σχηματισμός υδρούς ή πορφύρου χρώματος μέσα σε 10".



#### 2.4. 2. Καταλάση (Smibert and Krieg, 1981).

Εμβολιάζεται ένας δοκιμαστικός σωλήνας με "Nutrient agar". Έπειτα από επώαση προστίθεται στάχδην 1ml διαλύματος 3% υπεροξειδίου του υδροχόνου στην επιφάνεια του άχαρ. Ο σωλήνας εξετάζεται αμέσως και ύστερα από 5' για την έκλυση φυσαλίδων, πράγμα που δείχνει θετική αντίδραση.

#### 2.4. 3. Υδρόλυση εσκουλίνης (Smibert and Krieg, 1981).

Καλλιεργούνται τα στελέχη σε "Nutrient agar" συμπληρωμένο με 0,01% εσκουλίνη και 0,05% κιτρικό σίδηρο. Σε περίπτωση θετικής αντίδρασης το θρεπτικό υλικό γίνεται καστανό-μαύρο.

#### 2.4. 4. Φωσφατάση (Smibert and Krieg, 1981).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη δοκιμή και οξίνων και αλκαλικών φωσφατασών. Σε λυωμένο "Nutrient agar" θερμοκρασίας 45-50 C προστίθεται ασηπτικά μία επαρκής ποσότητα διαλύματος 1% αλάτων Na της φαινολοφθαλείνης αποστειρωμένο με διήθηση ώστε να σχηματιστεί μία τελική συγκέντρωση 0,01%. Ετοιμάζονται τρυβλία στα οποία γίνεται γραμμική διασπορά και επωάζονται για 2-5 ημέρες. Τοποθετείται μία σταχόνα διαλύματος αμμωνίας (ειδικής πυκνότητας 0,88 ή 28-30% ) στο καπάκι των ανεστραμμένων τρυβλίων και αφήνεται ώστε οι ατμοί της αμμωνίας να φθάσουν στις αποικίες. Θετική δοκιμή: οι αποικίες γίνονται κόκκινες λόγω της παρουσίας ελεύθερης φαινολοφθαλείνης.

#### 2.4. 5. Ροζ χρωστική σε BMS άχαρ (Krieg and Doberneiner, 1985).

Καλλιεργούνται τα στελέχη σε BMS άχαρ σε 37 C επί 1-2 εβδομάδες.

#### 2.4. 6. Αναερόβια αύξηση με νιτρικά σε θρεπτικό υλικό πέπτονης. (Krieg and Doberneiner, 1985).

Χρησιμοποιείται το ίδιο θρεπτικό υλικό όπως στη διάπλωση

ζυμωτικής ικανότητας με φρουκτόζη ως πηγή άνθρακα και  $\text{KNO}_3$  1gr/1 αντί για  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Τοποθετείται μαζί με τα άλλα στο αναερόβιο δοχείο (Gas Pak BBL).

#### 2.4. 7. Υδρόλυση αμύλου (Smibert and Krieg, 1981).

Παρασκευάζεται "Nutrient agar" και προστίθεται 0,2% διαλυτό άμυλο πριν από το βρασμό. Η αποστείρωση γίνεται στους 115 C για 10'. Κάθε τρυβλίο με το στερεό υλικό αμύλου εμβολιάζεται με μία μοναδική γραμμή κατά τη διάμετρο του τρυβλίου με το συσκευασμένο στέλεχος. Ύστερα από επώαση το τρυβλίο κατακλύζονται με διάλυμα ιωδίου ( αυτό που συνήθως χρησιμοποιείται στη χρώση Gram είναι κατάλληλο). Θετική δοκιμή: διαφανής περιοχή γύρω από την καλλιέργεια.

#### 2.4. 8. Ουρεάση (Smibert and Krieg, 1981).

Παρασκευάζεται το θρεπτικό υλικό Christensen το οποίο έχει την σύνθεση: πεπτόνη 1,0gr, γλυκόζη 1,0gr, NaCl 5,0gr,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0gr, ερυθρό της φαινόλης 0,012gr, απεσταχμένο νερό 1 λίτρο, εκχύλισμα ζύμης 0,1gr. Το pH του υλικού πρέπει να είναι 6,8-6,9. Σε λιωμένο θρεπτικό υλικό θερμοκρασίας 50 C προσθέτεται ασηπτικά διάλυμα 20% ουρίας (αποστειρωμένο με διήθηση) ώστε να προκύψει μία τελική συγκέντρωση 2% ουρίας. Ύστερα από ανάμιξη διανέμονται ασηπτικά σε αποστειρωμένους σωλήνες ποσότητες 2-3 ml. Οι σωλήνες τοποθετούνται υπό κλίση ώστε όταν κρύωση και στερεοποιηθεί το υλικό να σχηματίσει κεκλιμένη επιφάνεια 2,5cm μήκος και βάθος 1,3cm στην άκρη. Η επιφάνεια του θρεπτικού υλικού στο δοκιμαστικό σωλήνα εμβολιάζεται και επιυάζεται.

Θετική δοκιμή: σχηματισμός κόκκινου ιώδους χρώματος.

#### 2.4. 9. Υδρόλυση ζελατίνης (Smibert and Krieg, 1981).

Εφαρμόζεται γραμμική διασπορά σε τρυβλίο με "Nutrient agar"

συμπληρωμένου με 0,4% ζελατίνη. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 C επί δύο ημέρες. Στη συνέχεια κατακλύζονται με αντιδραστήριο κατακρήμνισης ζελατίνης (15%  $HgCl_2$  σε 20% (v/v) πυκνό HCL).

Θετική αντίδραση: διαφανείς ζώνες γύρω από τις αποικίες.

#### 2.4. 10. Δοκιμή υδρόλης (Simbert and Krieg, 1981).

Για τη δοκιμή υδρόλης καλλιεργούνται τα στελέχη έως 48 ώρες στους 37 C σε υγρό θρεπτικό υλικό τρυπτόνης που περιέχει 0,1% τρυπτοφάνη.

#### 2.4. 11. Ανάπτυξη σε 1% οξυχάλακτος (Simbert and Krieg, 1981).

Εξετάζεται η αντοχή 1% οξυχάλακτος σε ημιστερεό θρεπτικό υλικό Nfb medium στο οποίο έχει προστεθεί 1% οξυχάλακτος.

#### 2.4. 12. Ανάπτυξη σε παρουσία 3% NaCl (Simbert and Krieg, 1981).

Η αντοχή στο NaCl εξετάζεται σε ημιστερεό θρεπτικό υλικό Nfb medium στο οποίο έχει προστεθεί 3% NaCl.

#### 2.4. 13. Δοκιμή Voges-Proskauer, 2% γλυκόζη (Simbert and Krieg, 1981)

Χρησιμοποιείται το εξής θρεπτικό υλικό: πεπτόνη 7,0gr,  $KH_2PO_4$  5,0gr, γλυκόζη 20gr, απεσταχμένο νερό 1 λίτρο. Το pH ρυθμίζεται έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι 6,9. Ύστερα από 5 ημέρες επώαση στους 37 C γίνεται η δοκιμή: 1 ml καλλιέργειας μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 0,6 ml 5% (w/v) α-ναφθόλης σε απόλυτη αλκοόλη και 0,2 ml από 40% υδατικού διαλύματος KOH.

Θετική δοκιμή: κόκκινο χρώμα.

#### 2.4. 14. Απονίτρωση (Neyra and van Berkum, 1977).

Σε σωλήνες όγκου 14ml μεταφέρουμε 6 ml από το θρεπτικό υλικό SS χωρίς άχαρ όμως, και σε κάθε σωλήνα τοποθετείται ένας σωληνίσκος Durham. Μετά από 24-48 ώρες επώαση σε 37 C όταν οι καλλιέργειες θα έχουν φθάσει στη τιμή 0,2 περίπου της οπτικής πυκνότητας περίπου, προσθέτουμε 6 ml διάλυμα  $KNO_3$  40 mM για να έχουμε τελική

συγκέντρωση 20 mM σε κάθε σωλήνα. Δημιουργούνται αναερόβιες συνθήκες και ξαναεπιάζονται στους 37 C για 7 ημέρες. Εάν συγκεντρωθεί αέριο στους σωληνίσκους Durham δείχνει την ύπαρξη μηχανισμού απονίτρωσης.

2.4. 15. Παραγωγή οξέων από σάκχαρα (Tarrand et al, 1978).

Χρησιμοποιείται το θρεπτικό υλικό της ακόλουθης σύνθεσης (gr/l): εκχύλισμα ζύμης 0,05,  $K_2HPO_4$  0,25,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01,  $Na_2HCO_3 \cdot 2H_2O$  0,001,  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  0,002,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,026,  $(NH_4)_2SO_4$  1,0, βιοτίνη 0,0001, κυανού της μομφωμ-όλης (υδατικό διάλυμα) 0,0375, άχαρ 15,0. Το pH ρυθμίζεται στο 7,1 με KOH. Τα υδατικά διαλύματα των διαφόρων σακχάρων αποστειρώνονται με διήθηση (μεμβράνη με πόρους 0,2 μ) και προστίθενται στο στείρο υλικό σε ποσότητα τέτοια ώστε η τελική συγκέντρωση σακχαρών να είναι 1%. Τα σακχαρώδη υλικά μεταφέρονται ακολούθως σε κάρτες καπέλες μικροτεγλοδότσης σε αναλογία περίπου 1 ml ανά κυψελίδα Γάλα το χέμισμα και εμβολιασμό των κυψελίδων χρησιμοποιούνται πιπέτες Pasteur ( 0,1 ml καλλιέργειας MPSS 48 ωρών σε υγρό θρεπτικό υλικό) Έπειτα από τον εμβολιασμό οι κάρτες επιδύζονται στους 37 C για 72 ώρες.

Καλλιέργειες *Acetivibrio*

Καλλιέργειες	Προέλευση
Sr7	ATCC 29145
Sr59	ATCC 29707
T5	Σύλλογη Εργαστήριο Παθολογίας (παρούσα εργασία)
H2	"
H3	"
H2/H3	"
Λ	" (Γ. Παπουτσάκη 1987)
Γ	"
Δ	"
Ε	"
Στ1	"
Στ2	"
Στ3	"

## 2.5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ Azospirillum

Σαν βασικό θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό SS χωρίς άχαρ όμως. Σ' αυτό το θρεπτικό υλικό εμβολιάστηκαν τα στελέχη Sp7 (ATCC 29145), B, H2 και T5, επώασθησαν υπό ανατάραξη στους 27 C με 100 rpm για 24-48 ώρες. Οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε ειδικές κωνικές φιάλες (βλέπε σχήμα β) που περιέχουν 10 ml από το βασικό θρεπτικό υλικό, διαμορφώνοντάς το σύμφωνα με τους σκοπούς του πειράματος ως εξής:

### 2.5. 1. Επίδραση της πηγής άνθρακα

α. Μαλικό οξύ 5,0 gr/l

β. Μαλικό νάτριο 6,64 gr/l

γ. Ηλεκτρικό οξύ 4,4 gr/l

Με βάση την πηγή άνθρακα του μαλικού οξέος υπολογίζεται η ποσότητα στις δύο άλλες πηγές άνθρακα.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,0gr/l. Θερμοκρασία επώασης 35 C.

### 2.5. 2. Επίδραση της θερμοκρασίας

Με πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ και  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,0gr/l σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: α. 21 C β. 27 C γ. 35 C

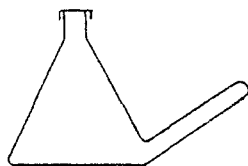
### 2.5. 3. Επίδραση της απουσίας και παρουσίας αζώτου

Με πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ στους 35 C επώαση σε:

α. απουσία αζώτου

β. με  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,0gr/l

Για 10 ml θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε 0,1 ml εμβόλιο. Η επώαση έγινε υπό ανατάραξη. Αρχίζοντας από χρόνο 0 (χρόνος εμβολιασμού) κάθε δύο ή τρεις ώρες έγιναν μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 560 nm.



Κωνική φιάλη με πλευρικό σωλήνα που χρησιμοποιήθηκε χιιά τις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στο φασματοφωτόμετρο

Σχήμα β

## 2.6. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Τα 5 στελέχη (Sp7 (ATCC 29145), Sp59 (ATCC 29707), B, H2, T5) καλλιεργήθηκαν στο υγρό θρεπτικό υλικό SS (χωρίς άχαρ). Ακολούθως όταν έφθασαν σε επίπεδο πληθυσμού  $10^8$  κύτταρα/ml (η εκτίμηση έγινε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετροι: μεταφέραμε 10 ml σε σωλήνες φυχοκέντρου, φυχοκεντρήθηκαν, ξεπλύθηκαν 3 φορές με απεσταχμένο και αποστειρωμένο νερό. Ακολούθως προσθέσαμε θρεπτικό υλικό της ίδιας σύνθεσης, αλλά με διάφορες συγκεντρώσεις του ηλεκτρικού οξέος σαν πηγή άνθρακα (1,0gr/l, 3,0gr/l και 5,0gr/l). Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια όγκου 28ml (Mc Cartney) και προστέθηκε 10% ακετυλένιο. Τα πέντε στελέχη σε τρεις συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος (1,0gr/l, 3,0gr/l και 5,0gr/l) επώασθηκαν στους 35 C, ενώ δύο πειραματικές σειρές χιιά κάθε στέλεχος με τη κανονική ποσότητα άνθρακα (5,0gr/l ηλεκτρικού οξέος) επώασθηκαν στους 21 C και 27 C αντίστοιχα.

Ο προσδιορισμός του αιθυλενίου έγινε στον αεροχρωματογράφο μετά από 2 και 4 ώρες επώαση.

## 2.7. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΒΛΑΣΤΗΣΗ, ΜΗΚΟΣ ΡΙΖΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΚΟΛΕΟΠΤΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΙΤΑΡΙΟΥ.

Τα πέντε στελέχη (Sp7 (ATCC 29145), Sp59 (ATCC 29707), B, H2, T5) καλλιεργήθηκαν στο SS (χωρίς άχαρ). Με βάση την οπτική πυκνότητα είχαν τέσσερεις διαφορετικές αραιώσεις κάθε στελέχους. Για τις αραιώσεις χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλάτων που είχε την ακόλουθη σύσταση (gr/l) : εκχύλισμα ζύμης 0,1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2,  $NaCl$  0,1,  $CaCl_2$  0,02,  $FeCl_3$  0,01,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0,002,  $MnSO_4$  0,0021,  $H_3BO_3$  0,0028,  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$  0,00004,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,00024. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ένας μάρτυρας με νερό.

Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν τρία διηθητικά χαρτιά με 10 σπόρους. Για κάθε επίπεδο πληθυσμού χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία (τρεις επαναλήψεις). Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με 5 ml καλλιέργειας ή μάρτυρα (νερό και διάλυμα αλάτων) και επώασθησαν στους 21 C.

Μετά από 48 ώρες μετρήθηκε η βλάστηση και μετά από 96 ώρες είχαν οι εξής μετρήσεις: βλάστηση, μήκος ριζιδίων και μήκος κολεοπτίλου. Ο μέσος όρος των κολεοπτίλων των 10 σπορών του κάθε τρυβλίου εκφράζει μία επανάληψη, όπως επίσης ο μέσος όρος των τριών ριζιδίων κάθε σπόρου και συνολικά για τους 10 σπόρους κάθε τρυβλίου.

## 2.8. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΜΕ Azospirillum ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΟΥ ΣΙΤΑΡΙΟΥ.

### Βιολογικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από χειμωνιάτικο σιτάρι, ποικιλίας "Βερχίνα". Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες 48 ωρών σε θρεπτικό υλικό SS χωρίς άχαρ. Ο εμβολιασμός έγινε με  $10^8$  κύτταρα/gr υποστρώματος δύο φορές : α. με τη φύτευση και β. μετά από τέσσερις εβδομάδες όταν τα φυτά ήταν με τρία φύλλα. Για κάθε ένα από τα τέσσερα στελέχη που δοκιμάστηκαν (Sp7, B, H2 και T5) η πειραματική διάταξη περιελάμβανε δύο επίπεδα αζώτου σε τέσσερις επαναλήψεις.

### Υπόστρωμα

Χρησιμοποιήθηκε μείγμα χώματος με χαλαζιακή άμμος (3:1 w/w). Σε κάθε γλάστρα σπάρθηκαν τέσσερις σπόροι.

### Συνθήκες καλλιέργειας

Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε δωμάτιο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας. Τις τέσσερις πρώτες εβδομάδες η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 21 C και τις άλλες 4 εβδομάδες στους 23 C. Η φωτοπερίοδος ήταν 18 ώρες. Η υγρασία του εδάφους διατηρείτο στο επίπεδο 30% της υδατοικανότητας (50% ξηρού εδάφους) με προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι του αρχικού βάρους κάθε δύο ημέρες. Άμεσα με την σπορά προστέθηκε θρεπτικό διάλυμα (Jensen 1942) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε νερό απιονισμένο. Η κάθε πειραματική σειρά περιελάμβανε δύο επίπεδα αζώτου ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ): 1. χωρίς άζωτο και 2. με 15mg N/gr υποστρώματος. Το άζωτο προστέθηκε στην αρχή με την σπορά. Μετά από την όχθη εβδομάδα έγιναν μετρήσεις για τον προσδιορισμό νωπού και ξηρού βάρους βλαστών και ριζών (για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους οι ιστοί αποξηράνθηκαν σε φούρνο στους 80 C για 5 ημέρες).



2.9. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ Azospirillum ΚΑΙ Phialophora raditicola var. graminicola ΣΕ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

Βιολογικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη H2, T5 και B, (που απομονώθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της ΑΓΣΑ) Sp7 (ATCC 29145), Sp59 (ATCC 29707) και P. raditicola var. graminicola (ATCC 28231).

Συνθήκες καλλιέργειας

Από θρεπτικό υλικό διατήρησης (838 ATCC) τα προαναφερθέντα στελέχη μεταφέρθηκαν με χραμμική διασπορά σε τρυβλία με PDA. Τα ίδια τρυβλία εμβολιάστηκαν στο κέντρο τους με τον μύκητα P. raditicola var. graminicola. Επώαστηκαν στους 27 C για 15 ημέρες.

2.10. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ P. raditicola var. graminicola ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ Azospirillum.

Βιολογικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη από την ATCC : A. brasilense Sp7 (ATCC 29145), A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) και P. raditicola var. graminicola (ATCC 28231).

Συνθήκες καλλιέργειας

1. P. raditicola var. graminicola (ATCC 28231)

Αρχικά εμβολιάστηκε σε στερεό θρεπτικό υλικό που περιείχε μόνο άχαρ και νερό, και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε κωνικές φιάλες των 250ml που περιείχαν 100ml θρεπτικό υλικό με την ακόλουθη σύσταση (P. Medium):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 gr,  $FeCl_3$  0.2mg,  $ZnSO_4$  0.2mg,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0,1mg,  $KH_2PO_4$  1,0gr, ασπαραχίνη 2,0gr, απεσταχμένο νερό 1 λίτρο, δεξτρόζη 10gr, θειαμίνη 10mg. Η δεξτρόζη και η θειαμίνη διαλύθηκαν σε 100 ml απεσταχμένο νερό και αποστειρώθηκαν με διήθηση (Balis, 1969). Οι κωνικές φιάλες επώασθηκαν υπό ανατάραξη στους

27 C για 25 ημέρες. Μετά από την επώαση το περιεχόμενο φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο υγρό που παραλήφθηκε χρησιμοποιήθηκε σαν υλικό καλλιέργειας των Azospirillum όπως περιγράφεται παρακάτω και μνημονεύεται ως υπερκείμενο Phial.

2. Στη σειρά αυτή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι καλλιέργειες: A. brasilense Sp7 (ATCC 29145) και A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707).

Οι δύο καλλιέργειες Azospirillum αναπτύχθηκαν αρχικά στο θρεπτικό υλικό που έχει περιγραφεί στα Υλικά και Μεθόδοι για τον έλεγχο σε βιοτίνη. Το θρεπτικό υλικό αυτό αναφέρεται στο κείμενο σαν Azo Medium. Επώασθηκαν υπό ανατάραξη επί 27 C για 48 ώρες και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των κωνικών φιαλών των αντίστοιχων πειραματικών σειρών

Η πορεία αυξήσεως μελετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100ml που περιείχαν 10ml του αντίστοιχου θρεπτικού διαλύματος, και οι οποίες δέχθηκαν 1ml εμβολίου. Η κάθε σειρά περιελάμβανε θρεπτικά διαλύματα της ακόλουθης σύνθεσης ή προέλευσης :

1. Azo Medium
2. Azo Medium + βιοτίνη (0,1mg)
3. Azo Medium + εκχύλισμα ζύμης (0,5gr)
4. Υπερκείμενο Phial.
5. P. Medium.
6. Υπερκείμενο Phial. + Azo Medium (1:1)
7. Υπερκείμενο Phial. + Azo Medium + βιοτίνη (1:1)

Η επώαση έγινε υπό ανατάραξη στους 27 C και οι μετρήσεις για την εκτίμηση της οπτικής πυκνότητας έγιναν κάθε τρεις ώρες στο φασματοφωτόμετρο.

## 2.11. ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΑΝ ΠΗΓΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.

Βιολογικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν οι καλλιέργειες : A. brasilense Sp7 (ATCC 29145) και A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707).

Συνθήκες καλλιέργειας

Σαν βασικό θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το Azo Medium χωρίς πηγή άνθρακα και βιοτίνη. Η συμπλήρωση με την απαιτούμενη πηγή άνθρακα στις διάφορες πειραματικές σειρές έγινε με την προσθήκη :

- 1) 2gr/l ασπαραγίνη ή ασπαραγινικό οξύ, όσο δηλαδή περιέχει και το P. Medium.

- 2) 6,36gr/l ασπαραγίνη ή 5,63gr/l ασπαραγινικό οξύ δηλαδή σε ποσότητες που αντιστοιχούν στον άνθρακα διαλύματος ηλεκτρικού οξέος αναλογίας 5gr/l

3. ηλεκτρικό οξύ 5gr/l

Οι βιταμίνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : βιοτίνη 0,0001gr/l και θειαμίνη 0,00001gr/l.

Για εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε 0.1 ml καλλιέργειας από τα δύο στελέχη που αναπτύχθηκαν αρχικά στο Azo Medium χωρίς βιοτίνη. Η επώαση έγινε υπό ανατάραξη στους 27 C. Οι μετρήσεις έγιναν κάθε τρεις ώρες στο φασματοφωτόμετρο.

## 2.12. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ Azospirillum-P. radicum var. graminicola ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΟΥ ΣΙΤΑΡΙΟΥ.

Βιολογικό υλικό

Χειμωνιάτικο σιτάρι, ποικιλίας "Βερλίνα",

A. brasilense Sp7 (ATCC 29145), A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) και P. radicum var. graminicola (ATCC 28231).

### Υπόστρωμα

500 gr χαλαζιακής άμμου υγρασίας 30%. Σπάρθηκαν 4 σπόροι σε κάθε χλάστρα.

### Εμβολιασμός

Ο εμβολιασμός με P. radicumicola var. graminicola (ATCC 28231) έγινε υπό μορφή δίσκων (ένας δίσκος για κάθε σπόρο).

Ο εμβολιασμός με A. brasilense (ATCC 29145) και A. lipoferum (ATCC 29707) έγινε με  $10^6$  κύτταρα/gr άμμου από καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό υλικό SS.

### Συνθήκες καλλιέργειας

Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με φωτοπερίοδο 14 ώρες ημέρα με θερμοκρασία 22 C και 10 ώρες νύχτα με 17 C. Σ'όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 εβδομάδες) ποτίζαμε ανά τριήμερο με απεσταχμένο νερό, αποκαθιστώντας στην αρχική του τιμή τό βάρος κάθε χλάστρας.

Το πείραμα έχει 4 επαναλήψεις και 6 επεμβάσεις :

1. μάρτυρας

2. εμβολιασμός με A. brasilense Sp7

3. εμβολιασμός με A. lipoferum Sp59

4. εμβολιασμός με P. radicumicola var. graminicola

5. εμβολιασμός με Sp7 + P. radicumicola var. graminicola

6. εμβολιασμός με Sp59 + P. radicumicola var. graminicola

Μετά από την 3η εβδομάδα προσδιορίστηκαν το νωπό και ξηρό βάρος των φυτών (για το ξηρό βάρος το υλικό τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 80 C επί 5 ημέρες)

Επίσης έγιναν παρατηρήσεις για να διαπιστωθεί η εγκατάσταση του P. radicumicola var. graminicola (ATCC 28231) στο ριζικό σύστημα.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ Azospirillum

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας του μικροβιακού πληθυσμού της ριζόσφαιρας των σιτηρών.

Επειδή, όπως φαίνεται στον πίνακα 1 κανένα φιαλίδιο εμβολιασμένο με δείγμα κεχριού (Panicum miliaceum) δεν ήταν θετικό ως προς τη δοκιμή αναχωχής του ακετυλενίου, χρησιμοποιήσαμε τις υπόλοιπες ρίζες του φυτού χιά τον εμβολιασμό, εκ νέου φιαλιδίων με SSS.

Στην προσπάθεια αυτή έγιναν οκτώ επαναλήψεις χιά να αυξήσουμε τη πιθανότητα ανάπτυξης αζωτοδεσμευτικών πληθυσμών σε κάποιο από αυτά. Από τη σειρά αυτή 2 από τα 8 φιαλίδια έδειξαν θετική ένδειξη στη δοκιμή αναχωχής του ακετυλενίου. Παρά το γεγονός όμως αυτό, ήταν αδύνατον να απομονωθεί κάποιο στέλεχος από την ριζόσφαιρα φυτών του Panicum miliaceum.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα μικροβιακών πληθυσμών της ριζόσφαιρας των σιτηρών.

Προέλευση	Επαναλήψεις			
	1	2	3	4
<i>Triticum turgidum</i>	+	++	-	+
<i>Panicum miliaceum</i>	-	-	-	-
<i>Hordeum vulgare</i>	++	+	+	++
<i>Zea mays</i>	++	+	-	-

- : αρνητική ένδειξη

± : θετική ένδειξη

++ : η μεγαλύτερη ένδειξη από τις τέσσερις επαναλήψεις

Στον πίνακα 2 αναφέρονται οι καλλιέργειες βακτηρίων του γένους Azospirillum που απομονώθηκαν ακολουθώντας τη μεθοδολογία του σχήματος Α. Σ' αυτό περιλαμβάνονται και τα στελέχη που λάβαμε από την ATCC.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2

### Καλλιέργειες Azospirillum

Καλλιέργειες	Προέλευση
A. lipoferum ATCC 29707 (Sp59)	ATCC
A. brasilense ATCC 29145 (Sp7)	ATCC
T5	Ριζόσφαιρα σιταριού
H2	Ριζόσφαιρα κριθαριού
H3	Έδαφος από καλλιέργεια κριθαριού

### 3.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ Azospirillum

Γιά τη ταυτοποίηση των καλλιεργειών που απομονώθηκαν, καθώς και των αυτών της συλλοχής του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας της ΑΓΣΑ (πίνακας 3), χρησιμοποιήθηκαν οι χαρακτήρες που δίνονται στον πίνακα 4. Οι άλλες βιοχημικές δοκιμές παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Βάση των αποτελεσμάτων αυτών, οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι οι καλλιέργειες που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του σιταριού (Triticum turgidum) και κριθαριού (Hordeum vulgare) ανήκουν στο A. brasilense.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την εξειδίκευση των ειδών του γένους Azospirillum με τους ξενιστές τους. Θα περιμέναμε δηλαδή τα φυτά του τύπου C<sub>3</sub> να

φιλοξενούν στελέχη A. brasilense, ενώ αυτά του τύπου C<sub>4</sub> να φιλοξενούν στελέχη A. lipoferum.

Εξαίρεση αποτελεί μόνο η καλλιέργεια H2/N2 που απομονώθηκε από το ριζικό σύστημα φυτών που είχαν εμβολιασθεί με την H2 και που τους είχε εφαρμοστεί μεγάλη δόση αζώτου (1gr/5φυτά). Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιεί γλυκόζη όπως και το A. lipoferum, χωρίς όμως να έχει τις απαιτήσεις σε βιοτίνη του A. brasilense. Επίσης όπως φαίνεται από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις (φωτογραφίες στις σελίδες 74,75,76,77) τα κύτταρα της απομόνωσης H2/N2 μοιάζουν περισσότερο με αυτά των Sp59 και A που ανήκουν στο A. lipoferum.

Η H3 δεν σχηματίζει ρόδινη χρωστική στο θρεπτικό υλικό BMS, ενώ όλοι οι υπόλοιποι χαρακτήρες του συμφωνούν με τους χαρακτήρες του A. brasilense.

Οι T5, H3 και 4a2 δείχνουν να ανήκουν επίσης στο είδος A. brasilense, αλλά δεν αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες και δεν κάνουν απονίτρωση.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3

#### Καλλιέργειες Azospirillum

Καλλιέργεια	Προέλευση
A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707)	ATCC
A. brasilense Sp7 (ATCC 29145)	ATCC
T5	Ριζόσφαιρα σιταριού
H3	Χύμα από καλλιέργεια κριθαριού
H2	Ριζόσφαιρα κριθαριού
A	Ριζόσφαιρα αραβισίτου
B	Ριζόσφαιρα σίκαλης
Γ	Ριζόσφαιρα σόρχου
Δ	Ριζόσφαιρα σόρχου
E	Ριζόσφαιρα σιταριού
4a1	Χύμα από καλλιέργεια αραβοσίτου
4a2	Χύμα από καλλιέργεια αραβοσίτου
4a4	Χύμα από καλλιέργεια αραβοσίτου
H2/N2	Ριζόσφαιρα σιταριού εμβολιασμένο με το στέλεχος H2 σε συνθήκες υψηλής δόσης αζώτου (1gr/5φυτά).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν το A. lipoferum από το A. brasilense

Χαρακτήρες	απομονώσεις													
	Sp7	Sp59	T5	H3	H2	A	B	Γ	Δ	E	4a1	4a2	4a4	H2/N2
Απαίτηση σε βιοτίνη	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Χρησιμοποίηση της γλυκόζης, μαννιτόλης και α-κετογλουταρικού σαν μοναδικές πηγές άνθρακα για αύξηση σε ημιστερεα θρεπτ. υλικά ελεύθερα N	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Οξίνιση θρεπτικού υλικού με πεπτόνη και γλυκόζη	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Διαφορά στον πλειομορφισμό	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Παραγωγή οξέος από γλυκόζη ή φρουκτόζη υπό αναερόβιες συνθήκες	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Άλλες βιοχημικές δοκιμές των A. lipoferum και A. brasilense

Χαρακτήρες	απομονώσεις													
	Sp7	Sp59	T5	H3	H2	A	B	Γ	Δ	E	4a1	4a2	4a4	H2/N2
Οξειδάση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Καταλάση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Υδρόλυση εσκουλίνης	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Φωσφατάση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Σχηματισμός ρόδινης χρωστικής σε BMS άχαρ+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

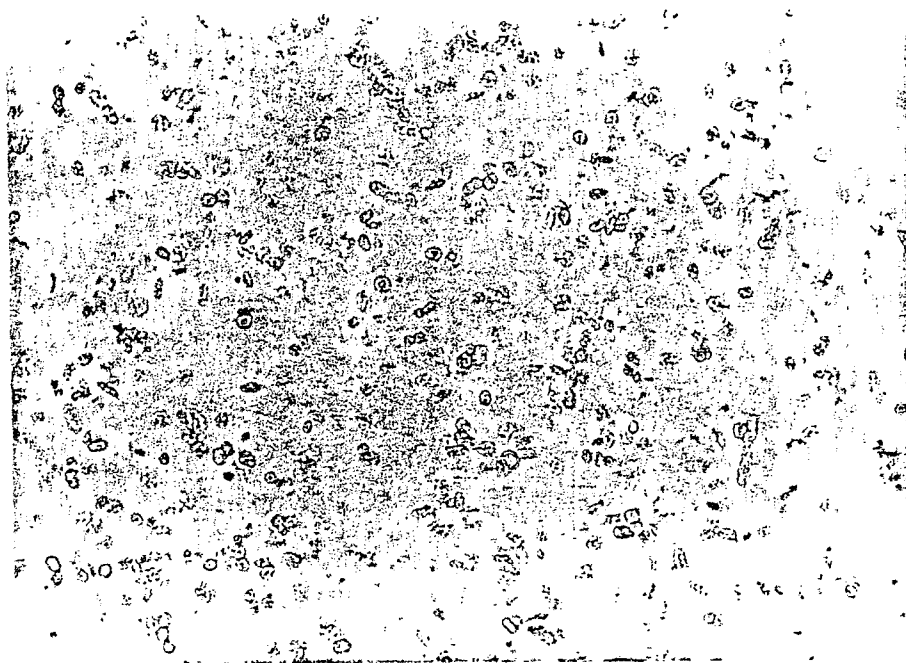


ΠΙΝΑΚΑΣ 5 (συνέχεια)

Χαρακτήρες	απομονώσεις													
	Sp7	Sp59	T5	H3	H2	A	B	Γ	Δ	E	4a1	4a2	4a4	H2/N2
Αναερόβια αύξηση με νιτρικά σε υλικό πεπτόνης	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> σε N <sub>2</sub> O και N <sub>2</sub>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Υδρόλυση αμύλου	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ουρεάση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Υδρόλυση ζελατινής	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ινδόλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Αύξηση παρουσία 1% οξυχάλακτος	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Αύξηση παρουσία 3% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Δοκιμή Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Αερόβια παραγωγή οξέων από υδατάνθρ.														
Φρουκτόζη	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Γαλακτόζη, αραβινόζη	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Μαννιτόλη, σορβιτόλη														
ριβόζη, ξυλόζη, ινοσιτρίβόζη, δουλσιτόλη, Ραμνόζη, δουλσιτόλη, ερυθριτόλη, μαλτόζη, σακχαρόζη, κελλοβιόζη	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
μελιβιόζη, λακτόζη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Μοναδικές πηγές άνθρακα με πηγή αζώτου (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>														
Ηλεκτρικό, μηλικό, προπιονικό, γαλακτικό, πυροσταφυλικό, οξαλοξικό, φουμαρικό, χλουκονικό, β-υδροξυβουτυρικό, χλυκερόλη,														
φρουκτόζη, κιτρικό,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-κετοχλουταρικό	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
χλυκόζη	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
γαλακτόζη, αραβινόζη	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
μανιτόλη, σορβιτόλη														
ριβόζη	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
μηλονικό	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Εικόνα 4

Φωτογραφίες από μικροσκοπικά παρασκευάσματα στο Nfb Medium  
στελεχών *Azospirillum* (1000 X)

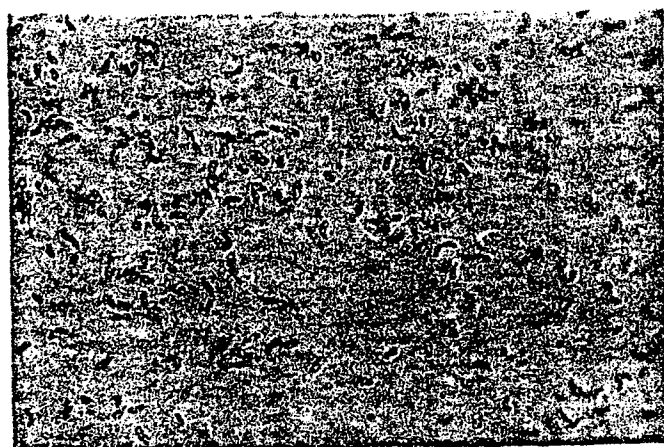


1. *A.lipoferum* Sp59 (ATCC 29707)

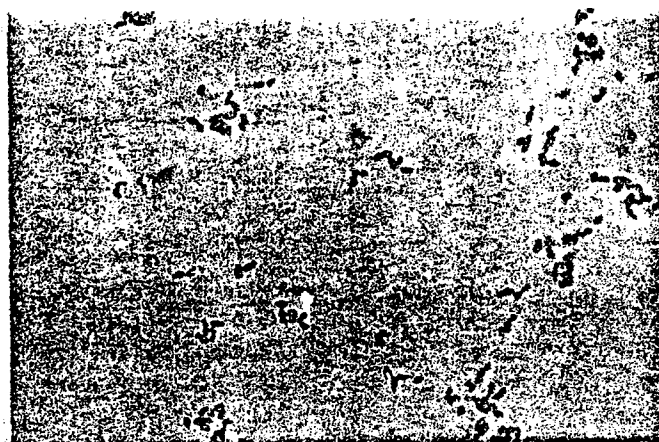


2. *A.brasilense* Sp7 (ATCC 29145)

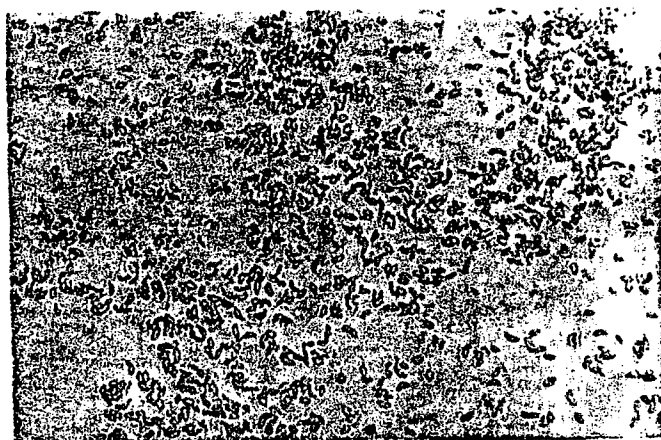
3.Στέλεχος Α



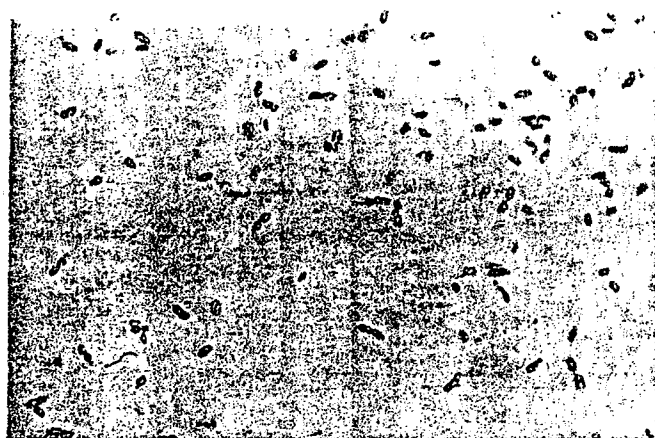
4.Στέλεχος Β



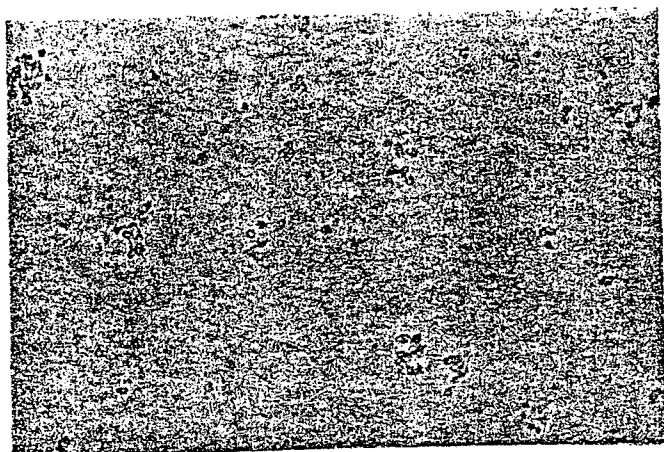
5.Στέλεχος Γ



6.Στέλεχος Δ



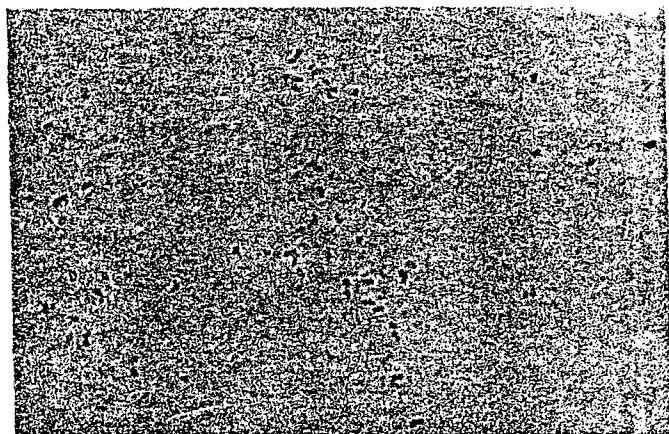
7.Στέλεχος Ε



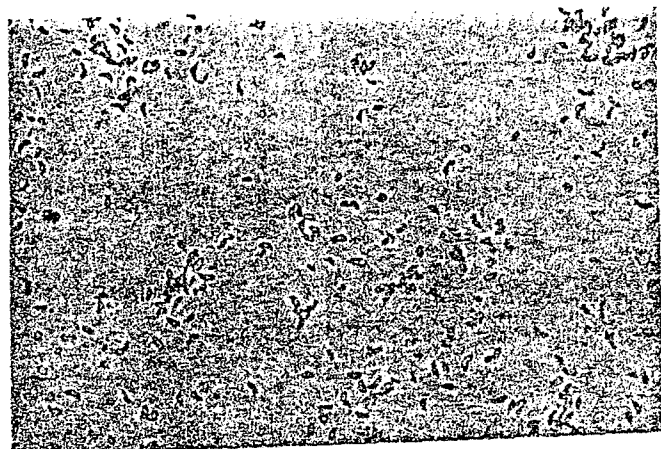
8.Στέλεχος 4a<sub>1</sub>



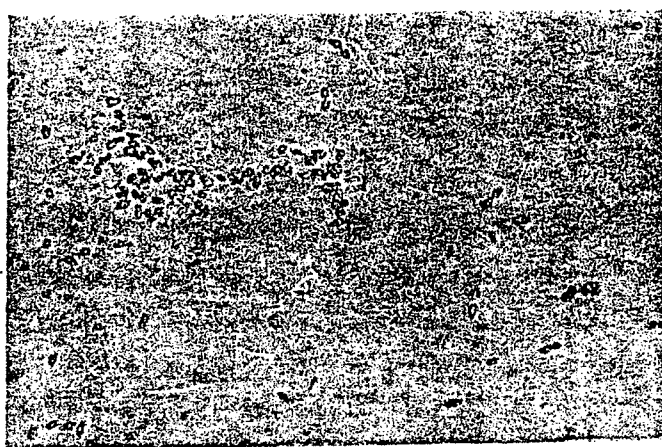
9.Στέλεχος 4a<sub>2</sub>



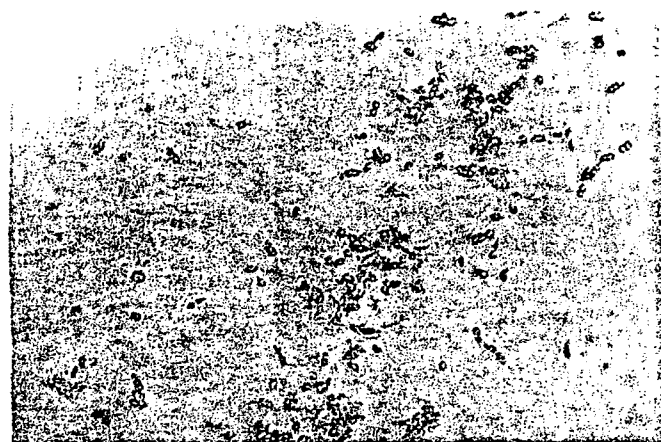
10.Στέλεχος 4a<sub>4</sub>



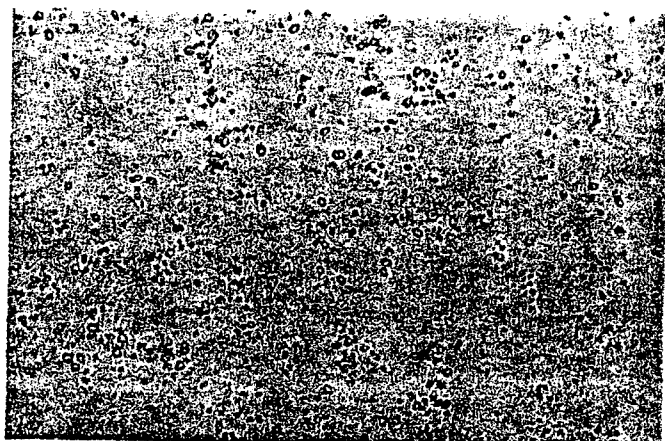
11.Στέλεχος Η2



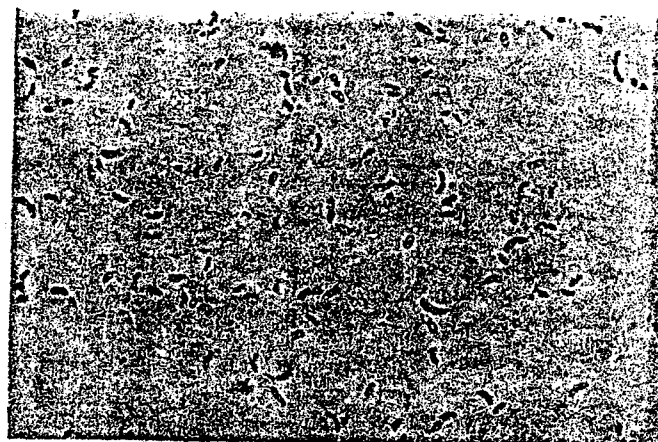
12.Στέλεχος Η3



13.Στέλεχος Τ5



14.Στέλεχος Η2/Ν2



### 3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ Azospirillum.

Όλα τα πειραματικά δεδομένα που αφορούν την επίδραση κάποιου παράγοντα στην κινητική αύξησης των Azospirillum spp. τα επεξεργαστήκαμε σύμφωνα με την εξίσωση :  $\frac{dy}{dt} = KA(1 - \frac{y}{A})y$  η οποία μετά την ολοκλήρωσή του έχει τη μορφή :

$$y = \frac{A}{1 + e^{-KA(T-t)}}$$

Η εξίσωση αυτή είναι γνωστή σαν λογιστική εξίσωση αύξησης του Verhulst ο οποίος και την πρότεινε το 1844 για την ποσοτική έκφραση της πληθυσμιακής αύξησης.

Σ' αυτή την εξίσωση παρατηρούνται οι εξής παράμετροι που εκφράζουν :

1. A : τη μέγιστη τιμή του πληθυσμού στη φάση στασιμότητας ή την χωρητικότητα του συστήματος.
2. T : τον χρόνο όπου παρατηρείται η αλλαγή καμπυλότητας της σιγμοειδούς καμπύλης και ο πληθυσμός (y) είναι A/2.
3. KA: που εκφράζει την αρχική ταχύτητα αύξησης του πληθυσμού (Y) η οποία μετά τον χρόνο T αρχίζει να κάμπτεται και τείνει να μηδενιστεί με την προοδευτική εξάντληση του υποστρώματος και ενίοτε την επισχετική δράση μεταβολικών προϊόντων. Το KA, της λογιστικής εξίσωσης, σχετίζεται και αριθμητικά ταυτίζεται με την ειδική ταχύτητα μ της εκθετικής εξίσωσης. Δεν μπορεί όμως, να ταυτιστεί εννοιολογικά διότι στα κλειστά συστήματα είναι μεταβλητή παράμετρος.

Για να υπολογιστούν οι παράμετροι αυτοί εργαστήκαμε ως εξής : Επιλέξαμε τρεις τιμές y, y<sub>1</sub>, y<sub>2</sub> και y<sub>3</sub> που αντιστοιχούν σε χρόνους t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> και t<sub>3</sub> για τους οποίους ισχύει η σχέση t<sub>3</sub> - t<sub>2</sub> = t<sub>2</sub> - t<sub>1</sub> και τις εφαρμόσαμε στη σχέση :  $A = \frac{2y_1y_2y_3 - y_1y_2^2 - y_3y_2^2}{y_1y_3 - y_2^2}$  από την οποία υπολογίσθηκε η τιμή του A. Σ' ορισμένες περιπτώσεις

εφαρμόστηκε και η μέθοδος των διαδοχικών προσεγγίσεων μέχρις που αποκτηθεί ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ πειραματικών δεδομένων και της θεωρητικής καμπύλης.

Έχοντας γνωστή τη τιμή  $A$  και εφαρμόζοντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετράγωνων στην εξίσωση ευθείας  $\ln \frac{y}{A-y} = -KAT + KA t$  μπορούμε εύκολα να προσδιορίζουμε τις τιμές  $-KAT$  και  $KA$  και εξ αυτών τα  $K$  και  $T$ .

Σ'όλες τις περιπτώσεις που αφορούν τη κινητική αύξησης των Azospirillum spp. τα πειραματικά δεδομένα ακολουθούν την λοχιστική εξίσωση με συντελεστή συσχετισμού  $R^2$  πάνω από 0,98, εκτός από τρεις μόνο περιπτώσεις όπου οι αντίστοιχες τιμές είναι 0,93, 0,95 και 0,97.

### 3.1. 1. Επίδραση της πηγής άνθρακα στη κινητική αύξησης των Azospirillum.

Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι (σελίδα 61) οι τρεις πηγές άνθρακα (μηλικό οξύ, μηλικό νάτριο και ηλεκτρικό οξύ) έχουν προστεθεί στο βασικό θρεπτικό υλικό σε αναλογίες τέτοιες ώστε ο άνθρακας να είναι στο ίδιο επίπεδο. Γιά να μειωθούν τα προβλήματα βιοχημικής δυσαρμονίας, λόγω αλλαγής του υποστρώματος το εμβόλιο σ'όλες τις περιπτώσεις προερχόταν από καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί στο ίδιο θρεπτικό υλικό. Δηλαδή, από θρεπτικό υλικό με ηλεκτρικό οξύ σαν πηγή άνθρακα μεταφέρθηκε εμβόλιο (0,1ml στα 10ml θρεπτικό υλικό) στο θρεπτικό υλικό που είχε την ίδια πηγή άνθρακα. Το ίδιο εφαρμόστηκε και με τις άλλες δύο πηγές άνθρακα.

Στις εικόνες 5 και 6 δίδονται οι γραφικές παραστάσεις της πορείας αύξησης κάθε καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου επώασης

στις τρεις πηγές άνθρακα. Ενώ στον πίνακα 6 δίδονται οι αριθμητικές τιμές των παραμέτρων των αντίστοιχων λοχιστικών εξισώσεων.

Όπως φαίνεται από τις γραφικές παραστάσεις και από τις παραμέτρους των εξισώσεων, οι απομονώσεις Sp7 και T5, το KA και στις τρεις πηγές άνθρακα δεν παρουσιάζουν καμμία σημαντική διαφορά. Στο στέλεχος B η τιμή του KA είναι μεγαλύτερη παρουσία μαλικού οξέος, ενώ στην H2 η μεγαλύτερη τιμή του KA παρατηρείται παρουσία ηλεκτρικού οξέος.

Εξετάζοντας τις μέγιστες τιμές του πληθυσμού (A) παρατηρούμε ότι στις Sp7 (ATCC 29145) και H2 δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Στη T5 η τιμή του A εμφανίζεται μειωμένη στο μαλικό νάτριο, ενώ στις δύο άλλες πηγές άνθρακα (μαλικό και ηλεκτρικό οξύ) δεν διαφέρει (1,09 , 1,42 και 1,16 αντίστοιχα).

Οι τιμές του χρόνου T, όπου ο πληθυσμός φθάνει το A/2 στην Sp7 (ATCC 29145) παρατηρείται μία υστέρηση 4 ωρών στο θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα μαλικό οξύ σε σύγκριση με τις δύο άλλες πηγές άνθρακα (μαλικό νάτριο και ηλεκτρικό οξύ) Στο στέλεχος H2 η τιμή του T είναι τρεις ώρες μικρότερη παρουσία ηλεκτρικού οξέος σε σύγκριση με το μαλικό οξύ και μαλικό νάτριο. Στα δύο άλλα στελέχη (B και T5) δεν παρατηρείται καμμία αξιοσημείωτη διαφορά στη τιμή του T μεταξύ των τριών πηγών άνθρακα.

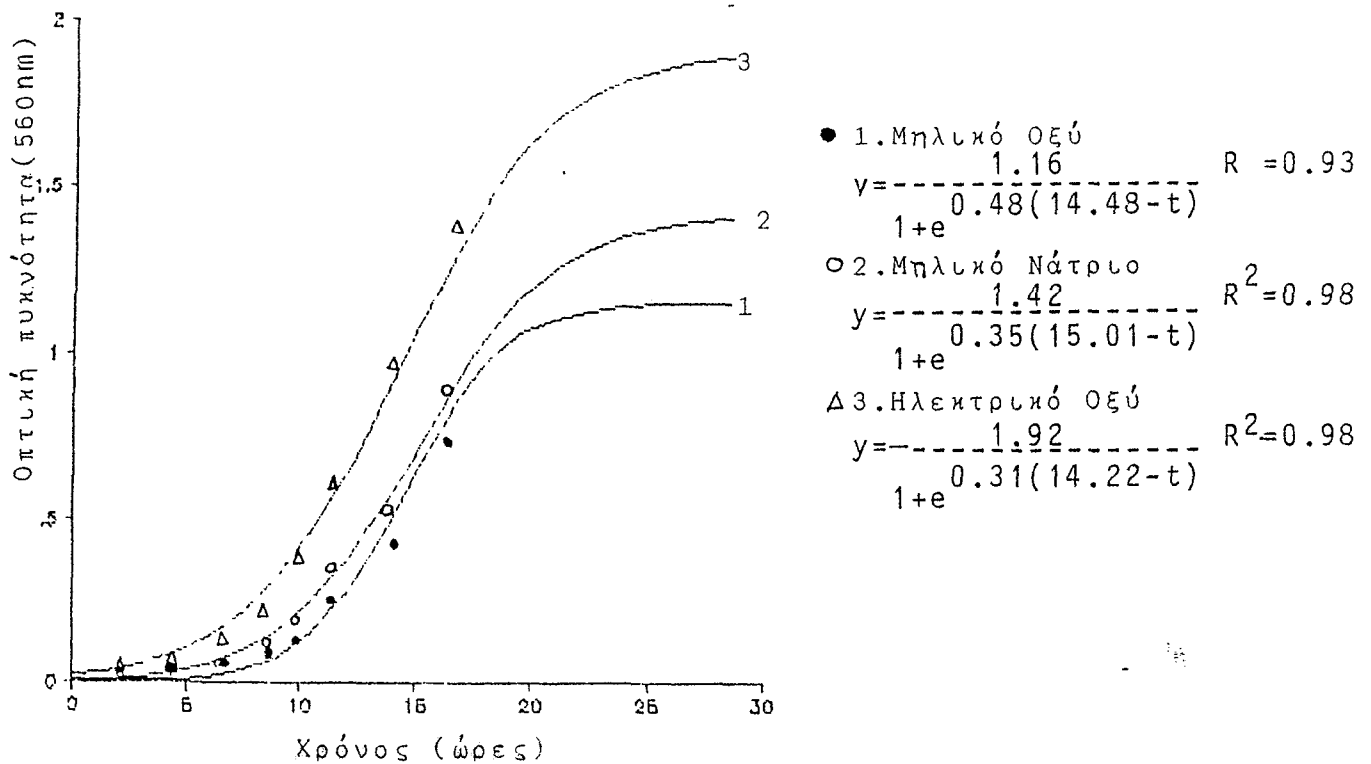
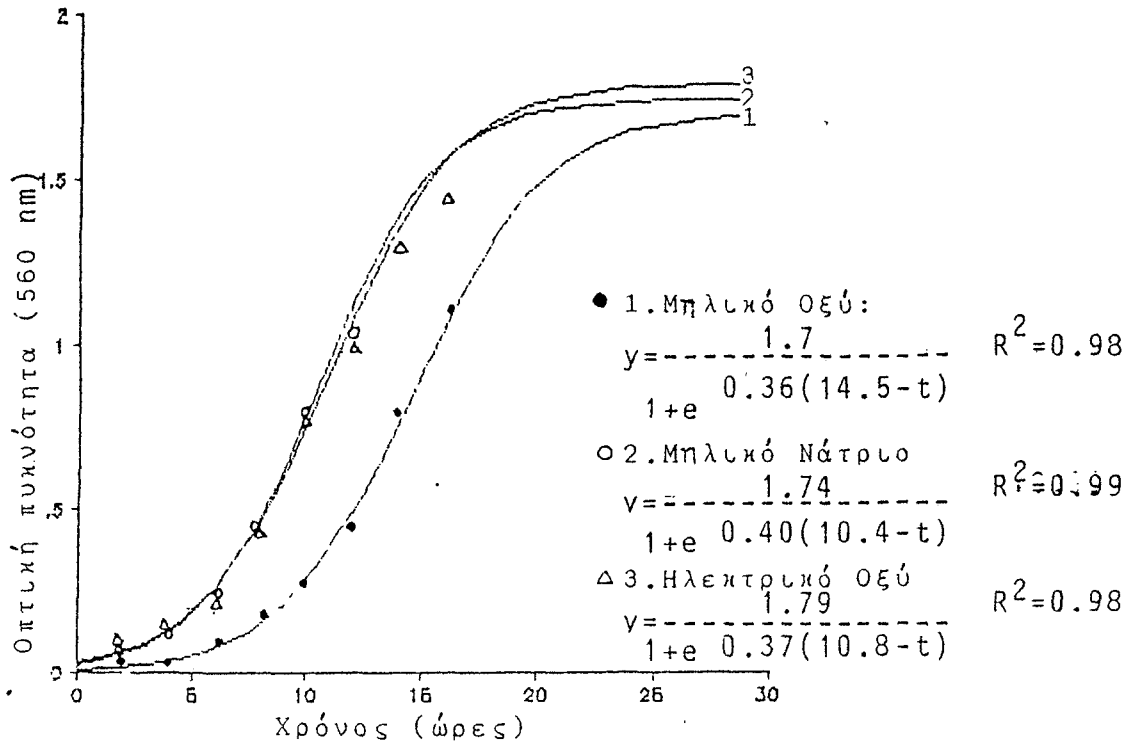
Συμπερασματικά, συγκρίνοντας τις τιμές του KA μπορούμε να πούμε ότι, οι τρεις πηγές άνθρακα (μαλικό οξύ, μαλικό νάτριο και ηλεκτρικό οξύ) <sup>δεν</sup> τροποποιούν σημαντικά την πορεία αυξήσεως των καλλιφερειών Sp7 (ATCC 29145), B , H2 και T5.



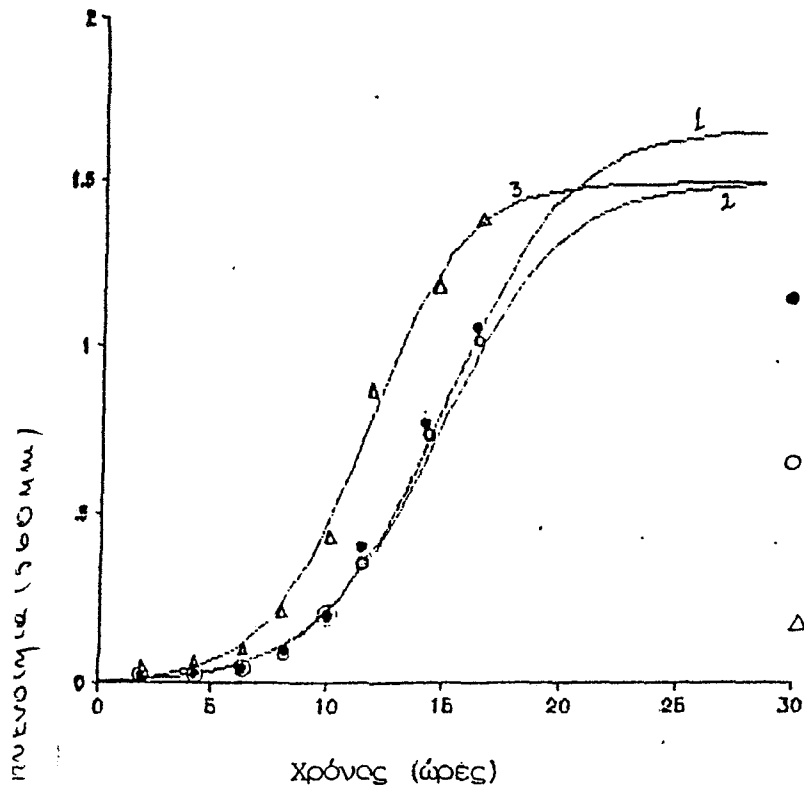
Πίνακας 6

Επίδραση της πηγής άνθρακα στη κινητική αύξηση των Azospirillum

Καλλιέργειες	Πηγή άνθρακα	παράμετροι της λοχιστικής καμπύλης			
		$\mu$ (KA)	A	T	R <sup>2</sup>
Sp7	Μηλικό οξύ	0,36	1,7	14,5	0,98
	Μηλικό νάτριο	0,40	1,74	10,4	0,99
	Ηλεκτρικό οξύ	0,37	1,79	10,8	0,98
B	Μηλικό οξύ	0,48	1,16	14,48	0,93
	Μηλικό νάτριο	0,35	1,42	15,01	0,98
	Ηλεκτρικό οξύ	0,31	1,92	14,22	0,99
H2	Μηλικό οξύ	0,39	1,66	14,87	0,99
	Μηλικό νάτριο	0,39	1,5	14,64	0,98
	Ηλεκτρικό οξύ	0,49	1,5	11,47	0,99
T5	Μηλικό οξύ	0,38	1,35	10,76	0,97
	Μηλικό νάτριο	0,41	1,09	9,92	0,95
	Ηλεκτρικό οξύ	0,43	1,4	12,35	0,99



Εικόνα 5. Γραφική παράσταση της επίδρασης της πηγής άνθρακα στη κινητική αύξηση των στελεχών Sd7(πάνω) & B(κάτω)



• 1. Μηλικό οξύ

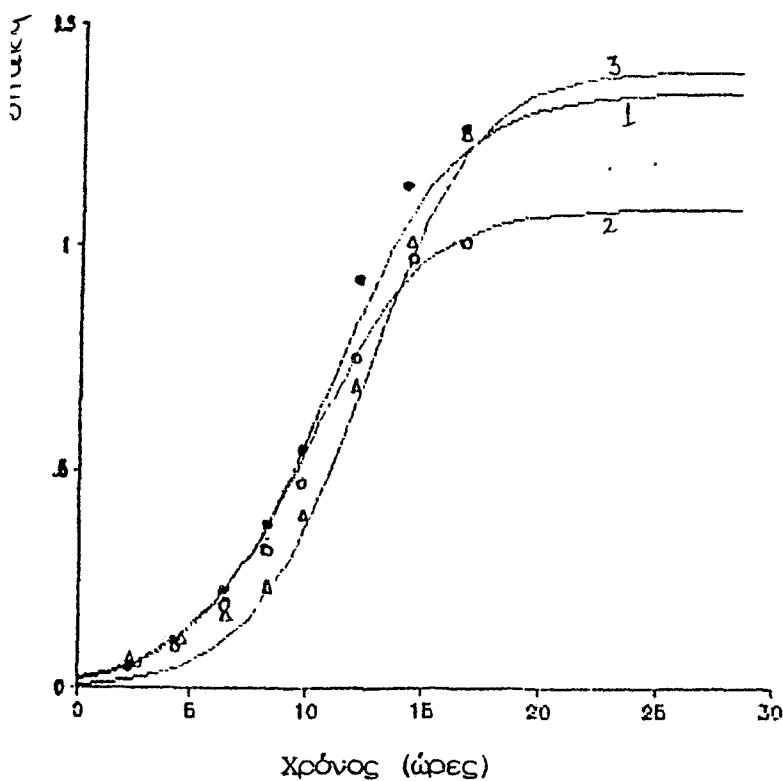
$$y = \frac{1.66}{1 + e^{0.39(14.87 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

○ 2. Μηλικό Νάτριο

$$y = \frac{1.5}{1 + e^{0.39(14.64 - t)}} \quad R^2 = 0.98$$

Δ 3. Ηλεκτρικό οξύ

$$y = \frac{1.5}{1 + e^{0.49(11.47 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$



• 1. Μηλικό οξύ

$$y = \frac{1.35}{1 + e^{0.38(10.76 - t)}} \quad R^2 = 0.97$$

○ 2. Μηλικό Νάτριο

$$y = \frac{1.09}{1 + e^{0.41(9.92 - t)}} \quad R^2 = 0.95$$

Δ 3. Ηλεκτρικό οξύ

$$y = \frac{1.4}{1 + e^{0.43(12.35 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

Εικόνα 6. Γραφική παράσταση της επίδρασης της πηγής άνθρακα στη κινητική αύξηση των στελεχών  $H_2$  (πάνω) και  $T_5$  (κάτω)

### 3. 2. Επίδραση της παρουσίας, απουσίας αζώτου στη κινητική αυξήσεως των Azospirillum.

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της παρουσίας, απουσίας αζώτου στην κινητική αυξήσεως των Azospirillum, τα υπό δοκιμή στελέχη καλλιεργήθηκαν κατ' αρχήν στο θρεπτικό υλικό με ηλεκτρικό οξύ σαν μόνη πηγή άνθρακα, αλλά ελεύθερο αζώτου. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν επί 24 ώρες στους 27 C και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των αντίστοιχων πειραματικών σειρών όπως περιγράφεται στο μέρος Υλικά και Μέθοδοι.

Στις εικόνες 7 και 8 δίδονται οι γραφικές παραστάσεις που αφορούν την πορεία του κύκλου αυξήσεως του κάθε στελέχους παρουσία, απουσία, αζώτου.

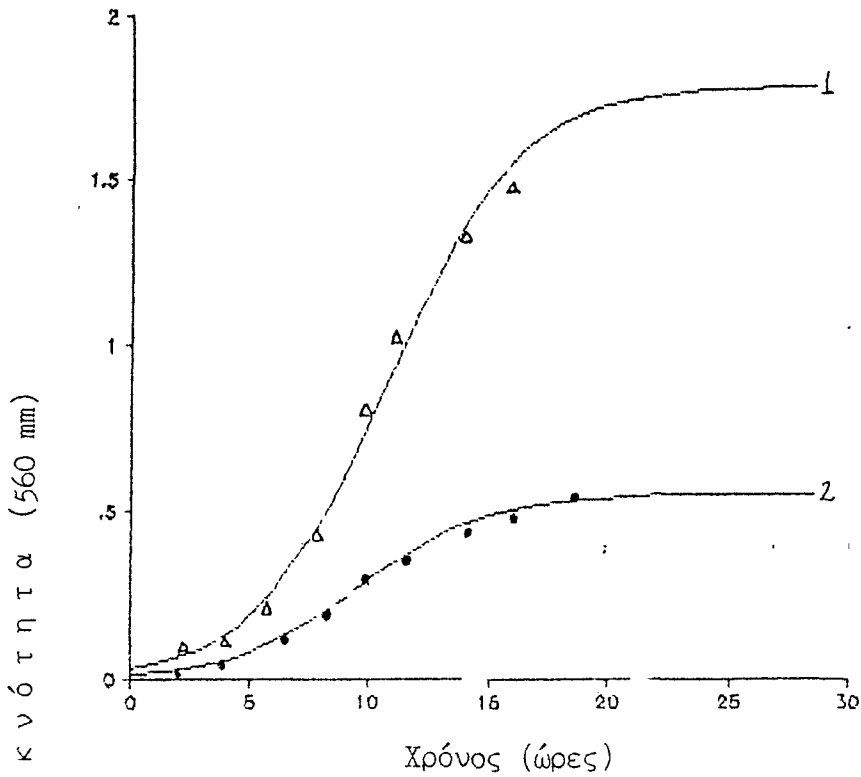
Από τις γραφικές παραστάσεις και τις παραμέτρους των αντίστοιχων εξισώσεων (πίνακας 7) προκύπτει ότι στις τέσσερις περιπτώσεις των Sp7, B, H2 και T5 η τιμή της ειδικής ταχύτητας αυξήσεως (KA) δεν επηρεάζεται από την παρουσία, απουσία αζώτου. Αντίθετα, το επίπεδο πληθυσμού στο οποίο τείνει η φάση στασιμότητας (A) είναι διπλάσιο μέχρι τετραπλάσιο στις περιπτώσεις εφοδιασμού των καλλιεργειών με άζωτο απ' ότι απουσία αζώτου.

Με εξαίρεση το στέλεχος H2, η παρουσία χλωριούχου αμμωνίου στο θρεπτικό υλικό, τείνει να μειώσει τον χρόνο T. Στο στέλεχος H2, το T είχε σχεδόν την ίδια τιμή και στις δύο πειραματικές σειρές. Το ίδιο στέλεχος παρουσίασε διπλάσιο σχεδόν επίπεδο της τιμής του A (0.67) απ' όλα τα υπόλοιπα στελέχη στις πειραματικές σειρές όπου η μόνη πηγή αζώτου ήταν το μοριακό άζωτο.

Πίνακας 7

Επίδραση της απουσίας, παρουσίας αζώτου στη κινητική αύξηση.

Καλλιέργειες	NH <sub>4</sub> Cl 1gr/l	Παράμετροι της λοχιστικής καμπύλης			
		μ(KA)	A	T	R <sup>2</sup>
Sp7	+	0,37	1,79	10,8	0,98
	-	0,37	0,56	9,76	0,99
B	+	0,31	1,92	14,22	0,99
	-	0,37	0,46	9,46	0,97
H2	+	0,49	1,5	11,47	0,99
	-	0,41	0,67	12,2	0,99
T5	+	0,43	1,4	12,35	0,99
	-	0,49	0,48	8,35	0,99

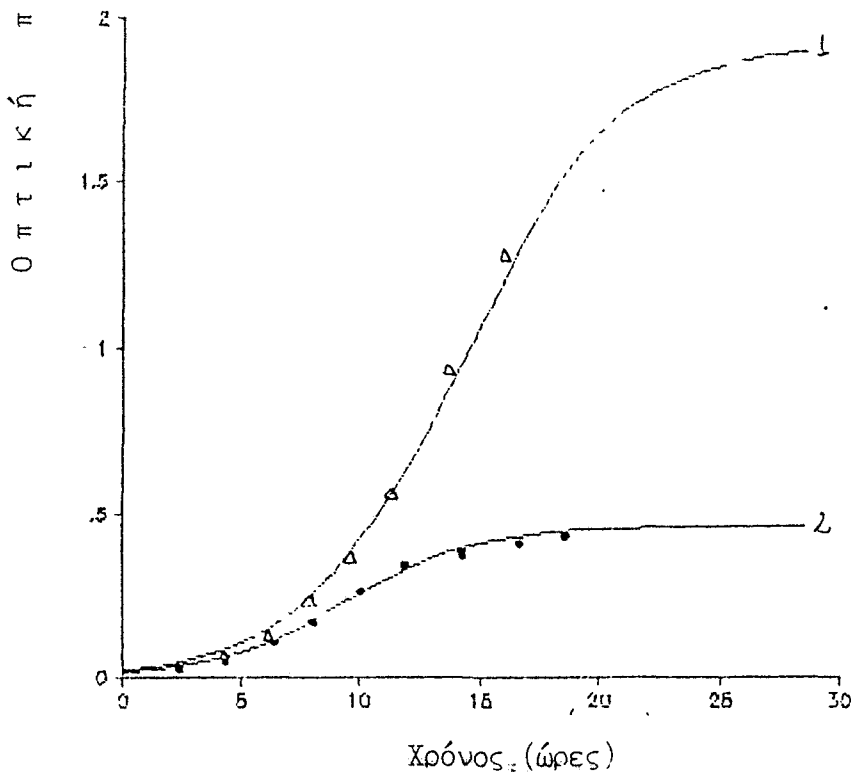


Δ 1. Με άζωτο

$$y = \frac{1.79}{1 + e^{0.37(10.8-t)}} \quad R^2 = 0.98$$

● 2. Χωρίς άζωτο

$$y = \frac{0.56}{1 + e^{0.37(9.76-t)}} \quad R^2 = 0.99$$



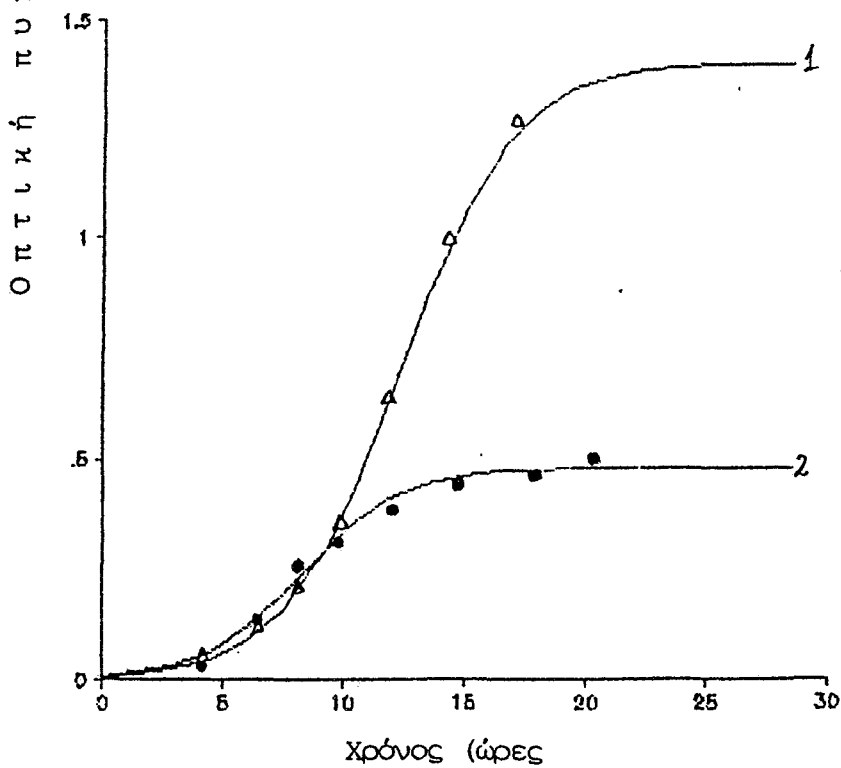
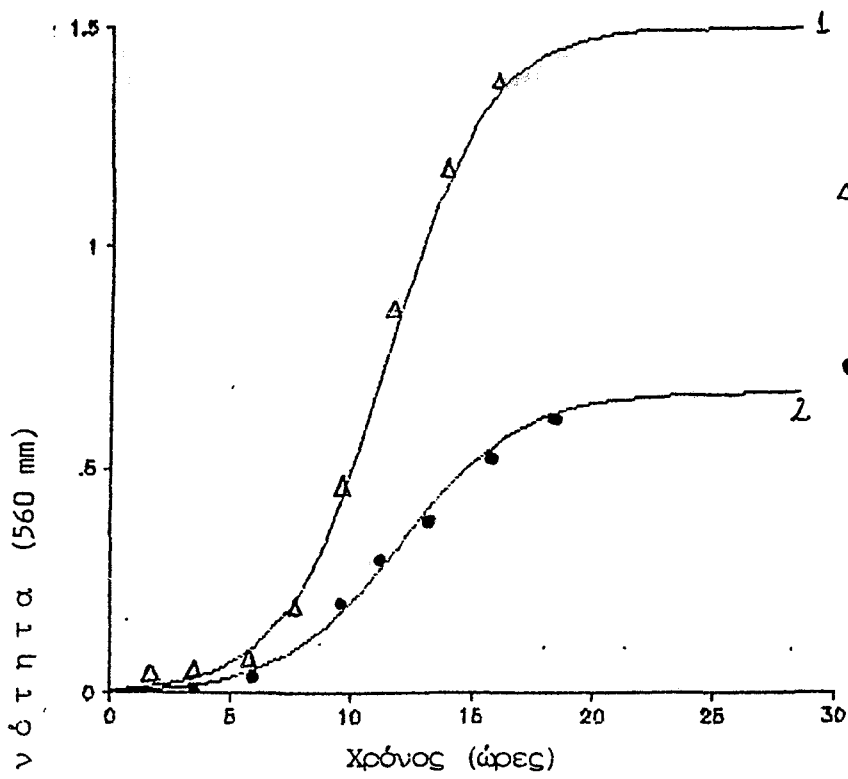
Δ 1. Με άζωτο

$$y = \frac{1.92}{1 + e^{0.31(14.22-t)}} \quad R^2 = 0.99$$

● 2. Χωρίς άζωτο

$$y = \frac{0.46}{1 + e^{0.37(9.46-t)}} \quad R^2 = 0.97$$

Εικόνα 7. Γραφική παράσταση της παρουσίας, απουσίας αζώτου στη κινητική αύξηση των στελεχών Sp7(πάνω) και B(κάτω)



Εικόνα 8. Γραφική παράσταση της επίδρασης της παρουσίας, απουσίας αζώτου στη κινητική αύξησης των στελεχών  $H_2$  (πάνω) και  $T_5$  (κάτω)

### 3.3 3. Επίδραση της θερμοκρασίας στη κινητική αύξησης.

Και στη σειρά αυτή των πειραμάτων που αφορά την μελέτη στο ρυθμό αύξησης, των τεσσάρων στελεχών Azospirillum, χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια καλλιέργειες 24 ωρών που είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό της αυτής σύνθεσης με εκείνο που χρησιμοποιήθηκε στις πειραματικές σειρές που ακολουθήσαν και αναφέρεται, ως θρεπτικό υλικό SS χωρίς άχαρ και άζωτο, στο μέρος Υλικά και Μέθοδοι.

Η πορεία αύξησης κάθε στελέχους μελετήθηκε στις θερμοκρασίες 21 C, 27 C και 35 C.

Όπως προκύπτει από τις γραφικές παραστάσεις και τις παραμέτρους των αντίστοιχων λοχιστικών εξισώσεων, η θερμοκρασία ασκεί μεγάλη επίδραση, όπως άλλωστε αναμένετο, στην πορεία αύξησης.

Σ'όλα τα στελέχη αύξηση της θερμοκρασίας επώασης από τους 21 C στους 27 C συνεπάχεται αύξηση της τιμής του  $\mu$ . Η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας από 27 C στους 35 C συνεπάχεται διαφορετική ανταπόκριση μεταξύ των στελεχών. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή του  $\mu$ , στο στέλεχος B κάμπιγεται, στο Sp7 παραμένει σχεδόν σταθερή ενώ στο στέλεχος T5 και πιο έντονα στο H2, αυξάνει.

Όσον αφορά το πληθυσμιακό επίπεδο A της φάσης στασιμότητας και T5 δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές και στις τρεις θερμοκρασίες επώασης. Στα στελέχη B και H2 αν και μεταξύ 21 C και 27 C δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά, στη θερμοκρασία 35 C σημειώνεται αύξηση της τιμής του A.

Το αντίθετο συμβαίνει με την τιμή του T. Στα στελέχη B και H2 παρατηρείται μείωση της τιμής του T με την αύξηση της



θερμοκρασίας επώασης. Ενώ στά δύο άλλα στελέχη, Sp7 και T5, παρατηρείται μείωση της τιμής του T όσον αφορά την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης από 21 C στους 27 C, όχι όμως από τους 27 C στους 35 C.

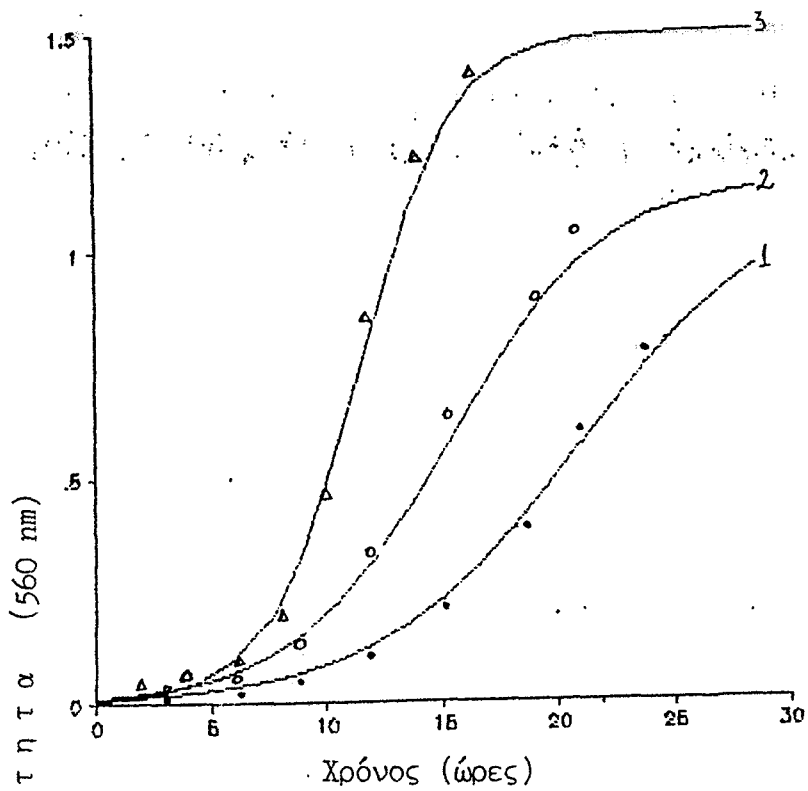
Τελικά απ'ότι είδαμε η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης από 21 C στους 27 C επιδρά καθοριστικά στην διαμόρφωση της πορείας αυξησεως των τεσσάρων στελεχών που εξετάστηκαν.

Η ουσιαστική όμως διαφοροποίηση των στελεχών που μελετήθηκαν εκδηλώνεται στη θερμοκρασία των 35 C, όπου κατά σειρά μειούμενης ανταπόκρισης τα στελέχη ακολουθούν τη σειρά H2 > T5 > Sp7 > B.

Πίνακας 8

Επίδραση της θερμοκρασίας στην κινητική αύξηση των Azospirillum

Καλλιέργειες	Θερμοκρασία επώασης	Παράμετροι της λογιστικής καμπύλης			
		$\mu(KA)$	A	T	R <sup>2</sup>
Sp7	21 C	0,235	1,55	20,04	0,99
	27 C	0,37	1,41	11,7	0,99
	35 C	0,37	1,79	10,8	0,98
B	21 C	0,24	1,25	24,35	0,99
	27 C	0,36	1,16	18,71	0,99
	35 C	0,31	1,92	14,22	0,99
H2	21 C	0,23	1,14	21,0	0,99
	27 C	0,30	1,16	15,3	0,99
	35 C	0,49	1,5	11,47	0,99
T5	21 C	0,22	1,21	19,86	0,99
	27 C	0,37	1,4	11,97	0,99
	35 C	0,43	1,4	12,35	0,99



● 1. 21°C

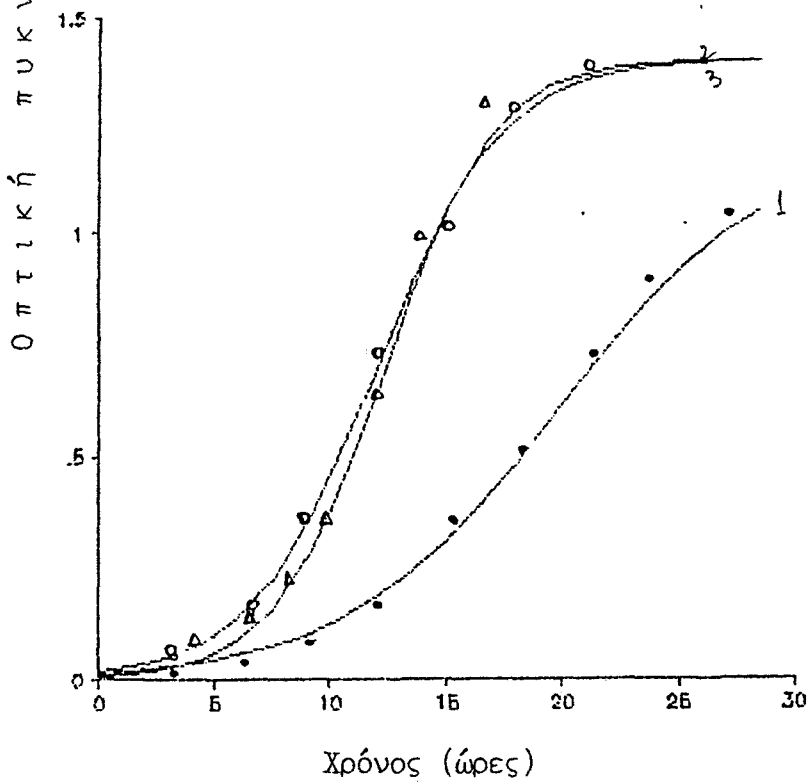
$$y = \frac{1.14}{1 + e^{0.23(21.0 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

○ 2. 27°C

$$y = \frac{1.16}{1 + e^{0.30(15.3 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

△ 3. 35°C

$$y = \frac{1.5}{1 + e^{0.49(11.47 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$



● 1. 21°C

$$y = \frac{1.21}{1 + e^{0.22(19.86 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

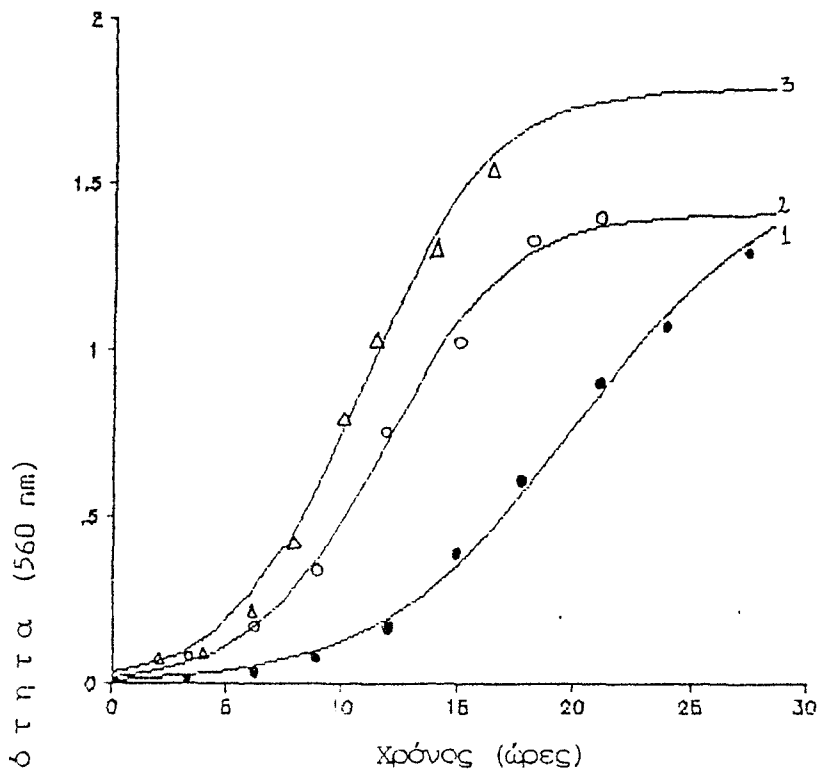
○ 2. 27°C

$$y = \frac{1.4}{1 + e^{0.37(11.97 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

△ 3. 35°C

$$y = \frac{1.4}{1 + e^{0.43(0.35 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

Εικόνα 10. Γραφική παράσταση της επίδρασης της θερμοκρασίας στη κινητική αύξηση των στελεχών  $H_2$  (πάνω) και  $T_5$  (κάτω)



● 1. 21<sup>0</sup>C

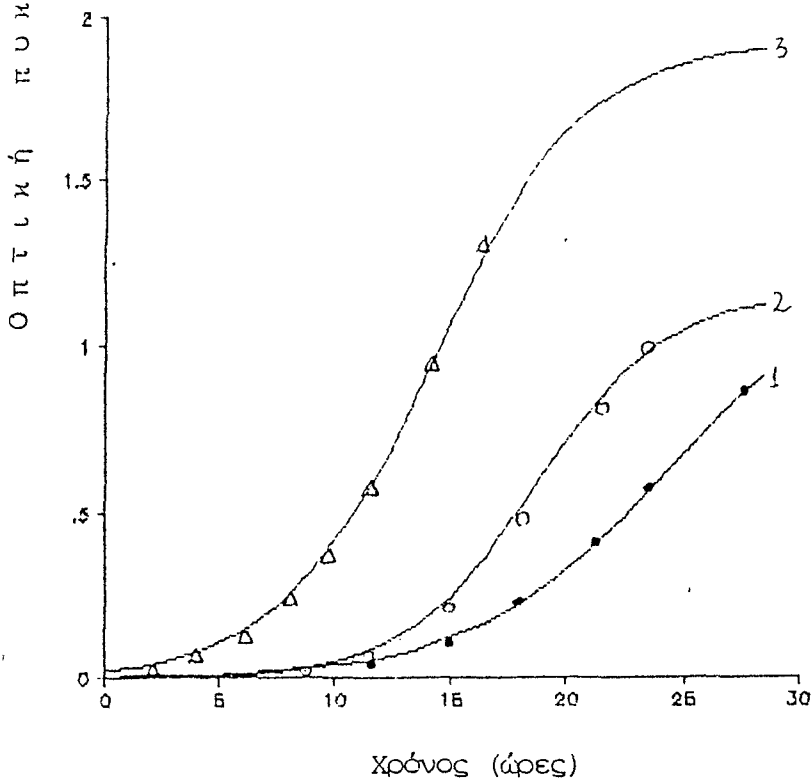
$$y = \frac{1.55}{1 + e^{0.24(20.04 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

○ 2. 27<sup>0</sup>C

$$y = \frac{1.41}{1 + e^{0.37(11.7 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

△ 3. 35<sup>0</sup>C

$$y = \frac{1.79}{1 + e^{0.37(10.8 - t)}} \quad R^2 = 0.98$$



● 1. 21<sup>0</sup>C

$$y = \frac{1.25}{1 + e^{0.24(24.35 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

○ 2. 27<sup>0</sup>C

$$y = \frac{1.16}{1 + e^{0.36(18.71 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

△ 3. 35<sup>0</sup>C

$$y = \frac{1.92}{1 + e^{0.31(14.22 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

Εικόνα 9. Γραφική παράσταση της επίδρασης της θερμοκρασίας στη κινητική αύξησης των στελεχών Sr7 (πάνω) και B (κάτω)

### 3.41. ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΖΟΣΠΙΡΙΛΛΟΝ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ

Στο πείραμα αυτό εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του ηλεκτρικού οξέος καθώς και ο ρόλος της θερμοκρασίας επώασης στην αζωτοδεσμευτική ικανότητα σε πέντε απομονώσεις Azospirillum.

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει μιά πειραματική σειρά με τρεις συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος (1,3 και 5 g/l) και επώαση στους 35 C και μιά δεύτερη πειραματική σειρά με τρία επίπεδα θερμοκρασιών (21 C, 27 C και 35 C) και σταθερό επίπεδο συγκέντρωσης ηλεκτρικού οξέος (5 g/l).

Τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 9. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 9 η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα μειώνεται με την μείωση της συγκέντρωσης του ηλεκτρικού οξέος. Η πορεία αυτής της σταδιακής μείωσης εμφανίζεται σε όλα τα στελέχη και ακολουθεί με ικανοποιητικό συντελεστή συσχέτισμού ( $R^2 > 0.99$ ) σ' όλες τις περιπτώσεις, την εξίσωση των Michaelis-Menten,

$$V = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$$

όπου S, είναι συγκέντρωση του υποστρώματος (ηλεκτρικό οξύ)

$V_{max}$ , το μέγιστο της ταχύτητας αζωτοδέσμευσης και

$K_m$ , είναι η σταθερά κορεσμού

Εφαρμόζοντας τον μετασχηματισμό Lineweaver-Burk και την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, υπολογίστηκαν οι τιμές του  $K_m$  και  $V_{max}$  (Πίνακας 9.1).

Συγκρίνοντας τις τιμές  $K_m$  των πέντε στελεχών διαπιστώνουμε ότι τα στελέχη μπορεί να αξιολογηθούν σύμφωνα με τη σειρά :

$$H2 > B > Sp59 > Sp7 > T5.$$

Δηλαδή τα στελέχη H2 και αμέσως μετά το B υπερτερούν όλων των

υπολοίπων ως προς την ικανότητα αξιοποίησης του ηλεκτρικού οξέος για την δέσμευση μοριακού αζώτου. Ο χαρακτήρας αυτός έχει ενδιαφέρον αν λάβει υπόψη του κανείς τις έντονα ανταγωνιστικές για τροφή συνθήκες που παρουσιάζονται στη ριζόσφαιρα των φυτών.

Το στέλεχος T5 δείχνει ότι είναι πιά σπάταλο ενεργειακά .

Πτωτική επίσης πορεία της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας διαπιστώνουμε και με την μείωση της θερμοκρασίας. Και στη περίπτωση αυτή το στέλεχος H2, αλλά και το στέλεχος B παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Τα δύο αυτά στελέχη στους 21 C εμφανίζουν μεγαλύτερη αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα από όλα τα υπόλοιπα. Έτσι στους 27 C έχουμε τη σειρά: H2 > Sp59 > Sp7 > B > T5 και στους 21 C τη σειρά: H2 > B > Sp59 > Sp7 > T5.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι από τα στελέχη που απομονώσαμε το στέλεχος T5 δεν παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον ενώ το στέλεχος B αλλά κυρίως το στέλεχος H2, δείχνουν να έχουν εντονότερη αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα και να είναι περισσότερο προσαρμοσμένα στις ελληνικές εδαφοκλιματικές συνθήκες

Για το πείραμα αυτό και για όλα τα πειράματα που χρειαζόταν ίδιο επίπεδο πληθυσμού των στελεχών, οι αριθμοί κυττάρων υπολογίστηκαν με βάση των ακόλουθων εξισώσεων:

1-Sp7 (ATCC 29145)	$Y(*10^5)=4240,491*(o.π.)-209,442$	$R^2=0,9959$
2-Sp59(ATCC 29707)	$Y(*10^5)=4263,82*(o.π.)-165,642$	$R^2=0,9920$
3-B	$Y(*10^5)=1350,0*(o.π.)-11,31$	$R^2=0,9970$
4-H2	$Y(*10^5)=2720,82*(o.π.)-90,289$	$R^2=0,9960$
5-T5	$Y(*10^5)=2437,586*(o.π.)-93,081$	$R^2=0,9960$

ΠΙΝΑΚΑΣ 9/1

[ Η Λ Ε Κ Τ Ρ Ι Κ Ο Ο Ξ Υ ]

$\frac{1}{C}$	Sp7	Sp59	B	H2	T5
1	0.04630	0.02890	0.02660	0.0170	0.1042
0.333	0.02169	0.01289	0.01427	0.0103	0.0362
0.200	0.01524	0.01072	0.01153	0.0088	0.0215

$$\frac{-1}{V} = \frac{-1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{-1}{S} \quad V_{max} \quad K_m$$

Sp7 :	$\frac{-1}{V} = 0.00822 + 0.0382 \cdot \frac{-1}{S}$	$R^2 = 0.99$	121.65	4.647
Sp59 :	$\frac{-1}{V} = 0.0568 + 0.0231 \cdot \frac{-1}{S}$	$R^2 = 0.99$	176.05	4.073
B :	$\frac{-1}{V} = 0.0079 + 0.0187 \cdot \frac{-1}{S}$	$R^2 = 0.99$	126.58	2.367
H2 :	$\frac{-1}{V} = 0.0068 + 0.0102 \cdot \frac{-1}{S}$	$R^2 = 0.99$	147.05	1.500
T5 :	$\frac{-1}{V} = 0.0014 + 0.1029 \cdot \frac{-1}{S}$	$R^2 = 1.00$	725.98	74.704

$$V = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$$

H2 > B > Sp59 > Sp7 > T5

ΠΙΝΑΚΑΣ 9

ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΠΗΓΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ (nmols/h/10<sup>8</sup> κύτταρα)

Στελέχη	Ηλεκτρικό οξύ gr/l	Θερμοκρασία		
		35 C	27 C	21 C
Sp7	5	65,6±2,35	55,6±1,35	23,6±1,87
	3	46,1±1,37		
	1	21,6±0,87		
Sp59	5	93,2±3,72	79,2±2,35	30,4±1,85
	3	77,6±2,85		
	1	34,6±2,25		
B	5	86,7±4,35	44,6±1,35	36,1±2,46
	3	70,1±1,35		
	1	37,6±0,87		
H2	5	113,2±2,25	90,6±1,75	48,9±1,75
	3	96,7±1,87		
	1	58,7±1,75		
T5	5	46,6±1,27	38,6±2,35	15,1±0,87
	3	27,6±0,95		
	1	9,6±0,34		

Οι τιμές υπολογίστηκαν με βάση της εξίσωσης :

$$Y(\text{nmol/h/10}^8\text{κύττ.}) = 0,3575 (\text{cm}) - 0,03 \quad R^2 = 0,998 \text{ από την}$$

καμπύλη αναφοράς αναχωχής ακετυλενίου.

### 3.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΜΗΚΟΣ ΡΙΖΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΚΟΛΕΟΠΤΙΛΩΝ ΤΟΥ ΣΙΤΑΡΙΟΥ

Στο πείραμα αυτό εξετάστηκε η πιθανή παραγωγή αυξητικών ουσιών από το Azospirillum spp. σε διάφορα επίπεδα πληθυσμού και η επίδραση τους στη βλάστηση, μήκος ριζιδίων και κολεοπτίλων στο σιτάρι. Τα επίπεδα πληθυσμού που δοκιμάστηκαν ήταν:  $1 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^6$  και  $5 \cdot 10^7$  κύττ./ml.



Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Απ'ότι φαίνεται, με εξαίρεση το στέλεχος B, αιωρήματα κυττάρων μέχρι του επιπέδου  $5 \cdot 10^5$  κυτ./ml συνεπάγονται αύξηση του μήκους των κολεοπτίλων και των ριζών. Σε μεγαλύτερα όμως πληθυσμιακά επίπεδα παρατηρείται σαφώς τοξική δράση και τόσο πιο έντονα όσο πιο μεγάλο είναι το επίπεδο του πληθυσμού. Από τα στελέχη που εξετάστηκαν (Sp7, Sp59, H2, B, T5) τη μικρότερη τοξική δράση εκδηλώνει το στέλεχος T5.

Το ευνοϊκότερο λοιπόν επίπεδο πληθυσμού φαίνεται ότι είναι της τάξεως των  $5 \cdot 10^5$  κυτ./ml για τα στελέχη Sp7 (ATCC 29145), Sp59 (ATCC 29707), H2 και T5. Το στέλεχος B φαίνεται να παράγει μεγαλύτερες ποσότητες αυξητικών ουσιών σε σύγκριση με τα άλλα στελέχη διότι η ευνοϊκή επίδραση είναι στο επίπεδο πληθυσμού  $1 \cdot 10^5$  κύττ./ml ενώ στο επίπεδο πληθυσμού  $5 \cdot 10^7$  κύττ./ml παρουσιάζει την εντονότερη τοξική δράση σε σύγκριση με τα άλλα στελέχη.

Η παραγωγή αυξητικών ουσιών από την ομάδα αυτή των βακτηρίων έχει μεγάλη σημασία στον εμβολιασμό των φυτών. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Tien et al, 1979), σύμφωνα με τα οποία εμβολιασμός των φυτών με πληθυσμούς μεγαλύτερους του  $10^6$  κύττ./ml πρέπει να αποφεύγονται.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10

Παραγωγή αυξητών ουσιών από των Azospirillum spp. και η επίδραση τους στη βλάστηση, μήκος ριζιδίων και κολεόπτιλων στο σιτάρι.

Στελέχη	Επίπεδο πληθυσμού κύττ/ml	Μήκος (mm) μετά από 96 ώρες		Βλάστηση %	
		κολεόπτιλα	ρίζες	48 ώρες	96 ώρες
Sp7	1*10 <sup>5</sup>	26.27±0.4	39.37±0.88	97	100
	5*10 <sup>5</sup>	35.66±0.47	46.9 ±1.82	100	100
	5*10 <sup>6</sup>	18.9 ±1.57	28.75±0.76	100	100
	5*10 <sup>7</sup>	12.17±1.12	17.17±1.25	80	97
Sp59	1*10 <sup>5</sup>	32.17±1.33	42.93±1.24	97	100
	5*10 <sup>5</sup>	37.37±2.23	53.2 ±2.75	100	100
	5*10 <sup>6</sup>	24.37±0.84	35.47±1.16	100	100
	5*10 <sup>7</sup>	12.17±1.38	17.6 ±0.79	93	100
B	1*10 <sup>5</sup>	33.9 ±0.9	43.1 ±1.57	93	100
	5*10 <sup>5</sup>	29.2 ±1.49	39.1 ±0.44	100	100
	5*10 <sup>6</sup>	19.1 ±1.66	27.2 ±0.7	87	97
	5*10 <sup>7</sup>	9.8 ±0.9	17.77±1.99	80	93
Π2	1*10 <sup>5</sup>	25.03±1.39	37.3±1.12	90	100
	5*10 <sup>5</sup>	34.27±1.64	43.5±0.87	97	100
	5*10 <sup>6</sup>	23.63±1.06	31.93±1.27	87	100
	5*10 <sup>7</sup>	15.53±1.46	20.73±1.57	87	97
T5	1*10 <sup>5</sup>	30.53±1.65	40.8±1.61	100	100
	5*10 <sup>5</sup>	33.77±2.7	43.83±2.53	100	100
	5*10 <sup>6</sup>	28.7 ±2.02	37.73±0.9	97	97
	5*10 <sup>7</sup>	17.23±2.02	27.1 ±1.55	97	100
Μάρτυρας	νερού	27.1±0.46	38.26±0.63	100	100
Μάρτυρας	διαλύματος	25.93±0.32	37.45±0.75	90	100

### 3.6. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΜΕ Azospirillum ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΦΥΤΩΝ ΣΙΤΑΡΙΟΥ

Στα προηγούμενα πειράματα ερευνήσαμε κατά πόσο παράχοντες όπως η θερμοκρασία, το άζωτο και η πηγή άνθρακα επιδρούν στην αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα ή στην κινητική της αύξηση.

Σημαντικό είναι όμως και το κατά πόσον η παρουσία των Azospirillum στη ριζόσφαιρα επηρεάζει την απόδοση των σιτιρών. Γι' αυτό το λόγο σχεδιάστηκε το πείραμα που ακολουθεί ώστε να ελεγχθεί η δράση των στελεχών που απομονώθηκαν στην απόδοση του σιταριού σε σύγκριση με το στέλεχος Sp7 (ATCC 29145).

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που δίδονται στον πίνακα 11, ο εμβολιασμός των φυτών με τα στελέχη Sp7, B, H2 και T5 οδήγησε σε αντίστοιχη αύξηση του νηπού βάρους τους κατά 14,1%, 24,8%, 32,6% και 21,9%, σε σύγκριση με το νηπό βάρος του μη εμβολιασμένου μάρτυρα. Σημαντική στατιστικά είναι μόνο η διαφορά που προκύπτει από τη σύγκριση του μάρτυρα, με την επέμβαση όπου τα φυτά εμβολιάστηκαν με το H2 στέλεχος.

Η προσθήκη αζώτου 15 mgr N/gr εδάφους (δεύτερο επίπεδο) προκάλεσε αύξηση στο νηπό βάρος των φυτών που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Sp7 και B, δεν επέδρασε στο μάρτυρα, καθώς και στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος H2, ενώ φαίνεται ότι επηρέασε την αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα του στελέχους T5. Γι' αυτό η σύγκριση του νηπού βάρους των φυτών που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος T5 μ' εκείνο του μάρτυρα, δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά. Αντίθετα, η σύγκριση του νηπού βάρους των φυτών που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Sp7, B και H2 με το νηπό βάρος του μάρτυρα, φανερώνει μιά αύξηση κατά 28,9%, 32,6% και 28,2% αντίστοιχα.

Όσον αφορά το ξηρό βάρος, στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Sp7, B, H2 και T5 παρατηρείται αύξηση σε σύγκριση με το μάρτυρα, κατά 26%, 20%, 27% και 23% αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντική διαφορά όμως προκύπτει μόνο από τη σύγκριση του ξηρού βάρους φυτών εμβολιασμένων με τα στελέχη Sp7 και H2 με το ξηρό βάρος του μάρτυρα. Με τη προσθήκη αζώτου (15mg N/gr εδάφους) το ξηρό βάρος των φυτών που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Sp7 και B, αυξήθηκε και στις δύο περιπτώσεις κατά 24% σε σύγκριση με το μάρτυρα. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη H2 και T5, συγκρινόμενα με το μάρτυρα, δείχνουν αύξηση του ξηρού βάρους αντίστοιχη με 17% και 10% η οποία όμως είναι μικρότερη από εκείνη που παρατηρήθηκε όταν δεν είχε προστεθεί άζωτο (πρώτο επίπεδο).

Μερικές διαφορές αποκαλύπτονται, από τη σύγκριση του νωπού και του ξηρού βάρους των ριζών μεταξύ των φυτών που εμβολιάστηκαν με στελέχη *Azospirillum* και των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες. Το γεγονός αυτό πρέπει να οφείλεται στην παραγωγή αυξητικών ουσιών.

Μπορούμε ακόμα να παρατηρήσουμε ότι οι τιμές του νωπού και του ξηρού βάρους των ριζών των φυτών που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Sp7, B και H2 και αναπτύχθηκαν χωρίς την προσθήκη αζώτου, κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα που σημειώθηκαν, όταν τα φυτά δέχτηκαν την προσθήκη αζώτου.

Τέλος, στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος H2 και δέχτηκαν τη προσθήκη 15 mg N/gr εδάφους παρατηρήθηκε μείωση στις τιμές του νωπού και του ξηρού βάρους σε σύγκριση με τα φυτά που δεν είχαν δεχθεί αζωτούχο λίπασμα. Φαίνεται επομένως ότι η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα αυτού του στελέχους επηρεάζεται

από την προσθήκη αζώτου, τουλάχιστον στο επίπεδο της δόσης που εφαρμόστηκε στο πείραμα αυτό.

Πίνακας 11

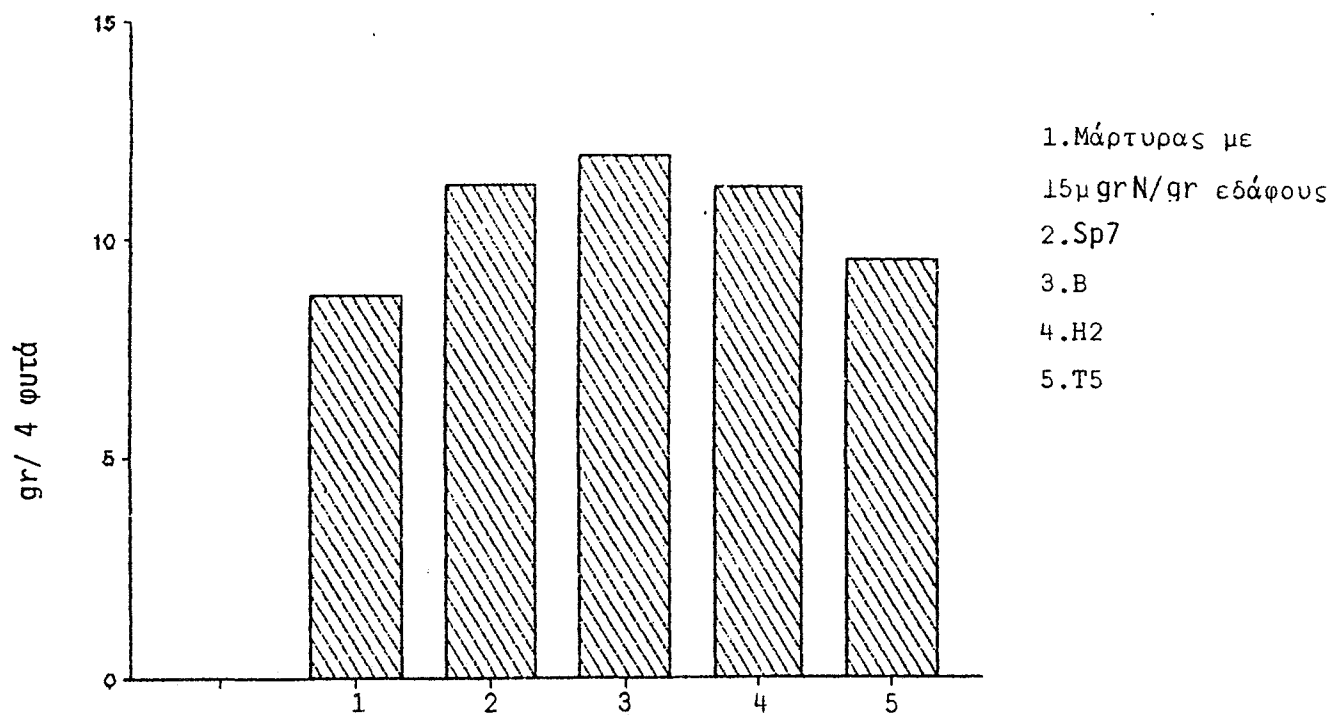
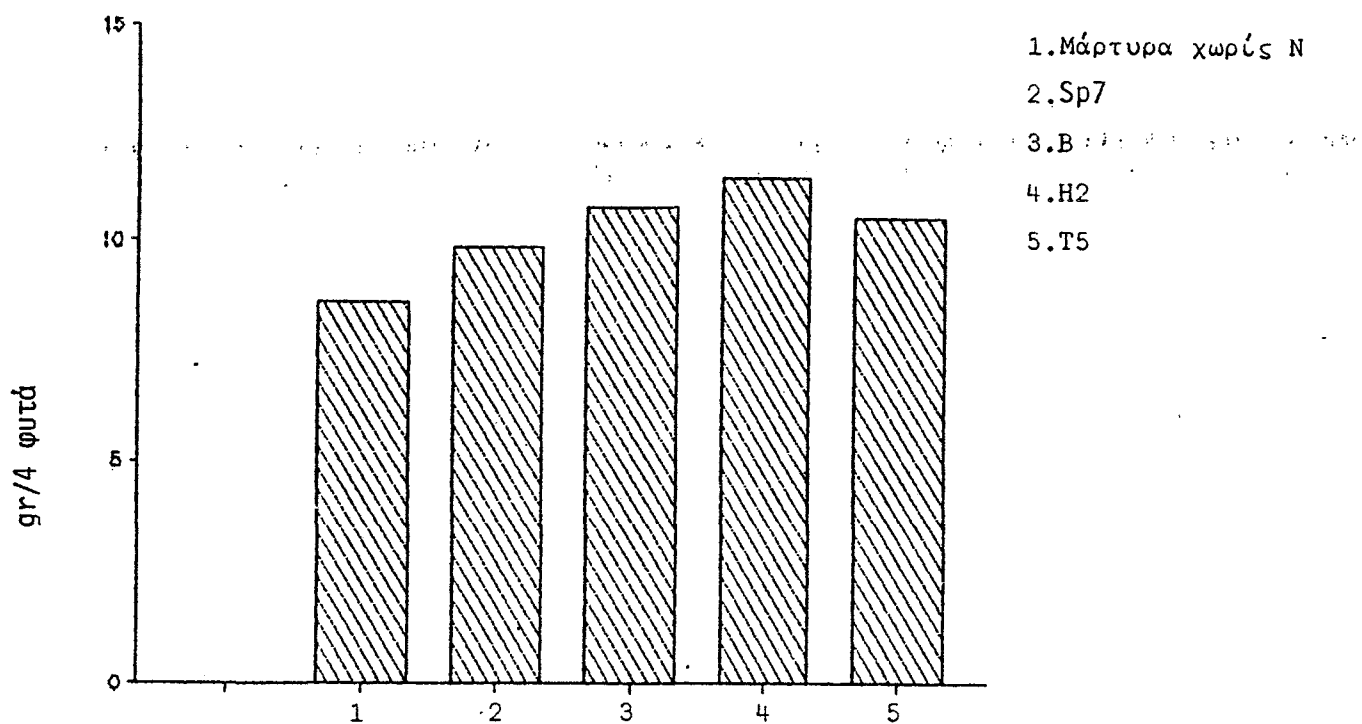
Η επίδραση των Azospirillum spp στην αύξηση του σιταριού  
Μέσος όρος των τεσσάρων επαναλήψεων (gr/4 φυτά)

Στελέχη	Βάρος βλαστού		Βάρος ρίζας		
	νυπό	ξηρό	νυπό	ξηρό	
Χ ω ρ ι ς  ά ς ω τ.	--	6,57±0,65	1,36±0,18	2,07±0,72	0,27±0,06
	Sp7	7,82±0,57	1,67±0,17	2,04±0,57	0,39±0,07
	B	8,13±0,33	1,62±0,19	2,64±0,37	0,35±0,06
	H2	8,60±1,24	1,68±0,14	2,85±0,27	0,39±0,08
	T5	7,79±0,37	1,62±0,05	2,74±0,15	0,40±0,05
Μ ε  ά ς ω τ ο	--	7,24±0,53	1,43±0,11	1,51±0,12	0,21±0,07
	Sp7	8,86±0,61	1,67±0,14	2,41±0,34	0,37±0,08
	B	9,38±1,48	1,70±0,17	2,53±0,52	0,34±0,09
	H2	8,53±1,34	1,53±0,19	2,68±0,14	0,38±0,05
	T5	7,63±0,43	1,53±0,15	1,93±0,29	0,28±0,04

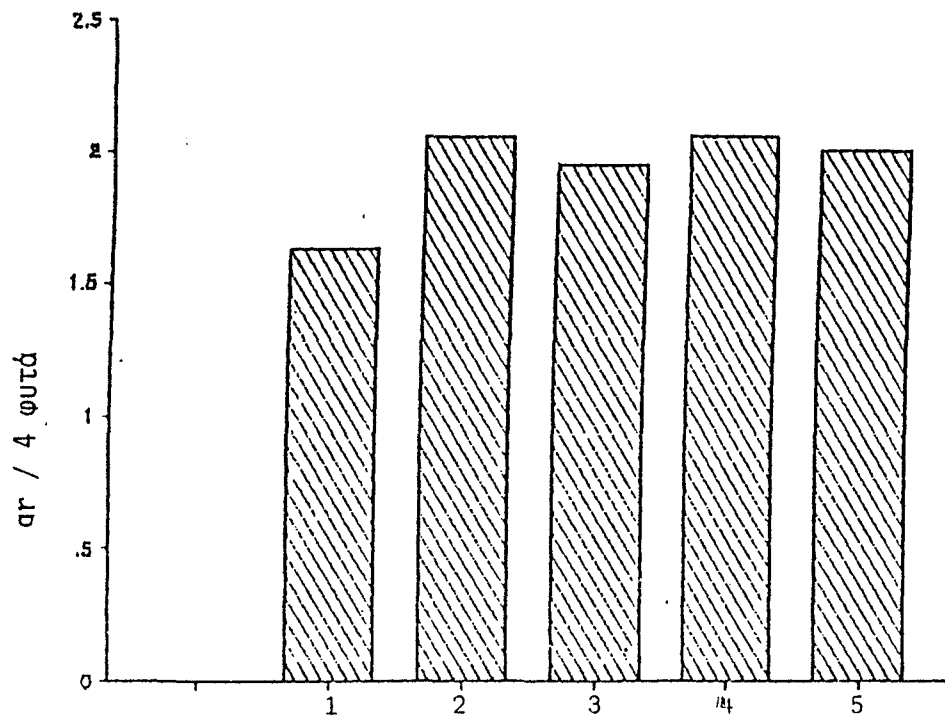
Πίνακας 11 (συνέχεια)

Στελέχη		Βάρος φυτού					
		νωπό	αύξ. %	Στατ.	ξηρό	αύξ. %	Στατ.
Χ ω ρ ι ς  ά ζ ω τ.  Μ ε  ά ζ ω τ ο	--	8,64±1,32	100	a	1,63±0,25	100	a(*)
	Sp7	9,86±0,45	114,1	a	2,06±0,18	126	b
	B	10,78±1,08	124,8	a	1,96±0,24	120	a
	H2	11,45±1,12	132,6	b	2,07±0,15	127	b
	T5	10,53±0,94	121,9	a	2,02±0,15	123	a
	--	8,75±0,63	100	a	1,64±0,14	100	a
	Sp7	11,27±1,18	128,9	b	2,04±0,16	124	b
	B	11,91±0,70	136,2	b	2,04±0,25	124	b
	H2	11,21±0,89	128,2	b	1,92±0,20	117	a
	T5	9,56±0,64	109,3	a	1,80±0,15	110	a

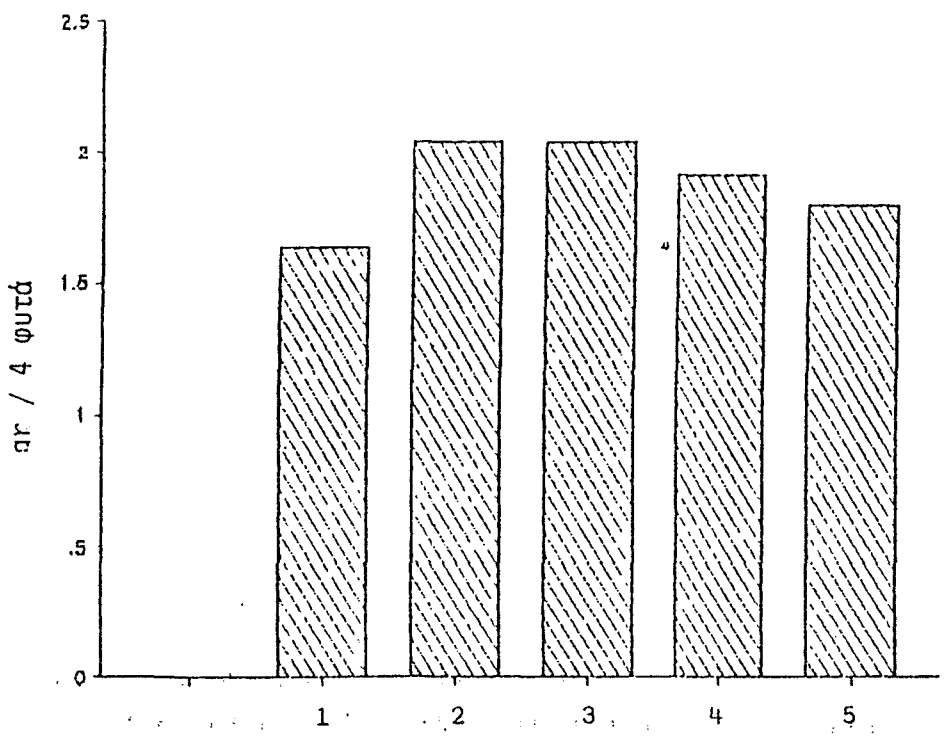
\*- Τα χράμματα δείχνουν τη σημαντική διαφορά στο επίπεδο σημαντικότητας 5%.



Εικόνα 11. Επίδραση των *Azospirillum* spp. στην αύξηση του σιταριού (νωπό βάρος φυτού)



- 1. Μάρτυρας χωρίς N
- 2. Sp7
- 3. B
- 4. H2
- 5. T5



- 1. Μάρτυρας με 15 μgr N / gr εδάφους
- 2. Sp7
- 3. B
- 4. H2
- 5. T5

Εικόνα 12. Επίδραση των *Azospirillum* spp. στην απόδοση του σιταριού (ξήρο βάρος φυτού)



3.7. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231) ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ A. brasilense Sp7 (ATCC 29145) ΚΑΙ A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707).

Στη διάρκεια προκαταρκτικών πειραμάτων όπου συγκαλλιεργήθηκε ο μύκητας P. radicicola var. graminicola με στελέχη A. lipoferum και A. brasilense εντός τριβλίων, δεν διαπιστώθηκε καμιά σχέση παρεμπόδισης. Οι αποικίες και των δύο μερών αύξαναν χωρίς να δημιουργείται μεταξύ τους ζώνη αναστολής της αύξησεως.

Η χειτνίαση στο επίπεδο τουλάχιστον της οικολογικής φωλιάς της ριζόσφαιρας, μας οδήγησε στην ιδέα να εξετάσουμε το ενδεχόμενο ύπαρξης κάποιας σχέσης αμοιβαίας ωφέλειας μεταξύ P. radicicola var. graminicola και Azospirillum.

Κρίθηκε σκόπιμο να δούμε, κατά πόσο επιδρά το υγρό καλλιέργειας του μύκητα στην πορεία αύξησης των δύο ειδών, A. brasilense Sp7 (ATCC 29145) και A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707). Ο πειραματικός σχεδιασμός περιγράφεται στο μέρος Υλικά και Μέθοδοι

Οι αριθμητικές τιμές των παραμέτρων των αντίστοιχων λοχιστικών εξισώσεων δίδονται στον πίνακα 12 και οι γραφικές παραστάσεις στις εικόνες 13 και 14. Όπως συνάχεται από τις υψηλές τιμές του συντελεστή συσχετισμού ( $R > 0.98$ ) σ' όλες τις περιπτώσεις η αύξηση ακολουθεί την πορεία της λοχιστικής εξίσωσης.

Από τα δεδομένα του πίνακα 12 προκύπτει ότι και στα δύο είδη Azospirillum η προσθήκη βιοτίνης στο υλικό Azo. medium δεν επηρεάζει την ειδική ταχύτητα αύξησεως ( $\mu = KA$ ) μήτε την τιμή του χρόνου T. Οι τιμές του επιπέδου στασιμότητας (A) επηρεάζονται ίσως από την παρουσία βιοτίνης, όχι όμως σε εντυπωσιακό βαθμό.

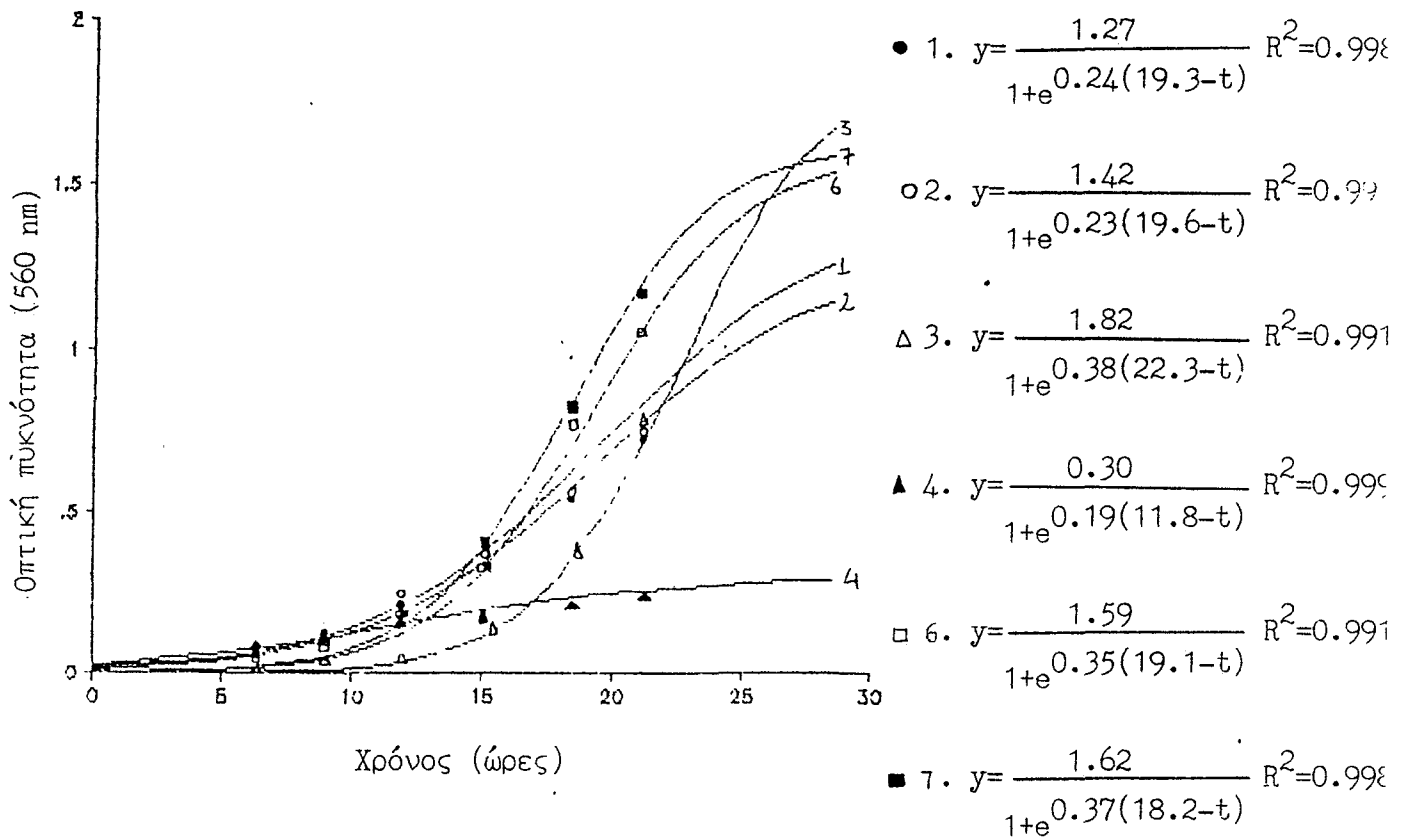
Η προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης στο Azo. medium, συνεπάγεται αξιόλογη αύξηση των τιμών της ειδικής ταχύτητας αύξησεως και του A ενώ τα σημεία της καμπής T μετατοπίζονται προς τα δεξιά κατά 3 και 4 ώρες στο A. lipoferum και A. brasilense αντίστοιχα.

Πιο ενδιαφέρουσα και κάπως απροσδόκητη ήταν η επίδραση του υλικού στο οποίο είχε καλλιεργηθεί προηγουμένως ο μύκητας P. radicicola var graminicola. Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι υλικό καλλιέργειας του μύκητα, αποδείχθηκε ότι δεν προσφέρεται για την αύξηση του A. brasilense, ενώ σαφώς καλύπτει τις θρεπτικές απαιτήσεις του A. lipoferum. Ανεξαρτήτως όμως αυτού, η προσθήκη στείρου υλικού στο οποίο είχε προηγουμένως καλλιεργηθεί ο P. radicicola var. graminicola σε υλικό Azo. medium είχε ευνοϊκή επίδραση και στα δύο είδη Azospirillum που μπορεί να συγκριθεί με αυτή της προσθήκης εκχυλίσματος ζύμης.

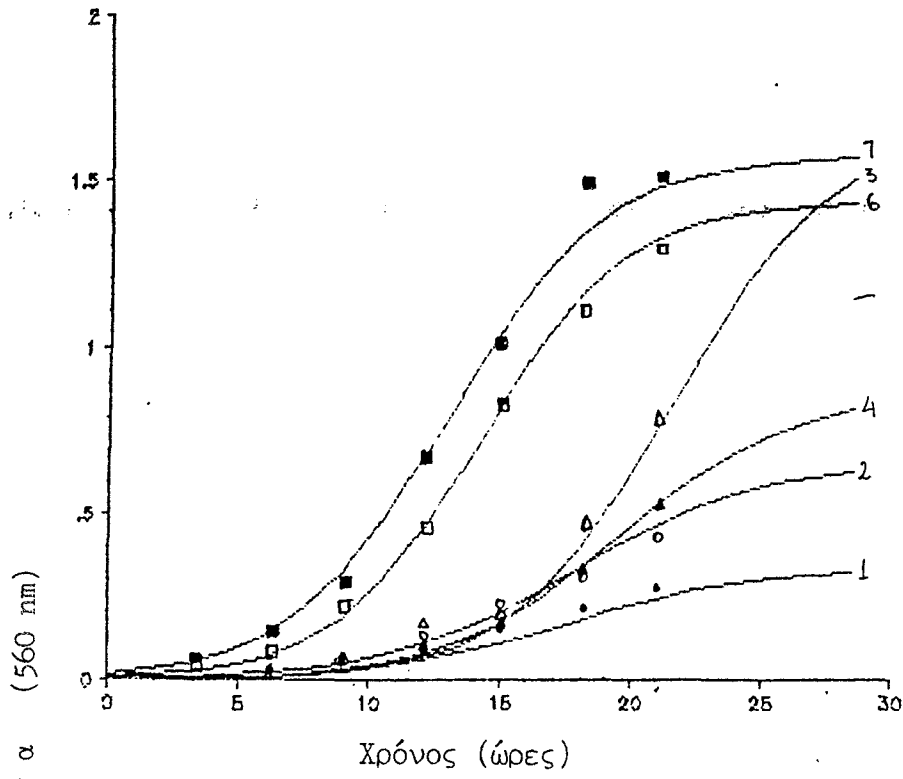
Πίνακας 12

Επίδραση του υπερκελμένου υγρού καλλιέργειας του P. radicum var graminicola στην κινητική αύξηση των A. brasilense (Sp7) και A. lipoferum (Sp59).

Στελέχη	Θρεπτικά υλικά	Παράμετροι της λοχιστικής καμπύλης			
		$\mu$ (KA)	A	T	R <sup>2</sup>
Sp7	1. Azo. medium	0,24	1,27	19,3	0,99
	2. Azo. medium+βιοτίνη	0,23	1,42	19,6	0,99
	3. Azo. medium+εκχύλ. ζύμης	0,38	1,82	22,3	0,99
	4. Υπερκείμ. υγρού Phial.	0,19	0,30	11,8	0,99
	5. Phial. medium	-	-	-	-
	6. Υπερκείμ. υγρού Phial. + +Azo. medium (1:1)	0,35	1,59	19,1	0,99
	7. Υπερκείμ. υγρού Phial. + +Azo. medium+βιοτίνη(1:1)	0,37	1,62	18,2	0,99
Sp59	1. Azo. medium	0,28	0,34	17,8	0,99
	2. Azo. medium+βιοτίνη	0,28	0,66	18,0	0,99
	3. Azo. medium+εκχύλ. ζύμης	0,34	1,65	21,5	0,99
	4. Υπερκείμενο υγρού Phial.	0,20	0,18	11,8	0,99
	5. Phial. medium	0,31	0,86	19,6	0,99
	6. Υπερκείμ. υγρού Phial. + +Azo. medium (1:1)	0,37	1,44	14,2	0,99
	7. Υπερκείμ. υγρού Phial. + +Azo. medium+βιοτίνη(1:1)	0,34	1,58	12,98	0,99



Εικόνα 13. Γραφική παράσταση της επίδρασης του υπερκείμενου υγρού του *P. radicola* var. *graminicola* (ATCC 28231) στη κινητική αύξηση του *A. brositense* sp7



● 1.  $y = \frac{0.34}{1 + e^{0.28(17.8-t)}} \quad R^2 = 0.994$

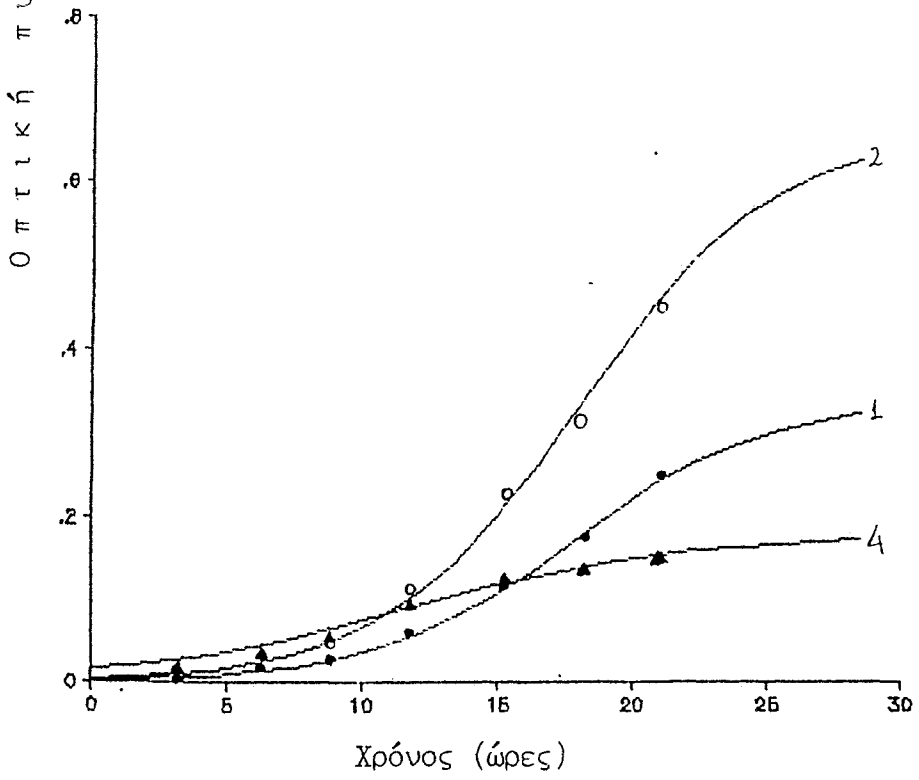
○ 2.  $y = \frac{0.66}{1 + e^{0.28(18.0-t)}} \quad R^2 = 0.992$

△ 3.  $y = \frac{1.65}{1 + e^{0.34(21.5-t)}} \quad R^2 = 0.993$

▲ 4.  $y = \frac{0.86}{1 + e^{0.31(19.6-t)}} \quad R^2 = 0.999$

□ 6.  $y = \frac{1.44}{1 + e^{0.37(14.2-t)}} \quad R^2 = 0.999$

■ 7.  $y = \frac{1.58}{1 + e^{0.34(12.98-t)}} \quad R^2 = 0.995$



● 1.  $y = \frac{0.34}{1 + e^{0.28(17.8-t)}} \quad R^2 = 0.99$

○ 2.  $y = \frac{0.66}{1 + e^{0.28(18.0-t)}} \quad R^2 = 0.99$

▲ 4.  $y = \frac{0.18}{1 + e^{0.20(11.8-t)}} \quad R^2 = 0.99$

Εικόνα 14. Γραφική παράσταση της επίδρασης του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας του *P.radicicola* var.*graminicola* (ATCC 28231) στη κινητική αύξησης του *A.lipoferum* Sp59

### 3.8. Η ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΑΝ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΑΠΟ ΤΟ A. brasilense ΚΑΙ ΤΟ A. lipoferum.

Από το προηγούμενο πείραμα προέκυψε το συμπέρασμα ότι το υπερκείμενο υγρό του P. radicola var. graminicola (ATCC 28231) ευνοεί την αύξηση των δύο ειδών A. lipoferum (Sp59) και A. brasilense (Sp7). Από την άλλη μεριά είδαμε ότι ενώ η αύξηση του A. lipoferum (Sp59) στο Phial. medium ήταν ανάλογη με αυτή στο Azo. medium το A. brasilense (Sp7) δεν αναπτυσσόταν καθόλου στο ίδιο υλικό. Η διαφορά που υπάρχει μεταξύ των δύο αυτών θρεπτικών υλικών είναι η πηγή άνθρακα. Το Phial. medium έχει γλυκόζη και ασπαραγίνη σαν πηγές άνθρακα και αζώτου που το Azo. medium δεν περιέχει. Σε σχέση με την γλυκόζη είναι γνωστό ότι χρησιμοποιείται σαν πηγή άνθρακα από το A. lipoferum και όχι από το A. brasilense. Ενώ για την ασπαραγίνη ή το ασπαραγινικό οξύ δεν υπήρχε καμία πληροφορία, τουλάχιστον μέχρι τον Απρίλη 1987 που έγιναν αυτά τα πειράματα.

Σκεφτήκαμε λοιπόν να διερευνήσουμε κατά πόσο η ασπαραγίνη και το ασπαραγινικό οξύ μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πηγές άνθρακα από το A. brasilense και A. lipoferum. Όπως περιγράφεται και στα Υλικά και Μέθοδοι χρησιμοποιήσαμε δύο συγκεντρώσεις ασπαραγίνης και ασπαραγινικού οξέος. Η μία ήταν αυτή όπως χρησιμοποιείται στο Phial. medium και η άλλη αντιστοιχούσε στην ίδια ποσότητα άνθρακα που υπάρχει στο Azo. medium.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις γραφικές παραστάσεις στις εικόνες 15 και 16 και στον πίνακα 13 όσον αφορά τη χρησιμοποίηση αυτών των πηγών άνθρακα από το A. brasilense και στις γραφικές παραστάσεις στις εικόνες 17 και 18 και στον πίνακα 14 όσον αφορά το A. lipoferum.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 13, το A. brasilense δεν αναπτύσσεται, ή αναπτύσσεται πολύ φτωχά παρουσία ασπαραχίνης και ασπαραχινικού οξέος και στις δύο συγκεντρώσεις. Αλλά και αυτή η αύξηση, όπως φαίνεται από τις χαμηλές τιμές των παραμέτρων των λοχιστικών εξισώσεων, μπορεί να οφείλεται πιά πολύ στα υπάρχοντα θρεπτικά υπολείμματα του εμβολίου.

Εξετάζοντας τον πίνακα 14, που αφορά τις παραμέτρους των λοχιστικών εξισώσεων του A. lipoferum με ασπαραχίνη και ασπαραχικό οξύ, διαπιστώνουμε ότι το A. lipoferum χρησιμοποιεί την ασπαραχίνη και το ασπαραχικό οξύ σαν πηγή άνθρακα.

Στις τιμές της ειδικής ταχύτητας αύξησης δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές είτε το A. lipoferum (Sp59) αναπτύσσεται σε ηλεκτρικό οξύ, είτε σε ασπαραχίνη ή ασπαραχικό οξύ.

Οι μέγιστες τιμές του επιπέδου στασιμότητας (A) παραιρούνται, όταν το A. lipoferum καλλιεργείται με ασπαραχίνη ή ασπαραχικό οξύ, σε σύγκριση με τις περιπτώσεις του ηλεκτρικού οξέος, και πιά πολύ στις μειωμένες συγκεντρώσεις ασπαραχίνης και ασπαραχινικού οξέος.

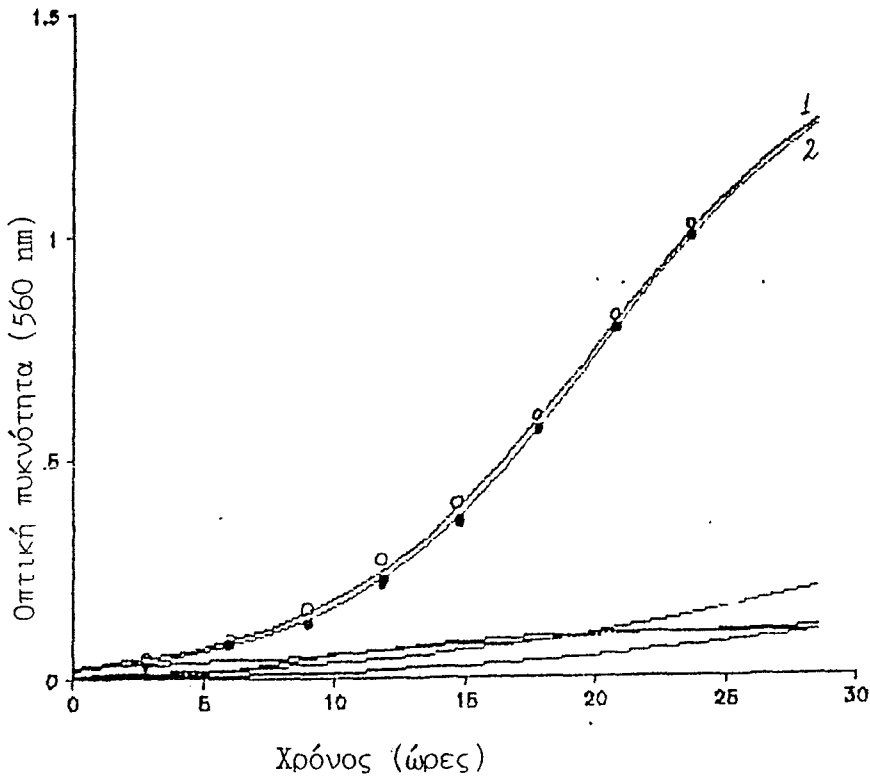
Η προσθήκη της βιοτίνης και στα δύο επίπεδα ασπαραχίνης και ασπαραχινικού οξέος δεν επηρεάζει την αύξηση του A. lipoferum. Δηλαδή όταν το A. lipoferum αναπτύσσεται παρουσία ασπαραχίνης ή ασπαραχινικού οξέος σαν μόνων πηγών άνθρακα δεν παρουσιάζει απαιτήσεις σε βιοτίνη. Μιά ανάλογη παρατήρηση αναφέρεται από τον Balis (1969) σχετικά με τις απαιτήσεις του μύκητα P. radicolae var. graminicola σε βιοτίνη παρουσία ασπαραχίνης στο θρεπτικό υλικό.

Πίνακας 13

Η χρησιμοποίηση της ασπαραχίνης και ασπαραχινικού οξέος σαν πηγή άνθρακα από A. brasilense(Sp7).

Azo.medium με πηγή άνθρακα	Παράμετροι της λοχιστικής καμπύλης			
	μ(KA)	A	T	R <sup>2</sup>
Ηλεκτρικό οξύ (5gr/l)	0,24	1,27	19,3	0,99
Ηλεκτρικό οξύ + βιοτίνη	0,23	1,42	19,6	0,99
Ασπαραχίνη (2gr/l)	-	-	-	-
Ασπαραχίνη + βιοτίνη	-	-	-	-
Ασπαραχίνη + θειαμίνη	-	-	-	-
Ασπαραχίνη + βιοτίνη + θειαμίνη	-	-	-	-
Ασπαραχινικό οξύ (2gr/l)	0,13	0,4	28,5	0,99
Ασπαραχινικό οξύ + βιοτίνη	0,32	0,1	10,1	0,99
Ασπαραχινικό οξύ + θειαμίνη	0,14	0,19	28,0	0,98
Ασπαραχινικό οξύ + βιοτίνη + θειαμίνη	0,11	0,13	13,1	0,97
Ασπαραχίνη (6,36gr/l)	0,08	0,31	24,67	0,99
Ασπαραχίνη + βιοτίνη	0,17	0,27	18,1	0,99
Ασπαραχίνη + θειαμίνη	0,13	0,28	18,8	0,98
Ασπαραχίνη + βιοτίνη + θειαμίνη	0,1	0,27	22,3	0,99
Ασπαραχινικό οξύ (5,63gr/l)	0,21	0,08	5,2	0,95
Ασπαραχινικό οξύ + βιοτίνη	0,18	0,09	7,8	0,99
Ασπαραχινικό οξύ + θειαμίνη	0,1	0,15	14,3	0,99
Ασπαραχινικό οξύ + βιοτίνη + θειαμίνη	0,14	0,1	34,5	0,99





○ 1. AZO Medium

$$y = \frac{1.45}{1 + e^{-0.21(20.02 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

● 2. AZO Medium + βιοτίνη

$$y = \frac{1.49}{1 + e^{-0.20(20.5 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

3. Ασπαραγωγικό οξύ

$$y = \frac{0.4}{1 + e^{-0.13(28.5 - t)}} \quad R^2 = 0.995$$

4. Ασπαραγωγικό οξύ + βιοτίνη

$$y = \frac{0.1}{1 + e^{-0.32(10.1 - t)}} \quad R^2 = 0.99$$

5. Ασπαραγωγικό οξύ + θειαμίνη

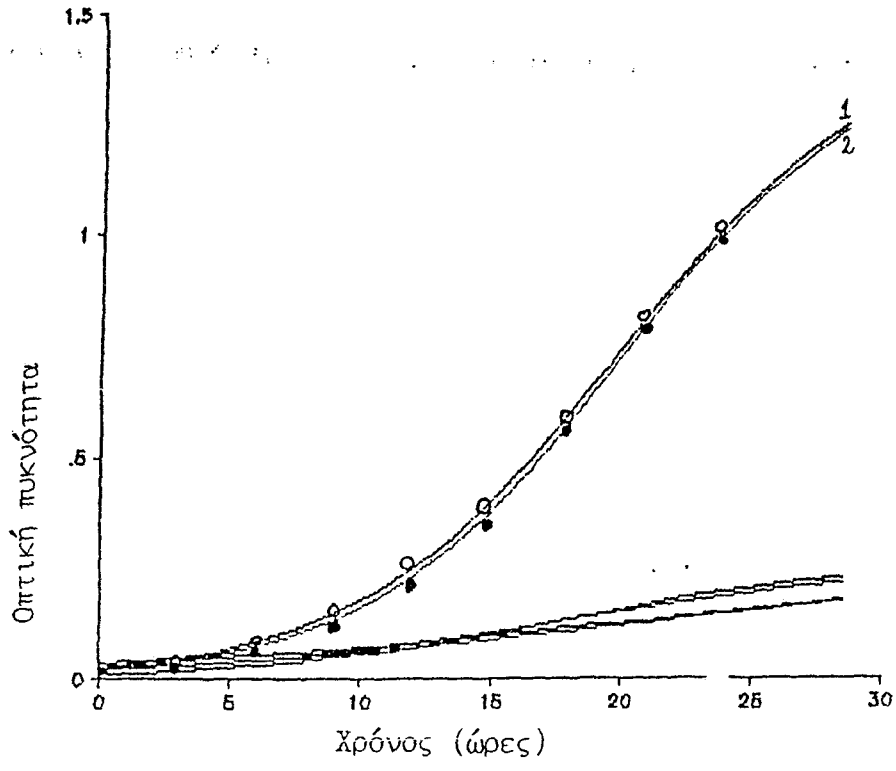
$$y = \frac{0.19}{1 + e^{-0.14(28.0 - t)}} \quad R^2 = 0.98$$

6. Ασπαραγωγικό οξύ + βιοτίνη + θειαμίνη

$$y = \frac{0.13}{1 + e^{-0.11(13.1 - t)}} \quad R^2 = 0.97$$

Εικόνα 15. Γραφική παράσταση της κινητικής αύξησης του *A. brasilense* Sp7 με Ασπαραγωγικό οξύ (2gr/l) σαν μόνη πηγή άνθρακα





Εικόνα 16. Γραφική παράσταση της κινητικής αύξησης του *A. brasilense* Sp7 με ασπαραγίνη (6,36gr/l) και ασπαραγωλικό οξύ (5.63gr/l) σαν μοναδικές πηγές άνθρακα

- 1. AZO Medium  

$$y = \frac{1.45}{1 + e^{0.21(20.02-t)}} \quad R^2 = 0.99$$
- 2. AZO Medium + βιοτίνη  

$$y = \frac{1.49}{1 + e^{0.20(20.05-t)}} \quad R^2 = 0.99$$
- 3. Ασπαραγίνη  

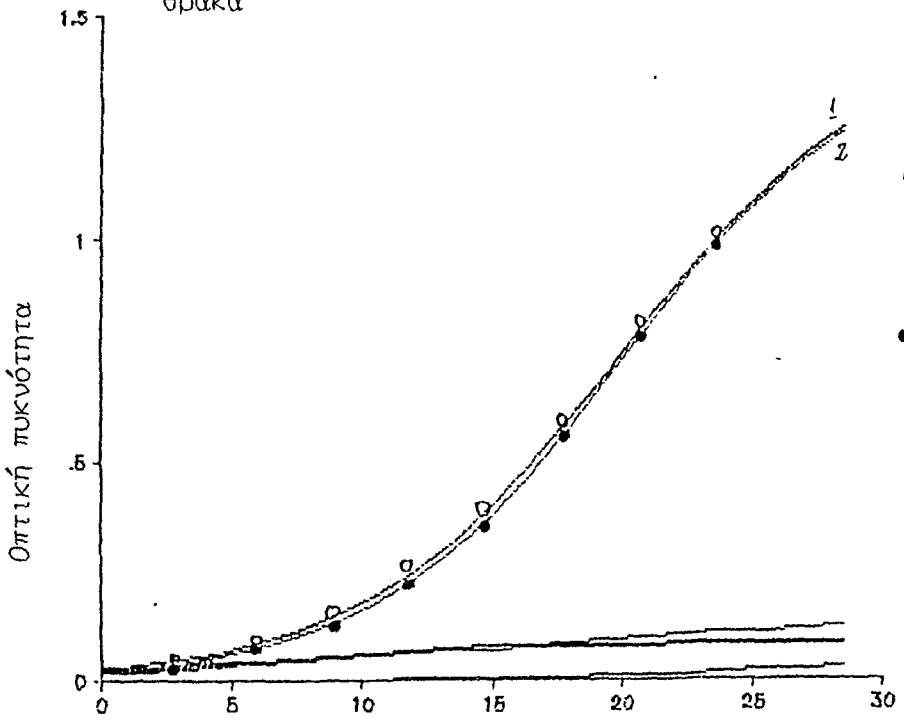
$$y = \frac{0.31}{1 + e^{0.08(24.67-t)}} \quad R^2 = 0.99$$
- 4. Ασπαραγίνη + βιοτίνη  

$$y = \frac{0.27}{1 + e^{0.17(18.1-t)}} \quad R^2 = 0.99$$
- 5. Ασπαραγίνη + θειαμίνη  

$$y = \frac{0.28}{1 + e^{0.13(18.8-t)}} \quad R^2 = 0.98$$

- 6. Ασπαραγίνη+βιοτίνη+θειαμίνη  

$$y = \frac{0.27}{1 + e^{0.1(22.3-t)}} \quad R^2 = 0.99$$



- 1. AZO Medium  

$$y = \frac{1.45}{1 + e^{0.21(20.02-t)}} \quad R^2 = 0.99$$
- 2. AZO Medium+βιοτίνη  

$$y = \frac{1.49}{1 + e^{0.20(20.05-t)}} \quad R^2 = 0.99$$
- 3. Ασπαραγωλικό οξύ  

$$y = \frac{0.08}{1 + e^{0.21(5.2-t)}} \quad R^2 = 0.95$$
- 4. Ασπαραγωλικό οξύ+ βιοτίνη  

$$y = \frac{0.09}{1 + e^{0.18(7.8-t)}} \quad R^2 = 0.99$$
- 5. Ασπαραγωλικό οξύ+θειαμίνη  

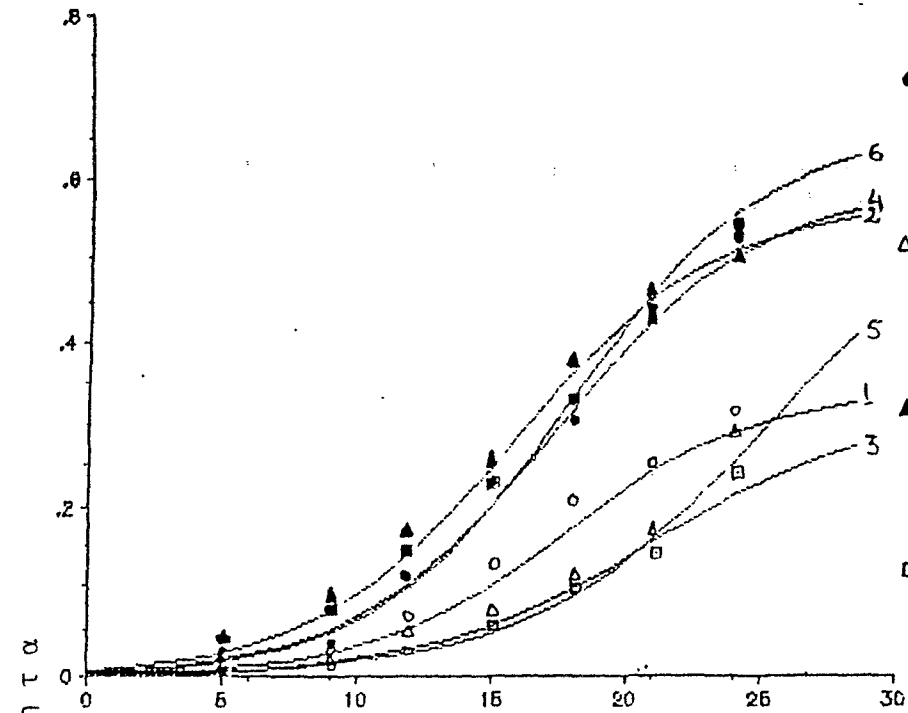
$$y = \frac{0.15}{1 + e^{0.1(14.3-t)}} \quad R^2 = 0.99$$
- 6. Ασπαραγωλικό οξύ+βιοτ.+θειαμίνη  

$$y = \frac{0.1}{1 + e^{0.1(21.5-t)}} \quad R^2 = 0.99$$

Πίνακας 14

Η χρησιμοποίηση της ασπαραγίνης και ασπαραγινικού οξέος σαν πηγή άνθρακα από το A. lipoferum.

Azo. medium με πηγή άνθρακα	Παράμετροι της λοχιστικής καμπύλης			
	$\mu$ (KA)	A	T	R <sup>2</sup>
Ηλεκτρικό οξύ (5gr/l)	0,28	0,34	17,8	0,99
Ηλεκτρικό οξύ + βιοτίνη	0,28	0,66	18,0	0,99
Ασπαραγίνη (2gr/l)	0,24	0,32	21,2	0,99
Ασπαραγίνη + βιοτίνη	0,27	0,59	17,5	0,99
Ασπαραγίνη + θειαμίνη	0,23	0,61	25,5	0,99
Ασπαραγίνη + βιοτίνη + θειαμίνη	0,27	0,57	16,0	0,99
Ασπαραγινικό οξύ (2gr/l)	0,11	1,2	27,7	0,99
Ασπαραγινικό οξύ + βιοτίνη	0,11	1,3	38,3	0,98
Ασπαραγινικό οξύ + θειαμίνη	0,21	0,45	21,1	0,98
Ασπαραγινικό οξύ + βιοτίνη + θειαμίνη	0,17	0,69	30,3	0,99
Ασπαραγίνη (6,36gr/l)	0,22	1,51	31,0	0,99
Ασπαραγίνη + βιοτίνη	0,27	1,3	26,9	0,99
Ασπαραγίνη + θειαμίνη	0,35	0,93	15,5	0,99
Ασπαραγίνη + βιοτίνη + θειαμίνη	0,17	0,67	23,4	0,98
Ασπαραγινικό οξύ (5,63gr/l)	0,18	0,91	25,7	0,99
Ασπαραγινικό οξύ + βιοτίνη	0,23	0,36	21,2	0,99
Ασπαραγινικό οξύ + θειαμίνη	0,23	1,2	20,3	0,99
Ασπαραγινικό οξύ + βιοτίνη + θειαμίνη	0,14	1,6	34,5	0,99



○ 1. AZO Medium  

$$y = \frac{0.34}{1 + e^{0.28(17.8-t)}} \quad R^2 = 0.994$$

● 2. AZO Medium + βιοτίνη  

$$y = \frac{0.66}{1 + e^{0.28(18.0-t)}} \quad R^2 = 0.992$$

△ 3. Ασπαραγίνη  

$$y = \frac{0.32}{1 + e^{0.24(21.2-t)}} \quad R^2 = 0.998$$

▲ 4. Ασπαραγίνη + βιοτίνη  

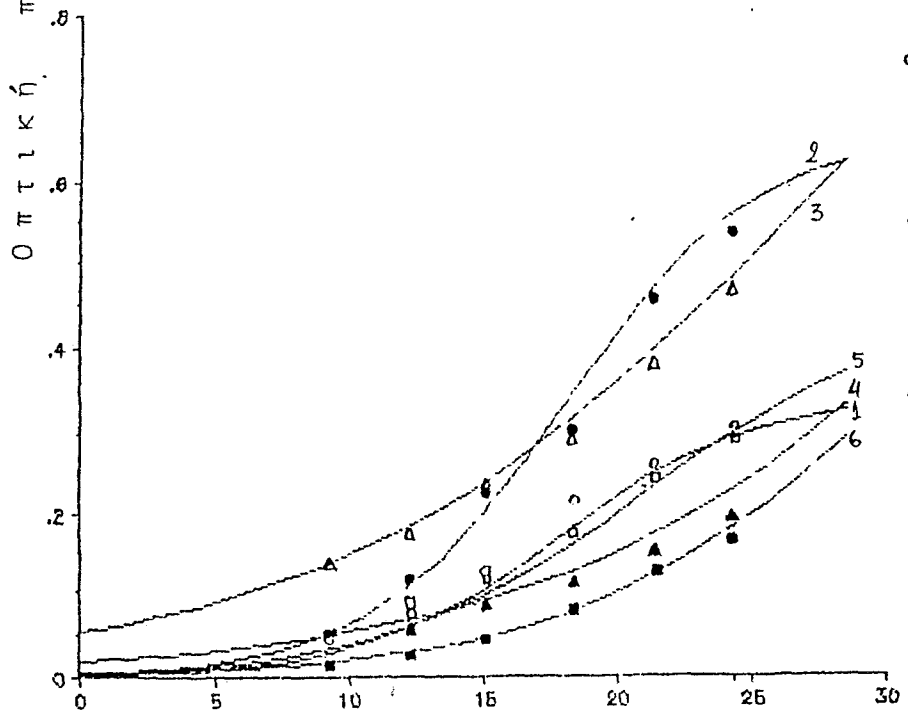
$$y = \frac{0.59}{1 + e^{0.27(17.5-t)}} \quad R^2 = 0.994$$

□ 5. Ασπαραγίνη + θειαμίνη  

$$y = \frac{0.61}{1 + e^{0.23(25.5-t)}} \quad R^2 = 0.995$$

■ 6. Ασπαραγίνη+βιοτίνη+θειαμίνη  

$$y = \frac{0.57}{1 + e^{0.27(16.0-t)}} \quad R^2 = 0.995$$



○ 1. AZO Medium  

$$y = \frac{0.34}{1 + e^{0.28(17.8-t)}} \quad R^2 = 0.994$$

● 2. AZO Medium + βιοτίνη  

$$y = \frac{0.66}{1 + e^{0.28(18.0-t)}} \quad R^2 = 0.992$$

△ 3. Ασπαραγωγικό οξύ  

$$y = \frac{1.2}{1 + e^{0.11(27.7-t)}} \quad R^2 = 0.999$$

▲ 4. Ασπαραγωγικό οξύ + βιοτίνη  

$$y = \frac{1.3}{1 + e^{0.11(38.3-t)}} \quad R^2 = 0.986$$

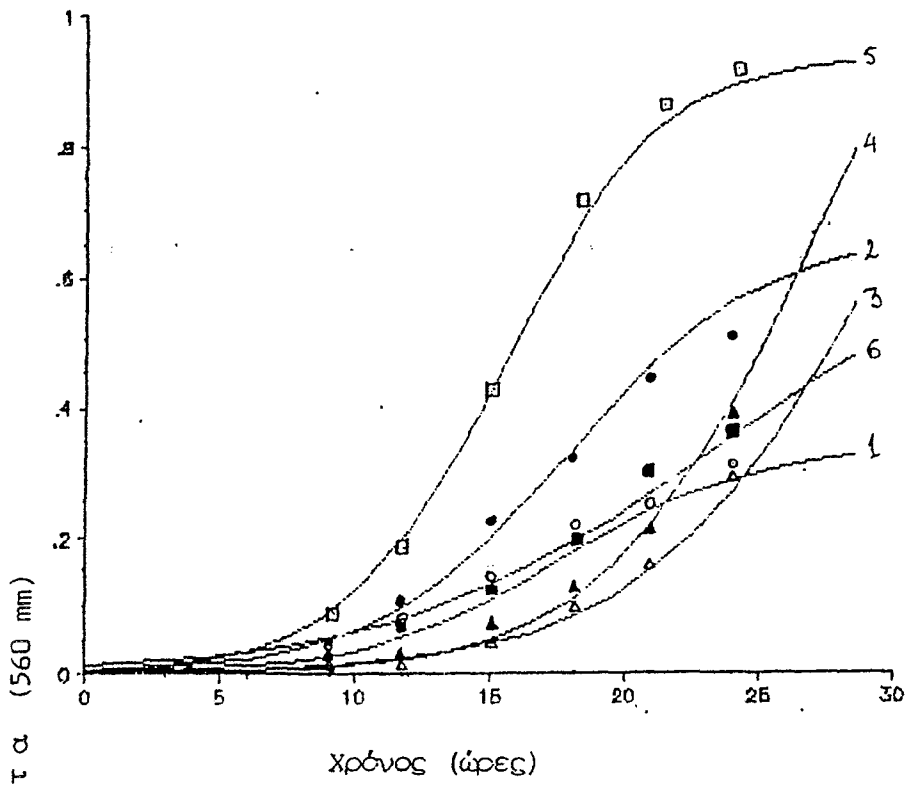
□ 5. Ασπαραγωγικό οξύ + θειαμίνη  

$$y = \frac{0.45}{1 + e^{0.21(21.1-t)}} \quad R^2 = 0.985$$

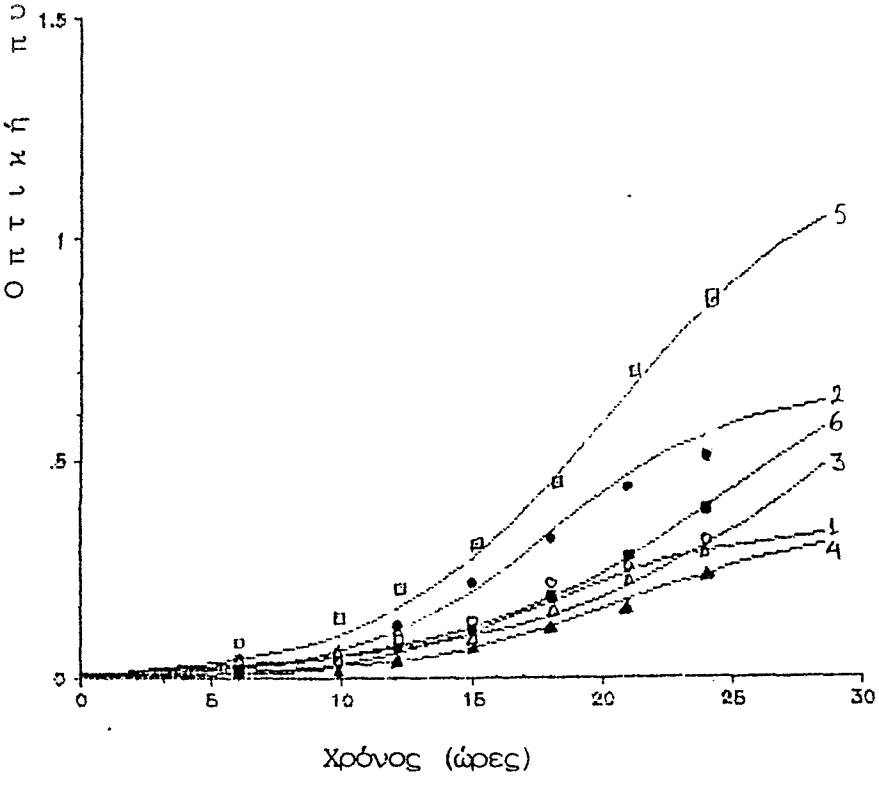
■ 6. Ασπαραγωγικό οξύ + βιοτίνη + θειαμίνη  

$$y = \frac{0.69}{1 + e^{0.17(30.3-t)}} \quad R^2 = 0.99$$

Εικόνα 17. Γραφική παράσταση της κινητικής αύξησης του *A. lipoferum* Sp59 με ασπαραγίνη (2gr/l πάνω) και ασπαραγωγικό οξύ (2gr/l κάτω) σαν μοναδικές πηγές άνθρακα



$\circ$  1.  $y = \frac{0.34}{1 + e^{0.28(17.8-t)}}$   $R^2 = 0.994$   
 $\bullet$  2.  $y = \frac{0.66}{1 + e^{0.28(18.0-t)}}$   $R^2 = 0.992$   
 $\Delta$  3.  $y = \frac{1.51}{1 + e^{0.22(31.0-t)}}$   $R^2 = 0.996$   
 $\blacktriangle$  4.  $y = \frac{1.3}{1 + e^{0.27(26.9-t)}}$   $R^2 = 0.996$   
 $\square$  5.  $y = \frac{0.93}{1 + e^{0.35(15.5-t)}}$   $R^2 = 0.996$   
 $\blacksquare$  6.  $y = \frac{0.67}{1 + e^{0.17(23.4-t)}}$   $R^2 = 0.987$



$\circ$  1.  $y = \frac{0.34}{1 + e^{0.28(17.8-t)}}$   $R^2 = 0.994$   
 $\bullet$  2.  $y = \frac{0.66}{1 + e^{0.28(18.0-t)}}$   $R^2 = 0.992$   
 $\Delta$  3.  $y = \frac{0.91}{1 + e^{0.18(25.7-t)}}$   $R^2 = 0.995$   
 $\blacktriangle$  4.  $y = \frac{0.36}{1 + e^{0.23((21.2-t)}}$   $R^2 = 0.998$   
 $\square$  5.  $y = \frac{1.2}{1 + e^{0.23(20.3-t)}}$   $R^2 = 0.997$   
 $\blacksquare$  6.  $y = \frac{1.6}{1 + e^{0.14(34.5-t)}}$   $R^2 = 0.995$

Εικόνα 18. Γραφική παράσταση της κινητικής αύξησης του *A.lipoferum* με ασπαράγη (6.36 gr/l πάνω) και ασπαραγινόξυ (5.63gr/κάτω) σαν μοναδικές πηγές άνθρακα

### 3.9. ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΗΣ ΣΑΝ ΜΟΝΗ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΑΠΟ ΤΩΝ Azospirillum spp.

Από τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος είδαμε ότι η ασπαραζίνη <sup>χρησιμοποιείται</sup> σαν μόνη πηγή άνθρακα από το A. lipoferum και όχι από το A. brasilense.

Θα ήταν ενδιαφέρον λοιπόν να δούμε κατά πόσο ισχύει αυτός ο διαχωριστικός χαρακτήρας για όλα τα στελέχη που έχουν απομονωθεί στο εργαστήριο Μικροβιολογίας της ΑΓΣΑ.

Τα παρακάτω αποτελέσματα δείχνουν ότι, σύμφωνα και με τις άλλες βιοχημικές δοκιμές (σελίδα 72), τα στελέχη που έχουν θεωρηθεί A. lipoferum χρησιμοποιούν την ασπαραζίνη σαν μόνη πηγή άνθρακα όπως την γλυκόζη (Sp59, A και H2/N2), ενώ τα στελέχη που έχουν θεωρηθεί A. brasilense δεν μπορούν να αναπτυχθούν με ασπαραζίνη σαν μόνη πηγή άνθρακα (Sp7, B, Γ, Δ, E, 4a1, 4a2, 4a4, H2, H3 και T5).

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 15

Χρησιμοποίηση της ασπαραζίνης σαν μόνη πηγή άνθρακα από Azospirillum spp.

Στέλεχος	Ικανότητα ανάπτυξης σε ασπαραζίνη
Sp7 (ATCC 29145)	-
Sp59(ATCC 29707)	+
Δ	+
B	-
Γ	-
Δ	-
E	-
4a1	-
4a2	-
4a4	-
H2	-
H3	-
H2/N2	+
T5	-

3.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΣΥΝΟΔΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ  
Phialophora raditicola var. graminicola (ATCC 28231).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η προμήθεια της καλλιέργειας P. raditicola var. graminicola έγινε από την Πρότυπη Συλλογή Καλλιεργειών των ΗΠΑ (ATCC 28231). Η καλλιέργεια αυτή έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε πειραματικές εργασίες του Deacon. Όταν καλλιεργείται στα συνήθη θρεπτικά υλικά (PDA, Czapeck κλπ) είναι σαφώς καθαρή και ελεύθερη βακτηριακών μολύνσεων. Όταν όμως διαπιστώθηκε ότι ο μύκητας αυτός ευνοεί την αύξηση του A. lipoferum και A. brasiliense, και μάλιστα ότι οι απαιτήσεις σε βιοτίνη του A. lipoferum αναιρούνται παρουσία ασπαραχίνης, όπως ακριβώς και του P. raditicola var. graminicola, μπήκε η υποψία κατά πόσον είναι δυνατόν να υφίστατο κάποια πιο στενή σχέση μεταξύ των δύο αυτών μικροβιακών ειδών. Με αυτές τις σκέψεις έγιναν μια σειρά από μικροσκοπικές παρατηρήσεις όπου διαπιστώθηκε ότι σε εμφανώς καθαρές καλλιέργειες του P. raditicola var. graminicola υπήρχαν στο εσωτερικό των χρησιμοποιούμενων κυρίως υφών κινητά εξαιρετικά μικρών διαστάσεων βακτήρια. Προσπάθειες να απομονωθούν στα συνήθη βακτηριολογικά θρεπτικά υλικά απέβησαν άκαρπες. Όταν όμως χρησιμοποιήθηκε ελεύθερο αζώτου θρεπτικό υλικό RC, μετά τρεις ημέρες επώαση στους 30 C εμφανίστηκε μια αποικία ρόζ που δεν συσκέπνυμε την χρωστική Congo Red και μετά από άλλες τέσσερις ημέρες εμφανίστηκε και ο μύκητας που όμως δεσμεύει το κόκκινο χρώμα της χρωστικής αυτής.

Για την παραλαβή καθαρής καλλιέργειας αυτού του βακτηρίου εφαρμόσαμε επανειλημμένες χημικές διασπορές σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό ελεύθερου αζώτου RC. Οι αποικίες του βακτηρίου αυτού εμφανίζουν έναν χαρακτηριστικό ιριδισμό.



## Βιοχημικές δοκιμές

Από τις βιοχημικές δοκιμές που παρουσιάζονται στον πίνακα 16 βλέπουμε ότι το βακτήριο, που απομονώσαμε από τη καλλιέργεια του P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231), είναι κινητό Gr - (αρνητικό), πιο μικρό από τα Azospirillum (βλέπε την φωτογραφία). Διαφέρει από τα Azospirillum, κυρίως διότι δεν είναι ικανό να χρησιμοποιεί γλυκόζη, φρουκτόζη ή ασπαραχίνη σαν μόνη πηγή άνθρακα και δεν έχει απαιτήσεις σε βιοτίνη.

## Αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα

Αφού το βακτήριο αυτό απομονώθηκε και αναπτυσσόταν σε θρεπτικό υλικό ελεύθερο αζώτου κάναμε την υπόθεση ότι δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο και προσπαθήσαμε να μετρήσουμε την αζωτοδεσμευτική δραστηριότητά του.

Γι' αυτό από καλλιέργεια 24 ωρών σε MPSS εμβολιάσαμε φιαλίδια όγκου 28 ml που περιείχαν 10 ml θρεπτικό υλικό Nfb, σε τρεις επαναλήψεις. Μετά από 48 ώρες επώαση στους 30 C προσθέσαμε 10% ακετυλένιο. Μετά από 8 ώρες στην ίδια θερμοκρασία (30 C) πήραμε ένδειξη παραγωγής αιθυλενίου στον αεροχρωματογράφο που με βάση της καμπύλης αναφοράς ( $Y=0,001(\text{mm})-0,006$ ) υπολογίσθηκαν ότι ήταν της τάξεως των 0,16 μg αιθυλένιο/φιαλίδιο.

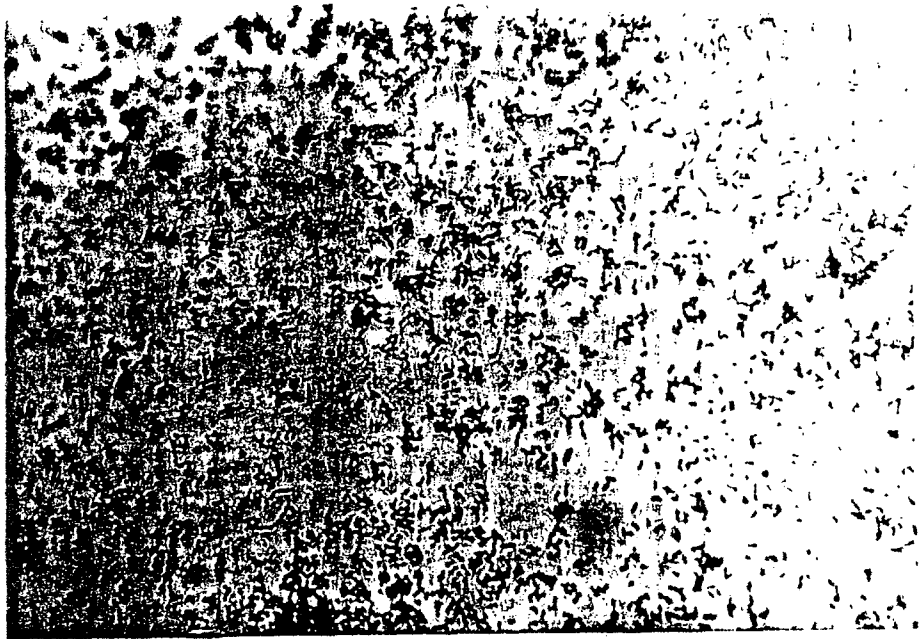
ΠΙΝΑΚΑΣ 16

Βιοχημικές δοκιμές του βακτηρίου που απομονώθηκε από τον μύκητα P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231).

Χαρακτήρες	Το βακτήριο
Ικανότητα ανάπτυξης σε γλυκόζη	-
ασπαραγίνη	-
ανάγκες σε βιοτίνη	-
αντίδραση στη χρώση Gram	Gr-
κινητό	+
Αερόβια παραγωγή οξέων από υδατάνθρακες	
γαλακτόζη, αραβινόζη	+
ριβόζη, ραμνόζη	+
φρουκτόζη, μαννιτόλη, σορβιτόλη	
ινοσιτόλη, Ξυλόζη	-
μελιβιόζη, λακτόζη	+
δουλοσιτόλη, μαλιόζη, σακχαρόζη, κελλοβιόζη, ερυθριτόλη	-
Αυξοχρωμική μέθοδος χιά μοναδικές πηγές άνθρακα	
ηλεκτρικό, μαλικό,	
πυροσταφυλικό, φουμαρικό	+
γλουκονικό, φρουκτόζη, γλυκόζη	-
προπιονικό, κυτρικό, α-κετογλουταρικό	+
ριβόζη, μαλονικό, γαλακτικό	+
μαννιτόλη, σορβιτόλη	-
γαλακτόζη, αραβινόζη	+
γλυκερόλη, β-υδροξυβουτυρικό	+

Εικόνα 19

Φωτογραφία από μικροσκοπικό παρασκεύασμα στο N<sub>FD</sub> Medium του βακτηρίου που απομονώθηκε από την καλλιέργεια του μύκητα *P.radicicola* var. *graminicola*(ATCC 28231).(1000 X)



### 3.11. Η ΣΥΝΕΠΕΙΑ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΗ ΤΩΝ Azospirillum ΚΑΙ ΤΟΥ P. radicum var. graminicola ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΣΙΤΑΡΙΟΥ.

Από τα πειραματικά δεδομένα που εκτέθηκαν προηγουμένως προκύπτει ότι σε καθαρή καλλιέργεια δεν υφίστανται παρεμποδιστικές σχέσεις μεταξύ των δύο μικροοργανισμών.

Αντίθετα, η παρουσία του μύκητα P. radicum var. graminicola ευνοεί την ανάπτυξη των ειδών Azospirillum. Τι συμβαίνει όμως, στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας των σιτηρών, όπου αλληλεπιδρούν πολλοί παράγοντες;

Γι'να απαντηθεί το ερώτημα αυτό φυτά σιταριού αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα πυριτικής άμμου χωρίς προσθήκη αζωτούχου λιπάσματος. Οι μόνες επεμβάσεις αφορούσαν τον εμβολιασμό τον εμβολιασμό του του ριζικού συστήματος των επιμέρους πειραματικών σειρών με τα είδη: A. brasilense, A. lipoferum, P. radicum var. graminicola καθώς και τους συνδυασμένους εμβολιασμούς P. radicum var. graminicola + A. brasilense και P. radicum var. graminicola + A. lipoferum.

Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος δίνονται στον πίνακα 17. Όπως παρατηρούμε, από τη σύγκριση των τιμών του ξηρού βάρους των ριζών δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων. Φαίνεται ότι αυτό οφείλεται στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, γιατί αφ'ενός το πότισμα γινόταν με απεσταχμένο νερό και αφ'ετέρου το υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών (άμμος) περιείχε ελάχιστα θρεπτικά στοιχεία.

Σημαντικές διαφορές έχουμε από τη σύγκριση των τιμών του ξηρού βάρους των βλαστών των εμβολιασμένων φυτών με το μάρτυρα (μη εμβολιασμένα φυτά). Εξαιρεση αποτελεί μόνο η επέμβαση που αφορά τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το A. brasilense Sp7 (ATCC 29145). Το ξηρό βάρος των βλαστών των φυτών αυτών

παρουσιάζει αύξηση 16% σε σύγκριση με το ξηρό βάρος του μάρτυρα.

Παρόμοιως, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707), P. radicum var. graminicola (ATCC 28231) και A. brasilense Sp7 + P. radicum var. graminicola συγκρινόμενα με το μάρτυρα, παρουσιάζουν αύξηση στο ξηρό βάρος των βλαστών 34%, 37% και 29% αντίστοιχα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι που φυτά είχαν εμβολιασθεί με τα στελέχη A. brasilense Sp7 και P. radicum var. graminicola δείχνουν σημαντικές διαφορές με αυτές του μάρτυρα. Δεν προκύπτει όμως κάτι αντίστοιχο από τη σύγκριση των ιδίων επεμβάσεων με τις επεμβάσεις όπου τα φυτά εμβολιάστηκαν με τους δύο μικροοργανισμούς χωριστά. Γι' αυτό η αύξηση αυτή μπορεί να οφειλεθεί μόνο στην επίδραση του μύκητα.

Το αντίθετο συμβαίνει στη περίπτωση που τα φυτά είχαν εμβολιασθεί με το A. lipoferum Sp59 και το μύκητα P. radicum var. graminicola. Οι διαφορές που παρουσιάζονται κατά τη σύγκριση του ξηρού βάρους των βλαστών των φυτών αυτής της επέμβασης, τόσο μ' εκείνα των μη εμβολιασμένων του μάρτυρα, όσο και με των επεμβάσεων που τα φυτά έχουν εμβολιασθεί με κάθε μικροοργανισμό χωριστά, είναι σημαντικές.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι υπό τις συνθήκες του πειράματος, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) και P. radicum var. graminicola (ATCC 28231) στη ριζόσφαιρα είναι σημαντικές χιιά την αύξηση των φυτών του σιταριού.

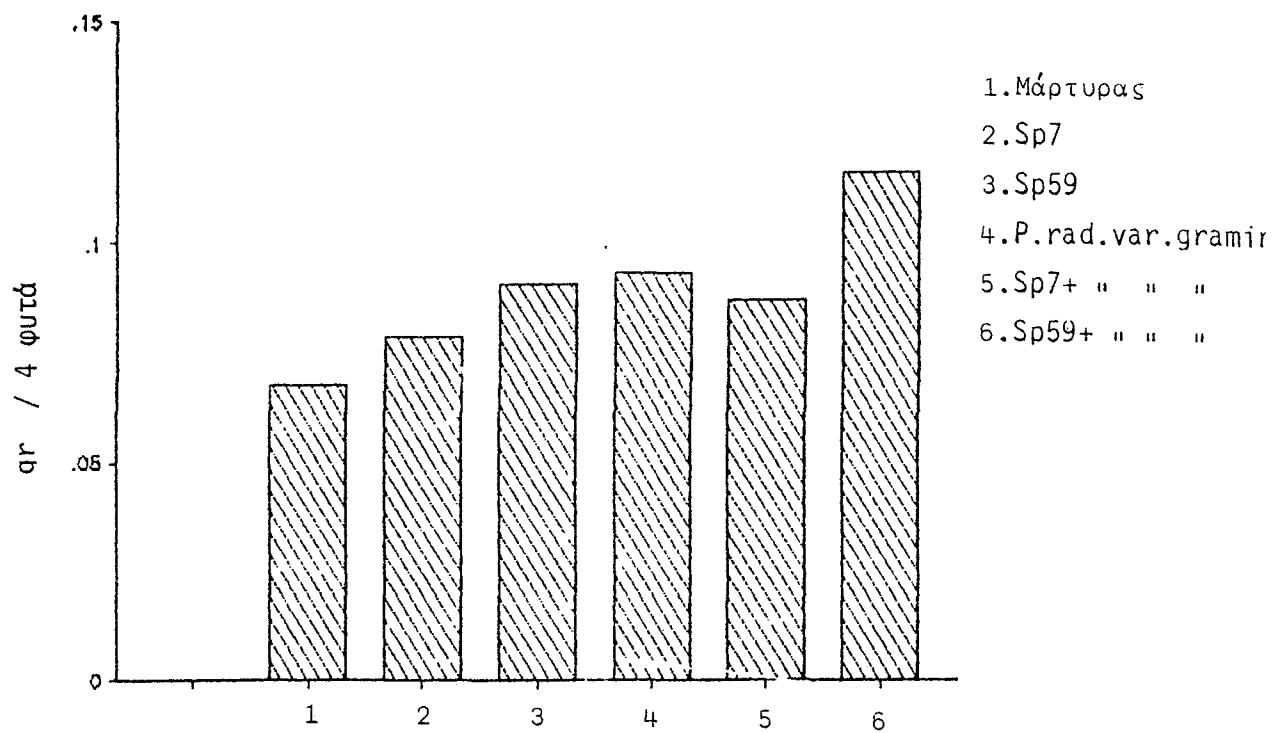
Πίνακας 17

Η επίδραση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ Azospirillum spp και P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231) στην αύξηση του σιταριού

Επεμβάσεις	Ξηρό βάρος (gr/4 φυτά)					
	βλαστού	αύξ.% Στατ.	ριζών	αύξ.% Στατ.		
Μάρτυρα (μη εμβολιασμένο)	0,068±0,009	100	a	0,124±0,007	100	d(*)
<i>A. brasilense</i> Sp7 (ATCC 29145)	0,078±0,008	116	a(#)	0,115±0,006	93	d
<i>A. lipoferum</i> Sp59 (ATCC 29707)	0,091±0,009	134	ab	0,116±0,009	93	d
<i>P. rad. var. graminic.</i> (ATCC 28231)	0,094±0,010	137	ab	0,133±0,010	107	d
<i>P. rad. var. graminic.</i> + Sp7	0,088±0,007	129	ab(#)	0,144±0,009	115	d
<i>P. rad. var. graminic.</i> + Sp59	0,116±0,009	171	abc	0,132±0,010	107	d

(\*) -Τα χράμματα δείχνουν τη σημαντική διαφορά στο επίπεδο σημαντικότητας 5%.

(#) -Δείχνει ότι μεταξύ αυτών των επεμβάσεων δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές.



Εικόνα 20. Επίδραση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ *P. radicicola* var. *graminicola* και *Azospirillum* spp. στην αύξηση του σιταριού (ξηρό βάρος βλαστών)

#### 4 . ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χρήσιμη αύξηση του πληθυσμού της Γής, το υψηλό κόστος και η έλλειψη ενέργειας, η ελάττωση της αρόσιμης γής και οι αλλαγές στο κλίμα, θέτουν για τις επόμενες δεκαετίες και σε παγκόσμια κλίμακα, προβλήματα σχετικά με την ποσότητα και την ποιότητα της τροφής. Έξ αιτίας της μείωσης της χονιμότητας της γής, της διάβρωσης του εδάφους και της ερημοποίησης θα δημιουργηθεί η ανάγκη απόδοσης στην καλλιέργεια λιγότερο εύφορων εκτάσεων. Οι αλλαγές στο κλίμα έχουν προκαλέσει τα τελευταία δέκα χρόνια μια αύξηση κατά 10% των άχονων περιοχών στον κόσμο. Σ' αυτό συμβάλλουν οι αλλαγές στην ατμόσφαιρα (επίπεδα όζοντος και διοξειδίου του άνθρακα ) η αποψίλωση και η μόλυνση του περιβάλλοντος (G. H. Elkar, 1984). Το κόστος του αζωτούχου λιπασμάτος θα συνεχίσει να αυξάνει με την τιμή της ενέργειας, με αποτέλεσμα οι αναπτυσσόμενες χώρες να χρειάζονται ένα χεωρικό σύστημα λιγότερο απαιτητικό σε ενέργεια.

Η βιολογική δέσμευση μοριακού αζώτου εφαρμόζεται μέχρι στιγμής στη χεωρική πρακτική μόνο στη περίπτωση των ψυχανθών, τα οποία εμβολιάζονται με βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Η συμβιωτική αυτή δέσμευση αζώτου είναι αποτελεσματική και μπορεί να αντικαταστήσει επιτυχώς την εφαρμογή των αζωτούχων λιπασμάτων. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η εφαρμογή τους περιορίζεται στις καλλιέργειες ψυχανθών, των οποίων οι καταλαμβάνόμενες εκτάσεις είναι μικρές σε σχέση με εκείνες που καταλαμβάνουν τα σιτηρά και η σημασία τους μειώνεται, τουλάχιστον



χιά τη διατροφή του ανθρώπου.

Οι ελεύθερα διαβιούντες μικροοργανισμοί, αντίθετα δεν θεωρούνται ότι συμβάλλουν σε αξιόλογο βαθμό στην οικονομία του αζώτου στο έδαφος γιατί απαιτούν πηγή άνθρακα και ενέργειας που στο έδαφος αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες. Στη περίπτωση της συνερχιστικής αζωτοδέσμευσης *Azospirillum* και ριζικού συστήματος σιτηρών, οι ριζικές εκκρίσεις ικανοποιούν τις θρεπτικές απαιτήσεις των βακτηρίων έτσι που να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων πιθανώς σε αριθμούς τέτοιους ώστε να συμβάλουν ουσιαστικά στον εφοδιασμό των φυτών με άζωτο.

Το 1976 ο Day και η Dobereiner επεσήμαναν τη σπουδαιότητα που είχε το *Spirillum lipoferum* σαν αζωτοδεσμευτικός μικροοργανισμός και την ευνοϊκή του επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού *Digitaria decumbens* cv. *transvala* (Day and Dobereiner, 1976). Οι πρόοδοι που έχουν γίνει σ' αυτό το διάστημα των δώδεκα ετών, όσον αφορά τις διαζωτοτροφικές σχέσεις βακτηρίων και ριζικού συστήματος φυτών, είναι σημαντικές. Η δυνατότητα μάλιστα που αρχότερα διαγράφηκε, χιά εκμετάλλευση του φαινομένου αυτού στη γεωργική πράξη (Hegazi et al, 1983; Hubell et al, 1981; Subba Rao, 1981) και η οικονομική σημασία που θα είχε ένα τέτοιο γεγονός, συνέβαλαν στην επιτάχυνση της έρευνας πάνω σ' αυτούς τους τομείς. Έξ αρχής φάνηκε ότι σημαντικό ρόλο στη συνερχιστική δέσμευση μοριακού αζώτου κατέχει το βακτήριο *S. lipoferum*. Η απομόνωση του από το ριζικό σύστημα μεγάλου αριθμού αυτοφυών και καλλιεργουμένων φυτών (Dobereiner et al, 1976; Vlassak and Reynders, 1981) ώθησε στη συστηματικότερη μελέτη του οργανισμού αυτού σχετικά με την αλληλεπίδραση του με τα

φυτά. Παράλληλα αναπτύχθηκαν μέθοδοι απομόνωσης σε εκλεκτικά υποστρώματα και επιτεύχθηκαν βελτιώσεις των μεθόδων μέτρησης της αζωποδεσμευτικής δραστηριότητας στη ριζόσφαιρα, που σχετίζεται με τη δράση του *S.lipoferum* κυρίως (Bashan and Levany, 1985; Rodrigues Caceras, 1982).

Πολλοί ερευνητές, από διάφορες χώρες του κόσμου, ασχολούνται με τα θέματα της συνεργιστικής αζωτοδέσμευσης στη ριζόσφαιρα των φυτών και περισσότερο των καλλιεργουμένων σιτηρών. Δεκάδες εργασίες δημοσιεύονται κάθε χρόνο από ερευνητές από τη Βραζιλία (Dobereiner, Baldani), Γαλλία (Balandreau, Bally), Η.Π.Α. (Tarrand, Krieg, Tien, Hubell), Ισραήλ (Okon, Kapulnik), Καναδά (Boyle, Patriquin), και άλλες χώρες, γεγονός που φανεώνει ότι υπάρχει μία έντονη αναζήτηση πάνω στα πολλά αναπάντητα ερωτήματα που υπάρχουν.

Ένας προβληματισμός, που τέθηκε, ήταν πάνω στην ικανότητα του βακτηρίου να εφοδιάζει το φυτό με ποσότητες αζώτου, τέτοιες ώστε να επιδρούν ευνοικά σ' αυτό, ο τρόπος με τον οποίο το άζωτο καθίσταται διαθέσιμο στο φυτό, και ο ρόλος των ρυθμιστών αύξησης (Tien et al, 1979; Vlassak and Reynnders, 1981) που αποδεχθηκε ότι παράχουν.

Το τελευταίο καιρό έχει δημιουργηθεί έντονο ενδιαφέρον σχετικά με τον ρόλο των υπολοίπων μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας στην εκδήλωση του φαινομένου του συνεργισμού, με έμφαση σε τυχόν ύπαρξη μυκορριζικών σχέσεων (Klucas and Dobereiner, 1981; Vose, 1983; Rakovski et al, 1985).

Πρόθεση της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η αζωτοδεσμευτική ικανότητα διαφόρων στελεχών του γένους *Azospirillum* spp. οι βιοχημικές ιδιότητές τους και η επίδραση

τους στην απόδοση του σιταριού, καθώς και οι πιθανές συνεργιστικές σχέσεις με το μη παθογόνο μύκητα *Phialophora radicolica* var. *graminicola*.

Σχεδιάζοντας τα πειράματα μελετήθηκε πρώτα η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα ριζικού συστήματος αχροστωδών, η απομόνωση βακτηρίων του γένους *Azospirillum* spp. και η ταυτοποίησή τους.

Τα αποτελέσματα που λάβαμε τα θεωρούμε ενδιαφέροντα, όσον αφορά το ποσοστό των δειχμάτων από τα οποία απομονώθηκαν στελέχη *Azospirillum* και αρκετά ενθαρρυντικά σχετικά με τον ρόλο των βακτηρίων αυτών στη δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου σε περιοχές εύκρατες ξηροθερμικές όπως αυτές της Ελλάδας. Πρέπει να σημειώσουμε ότι η βιολογική δέσμευση που λαμβάνει χώρα σε συνεργισμό με τις ρίζες των σιτηρών, έχει εκτιμηθεί ότι είναι εντονώτερη στις τροπικές περιοχές, παρά σε εύκρατες και ψυχρές (Dobereiner et al, 1976; van Berkum and Bohlool, 1980). Η θέση όμως αυτή έχει αρχίσει να αναθεωρείται (Vlassak and Reynders, 1981; Warenbourg et al, 1987).

Σχετικά με τη μέθοδο ανίχνευσης της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας καταλήξαμε στη χρησιμοποίηση της μεθόδου που η Dobereiner και ο Day εφάρμοσαν από το 1972 και που έχει χαρακτηριστεί σαν ικανοποιητική και εύκολα εφαρμοζόμενη, παρά τα μειονεκτήματά της (Day et al, 1975; van Berkum and Bohlool, 1980).

Όσον αφορά τα θρεπτικά υλικά απομονώσης, επιλέξαμε το RC από το υλικό OAB (Okon et al, 1977). Η επιλογή μας στηρίχθηκε κυρίως στα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει το υλικό RC στη διάκριση των αποικιών *Azospirillum* spp. Ένα άλλο βελτιωμένο υλικό απομονώσης *Azospirillum* προτείνεται από τους Bashan και Levanyov (1985), αλλά

που δεν χρησιμοποιήθηκε σ' αυτήν την εργασία.

Προβλήματα αντιμετωπίσαμε στην εφαρμογή των δοκιμών αύξησης στα υποστρώματα απαλλαγμένα από βιοτίνη και με γλυκόζη. Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα όπως διαπιστώσαμε ότι και άλλη ερευνητές συνάντησαν προβλήματα τουλάχιστον στην εφαρμογή των δοκιμών ανάπτυξης σε βιοτίνη (Balandreau, 1983; Bally et al, 1983). Για τα στελέχη *A. lipoferum*, σύμφωνα με τους Tarrand et al (1978), θα έπρεπε να μην παρουσιασθεί καθόλου ανάπτυξη στα υλικά που δεν περιείχαν βιοτίνη (στη δοκιμή για ανάγκη σε βιοτίνη). Το ίδιο έπρεπε να συμβεί για το *A. brasilense* στο υλικό με πηγή άνθρακα γλυκόζη. Στη πρώτη περίπτωση παρουσιάστηκε ανάπτυξη των στελεχών *A. lipoferum* Sp59 (ATCC 29707) και *A* στα υλικά που δεν περιείχαν βιοτίνη, φτωχότερη όμως σε σχέση με εκείνα που περιείχαν βιοτίνη. Από τη κινητική αυξήσεως σ' αυτά τα υλικά η χωρητικότητα (*A*) του *A. lipoferum* Sp59 (ATCC 29707) στη πρώτη περίπτωση (χωρίς βιοτίνη) είναι  $A=0,34$  και στη δεύτερη (με βιοτίνη) είναι  $A=0,66$ . Για τα υπόλοιπα στελέχη η ανάπτυξη ήταν ίδια και στα δύο υλικά. Στη δεύτερη περίπτωση, τα στελέχη που χαρακτηρίσαμε *A. lipoferum* είχαν πολύ μεγαλύτερη ανάπτυξη στο υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, απ' ό,τι τα άλλα στελέχη που παρουσίασαν πτωχή ανάπτυξη. Έτσι τα αποτελέσματα μας στηρίχθηκαν στη σύγκριση μεταξύ πτωχής και πλούσιας ανάπτυξης, τη διασταύρωση και συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο δοκιμών και κυρίως στη σύγκριση της συμπεριφοράς των στελεχών που απομονώσαμε, στις δοκιμές αυτές, με τη συμπεριφορά των πρότυπων στελεχών της ATCC και όχι στη παρουσία ή απουσία ανάπτυξης όπως θα ήταν το ιδανικό.

Ακόμα, στις δοκιμές της αυξανογραφικής μεθόδου για έλεγχο χρησιμοποίησης πηγών άνθρακα και αερόβια παραγωγή οξέος από

τα αποτελέσματα ήταν σαφή όσον αφορά τη χρησιμοποίηση γλυκόζης από τα *A. lipoferum* και *A. brasilense*.

Στα στελέχη που απομονώσαμε, παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά τη μορφολογία βακτηρίων σε καλλιέργειες 48 ωρών σε θρεπτικό υλικό Nfb. Στα στελέχη *A. lipoferum* παρατηρούνται επιμήκη και σπειροειδή κύτταρα σε σύγκριση με τα στελέχη που ανήκουν στο *A. brasilense* που είναι κοντύτερα και πλατύτερα. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι το στέλεχος H2/N2 είναι παρόμοιο με το *A. lipoferum*, χρησιμοποιεί επίσης γλυκόζη, α-κετοχλουταρικό οξύ και μαννιτόλη σαν μόνη πηγή άνθρακα, ενώ δεν απαιτεί βιοτίνη για την ανάπτυξή του όπως το *A. brasilense*.

Τα τελευταία χρόνια ασκείται κριτική από ερευνητές, που ασχολούνται με το υφιστάμενο σύστημα ταξινόμησης των Tarrand et al (1978). Πράγματι, η απομόνωση στελεχών *Azospirillum* μη κινητών (Balandreau, 1983; Vose, 1983), ιδιότητα που δεν συμφωνεί με το υπάρχον σύστημα, καθώς και η δυσκολία προσδιορισμού χαρακτήρων ταξινόμησης, όπως οι ανάγκες σε βιοτίνη (Balandreau, 1983; Bally et al, 1983; Vose, 1983), δείχνουν ότι το σύστημα αυτό χρειάζεται αναθεώρηση. Ο χαρακτήρας της ανάπτυξης είναι δύσκολο να προσδιορισθεί σαφώς εξ αιτίας της δυσκολίας να απαλλαχούμε εντελώς από τα ίχνη βιοτίνης στα σκεύη, το εμβόλιο και τα θρεπτικά υλικά. Ακόμα έχει δημοσιευθεί η ύπαρξη δύο νέων ειδών, του *A. amazonense* και *A. halopraeferans* (Reinhold et al, 1987). Σχετικά με το σύστημα ταυτοποίησης, τελευταία έχει διαπιστωθεί (Hartman et al, 1988) ότι η χρησιμοποίηση των αμινοξέων στην ανάπτυξη και η επίδραση τους στην αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διάφορα στελέχη καθέ είδους

*Azospirillum*; Όπως ανακοίνωσαν πρόσφατα οι Hartman et al (1988) το *A. brasilense* αναπτυσσεται φτωχά ή καθόλου σε υλικά με γλουταρικό, ασπαραγινικό, σερίνη ή ιστιδίνη σαν μοναδικών πηγών αζώτου και άνθρακα. Αντίθετα το *A. lipoferum* και το *A. amazonense*, υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες αναπτυσσόταν πολύ καλά κάνοντας άριστη χρήση των ίδιων ουσιών σαν πηγών αζώτου και άνθρακα. Σ' αυτή την εργασία οι Hartman et al, (1988) προτείνουν την ιστιδίνη σαν μόνη πηγή αζώτου-άνθρακα για να χρησιμοποιηθεί για ταξινομικούς σκοπούς των *Azospirillum* spp και για επιλεκτικό διαχωρισμό του *A. lipoferum*.

Πριν δημοσιευθεί η εργασία των Hartman et al, (1988), προσπαθώντας να μελετήσουμε την επίδραση της σύστασης του θρεπτικού υλικού που καλλιεργείται ο μύκητας *P. radicum* var. *graminicola* (ATCC 28231) στη κινητική αύξησης των *Azospirillum* spp., όπως θα δούμε παρακάτω, βρήκαμε ότι υπάρχουν διαφορές στην χρησιμοποίηση των ασπαραγινικού οξέος και ασπαραγίνης από τα δύο είδη των *Azospirillum* spp. Έτσι το *A. lipoferum* Sp59 (ATCC 29707) αναπτυσσόταν πολύ καλά με πηγή άνθρακα ασπαραγίνη ή ασπαραγινικό οξύ, ενώ το *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145) αναπτυσσόταν πολύ φτωχά ή καθόλου. Δοκιμάσαμε δύο συγκεντρώσεις (2gr/l όπως χρησιμοποιείται στο θρεπτικό υλικό του μύκητα *P. radicum* var. *graminicola* (ATCC 28231) και 6,36gr/l ασπαραγίνη και 5,63gr/l ασπαραγινικό οξύ ) και είδαμε ότι το *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145) δεν αναπτυσσόταν σε καμία περίπτωση, ενώ το *A. lipoferum* Sp59 (ATCC 29707) αναπτυσσόταν καλύτερα στη μεγαλύτερη συκέντρωση του ασπαραγινικού οξέος ή της ασπαραγίνης. Από την βιοχημεία ξέρουμε ότι το ασπαραγινικό οξύ και η

1. The first part of the document is a list of names and titles, including "The Hon. Mr. Justice G. D. C. O'Connell, Chief Justice of the High Court of Justice, Ireland, and President of the Royal College of Physicians, London." This list continues with several other names and titles, including "The Hon. Mr. Justice G. D. C. O'Connell, Chief Justice of the High Court of Justice, Ireland, and President of the Royal College of Physicians, London." The list ends with "The Hon. Mr. Justice G. D. C. O'Connell, Chief Justice of the High Court of Justice, Ireland, and President of the Royal College of Physicians, London."

ασπαραχίνη προέρχονται από το μεταβολισμό του οξαλοξικού οξέος, το οποίο όπως έχουν διαπιστώσει οι Tarrand et al (1978), χρησιμοποιείται σαν πηγή άνθρακα από τα δύο είδη των *Azospirillum* spp.. Όπως έδειξε το πείραμα αυτό το *A. lipoferum* αυξάνει καλά με ασπαραχίνη ή ασπαραχινικό οξύ σαν μόνες πηγές άνθρακα, ενώ το *A. brasilense* δεν αυξάνει. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως η αύξηση πάνω σε ασπαραχίνη ή ασπαραχινικό οξύ σαν μόνη πηγή αζώτου-άνθρακα και ενέργειας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταξινομήση των δύο ειδών των *Azospirillum* spp.

Σχετικά με τις δοκιμές για απαιτήσεις σε βιοτίνη παρατηρήσαμε ότι η απουσία της βιοτίνης στο θρεπτικό υλικό με ασπαραχίνη ή ασπαραχινικό οξύ σαν μόνες πηγές άνθρακα δεν επηρεάζει την αύξηση του *A. lipoferum* Sp59 (ATCC 29145). Η αύξηση αυτή ήταν σχεδόν η ίδια, ανεξάρτητα αν περιέχει ή όχι βιοτίνη το θρεπτικό υλικό με ασπαραχίνη ή ασπαραχινικό οξύ σαν μόνη πηγή άνθρακα. Έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας *P. radicleola* var. *graminicola* (ATCC 28231) παράγει βιοτίνη σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν ασπαραχίνη (Balis, 1969). Φαίνεται ότι αυτό ισχύει και για το *A. lipoferum* Sp59 (ATCC 29707)

Σχετικά με την επίδραση των βιταμινών στην αύξηση των *Azospirillum* spp. η παρουσία της θειαμίνης φαίνεται να ευνοεί την αύξηση του *A. lipoferum* (ATCC 29707), όχι όμως του *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145)



και από ποσοτική άποψη. Η διαφορετική χρησιμοποίηση των αμινοξέων από τα *Azospirillum spp.* μπορεί να αποδειχθεί σημαντική για την εγκατάσταση τους πάνω στη ριζόσφαιρα όπως επίσης και για την συνεργιστική δέσμευση του αζώτου με τα αντίστοιχα φυτά.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ *Azospirillum* και αχροστωδίων, βασίζονται στις φυσιολογικές ιδιότητες των δύο συμβαλλόντων, μερών. Η καλύτερη μελέτη όμως, της φυσιολογίας των *Azospirillum spp.* σε ελεγχόμενες συνθήκες (εργαστηριακές συνθήκες) βοηθάει στην καλύτερη κατανόηση των συνεργιστικών σχέσεων *Azospirillum* - σιτηρά. Σχεδιάσαμε λοιπόν να διερευνήσουμε την επίδραση της πηγής άνθρακα, του αζώτου και της θερμοκρασίας στην κινητική αύξησης και αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα μερικών στελεχών του *A. brasilense*.

Στην διερεύνηση της επίδρασης της πηγής άνθρακα πάνω στη κινητική αύξησης και αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας διαπιστώθηκε ότι, οι διαφορές που υπάρχουν στην κινητική αύξησης των στελεχών που εξετάστηκαν δεν είναι σημαντικές. Κάπως ταχύτερη φαίνεται η αύξηση με το ηλεκτρικό οξύ σαν πηγή άνθρακα όμως όπως είπαμε η διαφορά αυτή δεν είναι σημαντική.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα σε σχέση με την επίδραση της διαφορετικής συκέντρωσης της πηγής άνθρακα στην αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα των στελεχών που εξετάστηκαν. Με τη μείωση της συκέντρωσης του άνθρακα από 5gr/l στο 1gr/l η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα μειώνεται και πιά πολύ αυτό παρατηρείται με το στέλεχος T5. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το στέλεχος H2 στον οποίο η μείωση αυτή είναι πιά μικρή.

Η επίδραση της πηγής άνθρακα του θρεπτικού υλικού στην

αύξηση των *Azospirillum* spp. έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Οι Child και Kurz (1978) βρήκαν ότι ενώσεις που χρησιμεύουν σαν μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας σε υποστρώματα ελεύθερα αζώτου είναι το μηλικό, ηλεκτρικό, πυροσταφυλικό, γαλακτικό και η φρουκτόζη. Αναφέρεται ακόμα πως ένας συνδυασμός τρι-καρβοξυλικών οξέων με πεντόζη αυξάνει την δραστηριότητα της νιτροχενάσης (Child and Kurz, 1978). Οι Tarrand et al (1978) με την βοήθεια της αυξογραφικής μεθόδου και χρήση θρεπτικών υλικών που περιείχαν θειικό αμμώνιο ως πηγή αζώτου βρήκαν χιιά κάθε περίπτωση τις παρακάτω ενώσεις να χρησιμεύουν σαν η μόνη πηγή άνθρακα χιιά όλα τα στελέχη των *Azospirillum* spp. : μηλικό, ηλεκτρικό, γαλακτικό, πυροσταφυλικό, φουμαρικό, γλουκονικό, β-υδροξυβουτυρικό, (οξέα ή άλλαγα γενικά), γλυκερόλη και φρουκτόζη. Έχει διαπιστωθεί ότι οι ρίζες εκκρίνουν ένζυμα που υδρολύουν υδατάνθρακες στη ριζόσφαιρα. Οι Gatzle and Martin (1981) έχουν δείξει την παρουσία ενζύμων χύρω από τις ρίζες, ικανών να υδρολύουν πολυσακχαρίτες και δισακχαρίτες σε μονοσακχαρίτες. Η ιμπερτάση, η κελλοβιάση και η αμυλάση είναι ένζυμα που έχουν ανιχνευθεί στη ριζόσφαιρα αραβοσίτου. Υπάρχουν βέβαια διαφορές όσον αφορά την ικανότητα υδρόλυσης σακχάρων από τα διάφορα είδη αχροστωδών.

Εκτός από τα σάκχαρα οι ρίζες εκκρίνουν πολλά οργανικά οξέα τα οποία βοηθούν στη χρήσορη ανάπτυξη και αζωτοδέσμευση χιιά όλα τα *Azospirillum* spp. Γίνεται λοιπόν κατανόητή η ευνοική επίδραση που τα εκκρινόμενα από τις ρίζες ένζυμα και θρεπτικά στοιχεία, ασκούν στην ανάπτυξη των *Azospirillum* spp. (Martinez-Drets et al, 1984).

Σχετικά με την επίδραση της παρουσίας ή απουσίας αζώτου στο θρεπτικό υλικό στην κινητική αύξηση τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν το θρεπτικό υλικό περιέχει άζωτο, τα *Azospirillum* αναπτύσσονται πολύ καλά και η χωρητικότητα (A) είναι 3-4 φορές πιά μεγάλη απ'ότι είναι στο θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει πηγή αζώτου. Είναι γνωστό ότι στη παρουσία του αζώτου η δραστηριότητα της νιτρογενάσης μειώνεται σημαντικά. Γι'αυτό είναι σημαντικό η επίδραση και η αύξηση των στελεχών αυτών που εξετάστηκαν στις συνθήκες της απουσίας αζώτου από το θρεπτικό υπόστρωμα. Την μεγαλύτερη χωρητικότητα  $A=0,68$  της έχει το στέλεχο H2, δηλαδή ο πληθυσμός του φθάνει σε μεγαλύτερα επίπεδα συγκριτικά με τα άλλα στελέχη. Όπως περιγράψαμε παραπάνω αυτό το στέλεχο (H2) έχει και την μεγαλύτερη αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα ( $59 \mu\text{mol/h}/10^8 \text{κύττ.}$ ) σε χαμηλές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα. Οι δύο αυτές ιδιότητες έχουν μεγάλη σημασία στη γεωργική πράξη διότι η αποτελεσματικότητα ενός στελέχου εξαρτάται πολύ από τον αριθμό του πληθυσμού και την αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα του σε χαμηλές συγκεντρώσεις πηγής ενέργειας.

Τα *Azospirillum* spp. όπως όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί προτιμούν την αμμωνία σαν πηγή αζώτου και παρουσιάζουν ταχεία αύξηση σε θρεπτικό υλικό με πηγή αζώτου την αμμωνία χωρίς να δεσμεύουν άζωτο. Έχει διαπιστωθεί όμως, από τους van Berkum και Bohloul (1980) ότι είναι δυνατόν σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας, η αμμωνία να δράσει ευνοικά στα αρχικά τουλάχιστον στάδια ανάπτυξης διότι με την παρουσία της διευκολύνεται η ταχεία αύξηση του πληθυσμού γεγονός που συνεπάγεται την εξάντληση του μέσου σε αμμωνία και ο αυξημένος πιά πληθυσμός εισέρχεται σε φάση

δέσμευσης μοριακού αζώτου (van Berkum and Bohlool, 1980).

Ανάλογη επίδραση ασκούν και τα νιτρικά αν και τελευταία έχουν απομονωθεί μεταλλαχμένα στελέχη *Azospirillum* με αρνητικούς χόνους αναχωάσης των νιτρικών. Η δραστηριότητα της νιτροχενάσης διατηρείται σ' αυτές τις μεταλλάξεις (mutants) και συνεχίζεται ακόμη και με την παρουσία νιτρικών της τάξης των 10mM (Ferreira et al, 1987). Μία τέτοια ιδιότητα κρίνεται πολύ χρήσιμη διότι πιθανός εμβολιασμός σιτηρών με τα στελέχη αυτά ..., μπορεί να οδηγήσει σε συστήματα που δεσμεύουν άζωτο παρουσία υψηλών τιμών νιτρικών του εδάφους.

Στην διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας, διαπιστώθηκε ο αποφασιστικός ρόλος αυτού του παράγοντα στη κινητική αύξησης και αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητα των *Azospirillum* spp.

Όπως είδαμε στα αποτελέσματα, εάν τα στελέχη Sp7 (ATCC 29145) και H2 δίνουν την ίδια εικόνα της ανάπτυξης με μία μικρή διαφορά μεταξύ 27 C και 35 C, η ανάπτυξη του T5 δεν παρουσιάζει σχεδόν καμία διαφορά μεταξύ 27 C και 35 C, ενώ το στέλεχο B αναπτύσσεται το ίδιο σχεδόν στους 21 C και 27 C και αυξάνει πολύ στους 35 C. Το ίδιο παρατηρούμε και με την αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα που, η μείωση της θερμοκρασίας επώασης από 35 C στους 27 C μειώνει την αζωτοδέσμευση στα στελέχη Sp7 (ATCC 29145) Sp59 (ATCC 29707), H2 και T5, πιο πολύ όμως στο στέλεχο B. Την μεγαλύτερη αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα έχει το στέλεχο H2 που και στους 21 C διαφέρει από τα στελέχη B και T5 κατά 26% και 70% αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Οι Day και Doberneiner (1976) μελετώντας την άριστη θερμοκρασία, με μοριακό άζωτο σαν μόνη πηγή αζώτου για το

*S. lipoferum* (πρίν ταυτοποιηθεί από τους Tarrand et al, 1978) παρατήρησαν ότι είναι οι 32-40 C, και ότι η δράση της νιτροχενάσης μειώνεται ή και αναστέλλεται σε θερμοκρασίες κάτω των 18 C. Παρατήρησαν επίσης ότι στους 24 C η αζωτοδέσμευση είναι ελάχιστη. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν σε στέλεχος που είχε απομονωθεί από τροπικές περιοχές.

Οι Kapulnik et al (1981) παρατηρούν ότι στις θερμοκρασίες 32/27 C (ημέρα/νύχτα) και 27/22 C η παραχωχή αιθυλενίου παραμένει στον ίδιο επίπεδο, ενώ οι χαμηλές θερμοκρασίες 22/17 C και 17/12 C μειώνουν την αζωτοδέσμευση. Οι μειώσεις αυτές αποδίδονται στις δισημενείς επιπτώσεις των χαμηλών θερμοκρασιών πάνω στα φυτά τα οποία φιλοξενούν στις ρίζες τους τα *Azospirillum* (van Berkum and Bohlool, 1980).

Η ύπαρξη συνεργιστικής σχέσης σιτηρών-*Azospirillum* φαίνεται να είναι ένα πολύ συχνό φαινόμενο σε τροπικές χώρες. Όμως απαντάται και στα εύκρατα κλίματα και η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια (van Berkum and Bohlool, 1980; Vlassak and Reynders, 1981; Kapulnik et al, 1983; Warenbourg et al, 1987).

Η ανάγκη για μεριστοποίηση της βιολογικής δέσμευσης αζώτου προς όφελος της γεωργίας έστρεψε τις ερευνητικές προσπάθειες στην ανακάλυψη στελεχών *Azospirillum* με υψηλή αζωτοδεσμευτική ικανότητα. Σε πολλά εδάφη τα *Azospirillum* μπορεί να υπάρχουν σε πολύ μικρούς πληθυσμούς. Μπορεί ακόμα τα φυσικά στελέχη του εδάφους να είναι μη αποτελεσματικά ή να έχουν μικρή αζωτοδεσμευτική ικανότητα.

Οι Vlassak και Reynders (1981) έχουν συμπεράνει ότι ο εμβολιασμός στο χωράφι με *Azospirillum* spp. είναι ένας σημαντικός παράγοντας αύξησης της παραγωγής και απόδοσης ακόμα και σε καλλιεργητικά συστήματα όπου το εδαφικό συμπληρωματικό άζωτο δεν αποτελεί το κύριο πρόβλημα.

Σε μερικές περιπτώσεις τα αποτελέσματα του βακτηριακού εμβολιασμού ήταν σχεδόν ασήμαντα ή ακόμα κατέληξαν σε μιά μικρή ελάτωση της φυτικής παραγωγής και του συνολικού αζώτου (Bouton et al, 1979; Ruschel et al, 1982). Σε μερικά πειράματα όμως παρουσιάστηκε δυνατότητα αζωτοδέσμευσης όταν χινόταν εμβολιασμός με *Azospirillum* spp. Ο Nur et al, (1980) σε πειράματα τους πέτυχαν τόσο αύξηση του βάρους και του συνολικού περιεχομένου αζώτου στα φυτά *Setaria italica* και αμβόσιτο (*Zea mays*) όταν τα εμβολίασαν με τα *Azospirillum* σε συνθήκες θερμοκηπίου. Στην Αίγυπτο, μετά από εμβολιασμό με *A. brasilense* του σιταριού στο χωράφι οι Hegazi et al (1983) βρήκαν πως αύξανε το αδέλωμα και το ύψος των φυτών, κατά συνέπεια και η συσκομιδή καθαρού σπόρου και σάνου. Επίσης στη νότια Γαλλία υπό Μεσογειακό κλίμα, φυτά σιταριού (*Triticum aestivum*) στις γλάστρες ή στο χωράφι που εμβολιάστηκαν με *A. brasilense* έδειξαν αύξηση του αριθμού των ώριμων αδελφών και αύξηση του λόγου της βιομάζας: Ξηρό βάρος βλαστών/ Ξηρό βάρος ριζών.

Όπως έχουμε πει πιο πάνω (στην εισαγωγή), έχουν αναφερθεί τρεις κύριοι μηχανισμοί για την ερμηνεία του συνεργισμού:

1-Διάρθρωση του δεσμευμένου αζώτου από το βακτήριο στο φυτό (Rennie, 1980)

2-Παραγωγή αυξητικών ορμονών από τα βακτήρια (Tien et al, 1979)

3-Αύξηση της απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων από τα φυτά

οφειλόμενη επίσης στα βακτήρια (Lin et al, 1983).

Γιά να ελέγξουμε την ανταγωνιστικότητα των στελεχών Sp7 (ATCC 29145), B, H2 και T5 στο έδαφος και χιά να επαληθεύσουμε τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανάπτυξης εμβολιασμένων φυτών σε γλάστρες.

Οι τιμές του νωπού βάρους των φυτών που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Azospirillum ήταν υψηλότερες από τις τιμές του νωπού βάρους των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχο H2 είχαν μεγαλύτερο νωπό βάρος από τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Sp7 (ATCC 29145), B και T5, και μόνο το νωπό βάρος των φυτών που εμβολιάστηκαν με το στέλεχο H2 ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από το νωπό βάρος των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες.

Η προσθήκη αζώτου αύξησε το νωπό βάρος των φυτών που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Sp7 (ATCC 29145) και B, ενώ επηρεάζει φαίνεται, την αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα του στελέχου T5 γιατί το νωπό βάρος των φυτών που εμβολιάστηκαν με αυτό το στέλεχο (T5) είναι χαμηλότερο απ'ότι ήταν χωρίς προσθήκη αζώτου. Σημαντική διαφορά εδώ έδειξαν τα στελέχη Sp7 (ATCC 29145), B και H2.

Από τη σύγκριση των τιμών του ξηρού βάρους των εμβολιασμένων φυτών προέκυψαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το ξηρό βάρος των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες (χωρίς προσθήκη αζώτου) στα στελέχη H2 και Sp7 (ATCC 29145). Ενώ με τη προσθήκη αζώτου σε σύγκριση με το ξηρό βάρος των μη εμβολιασμένων φυτών, σημαντική διαφορά έδειξαν τα στελέχη Sp7 (ATCC 29145) και B. Το ξηρό βάρος των εμβολιασμένων φυτών με τα δύο άλλα στελέχη (H2 και T5) ήταν λίγο αλλά όχι σημαντικά μεγαλύτερο από το ξηρό

βάρος των φυτών που δέχτηκαν τη προσθήκη αζώτου. Ακόμα περισσότερο η σύγκριση των τιμών του βάρους των φυτών που εμβολιάστηκαν με αυτά τα στελέχη (H2 και T5) και δέχτηκαν τη προσθήκη αζώτου με τα ίδια χωρίς προσθήκη αζώτου, με τη μείωση του βάρους δείχνουν ότι σ'αυτά τα στελέχη η προσθήκη αζώτου επηρεάζει την αζωτοδεσμευτική ικανότητά τους.

Από τη σύγκριση των τιμών του νωπού και ξηρού βάρους ριζών των εμβολιασμένων φυτών προέκυψαν σημαντικές διαφορές. Φαίνεται ότι αυτό οφείλεται στη παραγωγή αυξητικών ουσιών. Όπως είδαμε από το πείραμα της παραχυσικής αυξητικών ουσιών, όλα τα υπό δοκιμή στελέχη Sp7 (ATCC 29145), Sp59 (ATCC 29707), B, H2 και T5 παράχουν αυξητικές ουσίες. Η επίδραση τους στο φυτό εξαρτάται από τη ποσότητα και πάντα έχει σχέση με τον αριθμό κυττάρων. Ευνοϊκή επίδραση στις ρίζες υπήρξε όταν εμβολιάστηκαν με πληθυσμό της τάξης  $5 \cdot 10^5$  κύττ/μl για τα στελέχη Sp7 (ATCC 29145), Sp59 (ATCC 29707), H2 και T5. Για το στέλεχος B είναι  $10^5$  κύττ/μl. Φαίνεται ότι αυτό το στέλεχος παράγει μεγαλύτερες ποσότητες αυξητικών ουσιών. Όταν ο πληθυσμός ξεπερνάει τα  $10^6$  κύττ/μl αρχίζει και φαίνεται μια τοξική δράση πάνω στο ριζικό σύστημα. Οι μικρότερες τιμές ανήκουν στο στέλεχος T5.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Έχει διαπιστωθεί ότι σε καθαρή καλλιέργεια Azospirillum η προσθήκη τρυπτοφάνης στο θρεπτικό υλικό σε συκέντρωση 100 μg/ml ευνοεί την παραχυσική του ινδολοξικού οξέος (IAA) (Hubell et al, 1981; Tien et al, 1979; van Berkum and Bohlool, 1980). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις, από πειράματα με νεαρά φυτά ότι τέτοιες ουσίες παράγονται από τα βακτήρια αυτά σε συνεργισμό με αχροστώδη. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι εκτός από IAA και



υνδολογαλακτικό οξύ, παράγονται μικρές αλλά βιολογικά σημαντικές ποσότητες γιβερελλινών, καθώς επίσης και τρεις κυτοκινίνες.

Η επίδραση των ρυθμιστών αυτών αύξησης στη μορφολογία της ρίζας είναι σημαντική. Ο αριθμός των πλευρικών ριζών και των ριζικών τριχιδίων αυξάνει σημαντικά, όπως επίσης και ο λόγος των ριζών προς το υπέρχειο τμήμα του φυτού (Hubell et al, 1981; Tien et al, 1979). Εικάζεται ότι οι επιδράσεις αυτές δρούν ευερχετικά στην αποτελεσματικότητα με την οποία τα φυτά εκμετάλλευνονται τα θρεπτικά συστατικά με συνέπεια μιά αύξηση στις αποδόσεις μετά από εμβολιασμό με Azospirillum. Οι μηχανισμοί διά των οποίων εκδηλώνεται η ευερχετική δράση μέσω του συνερχισμού δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Μερικοί ερευνητές διατείνονται ότι πράγματι υπάρχει θετική αντίδραση εμβολιασθέντων φυτών που εξέτασαν (Karulnik et al, 1985; Subba Rao, 1981; van Berkum and Bohlool, 1980). Όμως, όπως αναφέραμε προηγουμένος, οι θετικές αυτές επιδράσεις είναι πιθανόν να οφείλονται στην επίδραση των ρυθμιστών αύξησης, παραχομένων απο τα Azospirillum ή σαν αντίδραση των ίδιων των φυτών στο βακτηριακό αποκικισμό (Karulnik et al, 1985).

Όπως είπαμε προηγουμένως, ένα από τα ερωτήματα που έχουν προκύψει τα τελευταία χρόνια είναι ο ρόλος των υπολοίπων μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας των σιτηρών στην εκδήλωση του φαινομένου του συνερχισμού με έμφαση σε τυχόν ύπαρξη μυκορριζικών σχέσεων (Klucas and Dobereiner, 1981; Vose, 1983). Έχουν γίνει πειράματα σε γλάστρες στο θερμοκύβιο ή σε χωράφι για να μελετηθούν οι αλληλοεπιδράσεις μεταξύ Azospirillum και μυκορριζών (Barea et al, 1983; Subba Rao et al, 1985; Pacovski et al, 1985). Από τις μυκορριζες το κυριότερο χένος που έχει αναφερθεί είναι το χένος Glomus (moscae, fasciculatum, ). Δεν υπάρχει καμία πληροφορία

σε σχέση με το μη παθογόνο μύκητα Phialophora radiculicola var. graminicola, ο οποίος αν και δεν είναι μυκορριζικός κατά κανόνα φιλοξενείται στο ριζικό σύστημα των σιτηρών (Balis, 1969; Scott, 1970).

Επειδή οι σχέσεις αυτές έχουν μεγάλη σημασία στο φαινόμενο του συνερχισμού στη ριζόσφαιρα των σιτηρών, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των δύο μικροοργανισμών αυτών και η επίδραση τους στην απόδοση του σιταριού.

Σχεδιάζοντας τα πειράματα μελετήθηκε πρώτα σε καθαρή καλλιέργεια αν οι σχέσεις μεταξύ P. radiculicola var. graminicola και Azospirillum spp. είναι ή όχι ανταγωνιστικές.

Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ των δύο αυτών μικροοργανισμών δεν υπάρχουν, ακόμα περισσότερο που στην μικροσκοπική παρατήρηση φαινόταν τα κύτταρα των Azospirillum spp. (για όλα τα υπό δοκιμή στελέχη) κολλημένα στις υφές του μύκητα P. radiculicola var. graminicola (ATCC 28231).

Οι σχέσεις μεταξύ των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα των φυτών είναι ένα θέμα με το οποίο έχουν απασχοληθεί πολλούς ερευνητές. Έχει αναφερθεί ότι, οι σχέσεις αυτές μπορεί να είναι ανταγωνιστικές (Bowen et al, 1979; Sivasithamparam et al, 1979) ή συνερχιστικές (Tilak et al, 1982; Chamber et al, 1980).

Στην περίπτωση μας, όπως είδαμε, ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ Azospirillum spp. και P. radiculicola var. graminicola δεν υπήρξαν.

Αφού διαπιστώθηκε αυτό σχεδιάσαμε να ερευνήσουμε την επίδραση του υπερκείμενου υγρού του μύκητα P. radiculicola var. graminicola (ATCC 28231) στη κινητική αύξησης των Azospirillum spp.

Όπως είδαμε στα αποτελέσματα το υπερκείμενο υγρό του μύκητα

επιδρά ευνοικά στην κινητική αύξηση των δύο ειδών, A. brasiliense Sp7 (ATCC 29145) και A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) και μπορεί να συγκριθεί μόνο με τη περίπτωση που το θρεπτικό υλικό περιέχει εκχύλισμα ζύμης.

Κατά τον Balis (1969) ο μύκητας P. radiciicola var. graminicola (ATCC 28231) σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν ασπαραχίνη, παράγει βιοτίνη. Γι' αυτό το A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) αναπτύσσεται με την ίδια ταχύτητα αύξησης ( $\mu$ ) και χωρητικότητας (A) και όταν δεν έχει προστεθεί βιοτίνη στο θρεπτικό υλικό με υπερκείμενο υγρό του μύκητα P. radiciicola var. graminicola (ATCC 28231). Ενώ στο κανονικό θρεπτικό υλικό με ηλεκτρικό οξύ σαν πηγή άνθρακα (Azo. Medium) όταν περιέχει βιοτίνη (0,0001gr/l) το A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) εμφανίζει διπλάσια χωρητικότητα (A) σε σύγκριση με το ίδιο θρεπτικό υλικό χωρίς βιοτίνη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η καλή ανάπτυξη του A. brasiliense Sp7 (ATCC 29145) όταν στο Azo. Medium προσθέσαμε υπερκείμενο υγρό του P. radiciicola var. graminicola (ATCC 28231). Το στέλεχος αυτό δεν χρησιμοποιεί τη γλυκόζη και την ασπαραχίνη που υπάρχουν στο Phial. Medium. Επομένως η καλή ανάπτυξη του πρέπει ν' αποδοθεί σε προϊόντα μεταβολισμού του μύκητα P. radiciicola var. graminicola (ATCC 28231) που είχε προηγουμένως καλλιεργηθεί στο υλικό.

Ανάλογη ερμηνεία μπορεί να δοθεί και για την καλύτερη ανάπτυξη του A. lipoferum στα υλικά Azo. Medium με εκχύλισμα ζύμης και Azo. Medium με υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας του μύκητα P. radiciicola var. graminicola (ATCC 28231). Στα υλικά αυτά η ανάπτυξη ήταν καλύτερη ακόμα και από το θρεπτικό υλικό που περιείχε βιοτίνη. Το γεγονός αυτό πιθανόν να σημαίνει απαιτήσεις

του στελέχους και για άλλους παράγοντες αύξησης (growth factors).

Από το πείραμα που έγινε για να ελέγξουμε την ικανότητα χρησιμοποίησης της ασπαραχίνης και του ασπαραχινικόοξέος σαν μόνες πηγές άνθρακα είδαμε ότι το A. brasilense Sp7 (ATCC 29145) δεν είναι ικανό να χρησιμοποιεί τις ουσίες αυτές σαν μόνες πηγές άνθρακα, ενώ το A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) αναπτύσσεται πολύ καλά στη παρουσία τους. Αυτό διαπιστώθηκε για όλα τα στελέχη της συλλογής του εργαστηρίου Γεωργικής Μικροβιολογίας της ΑΓΕΑ. Τα στελέχη που ανήκουν στο A. lipoferum (Sp59, A και H2/N2) χρησιμοποιούν την ασπαραχίνη σαν μόνη πηγή άνθρακα, ενώ τα στελέχη που ανήκουν στο A. brasilense (Sp7, B, Γ, Δ, Ε, 4a1, 4a2, 4a4, H2, T5 και H3) δεν αναπτύσσονται με ασπαραχίνη σαν μόνη πηγή άνθρακα.

Φαίνεται ότι ο μύκητας P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231) εκκρίνει στο περιβάλλον τέτοιες ουσίες που είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του γένους Azospirillum spp. και δρουν ανάλογα με το εκχύλισμα ζύμης.

Όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα η καλλιέργεια του μύκητα P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231) διαπιστώθηκε ότι συνοδεύεται από ένα βακτήριο. Η απομόνωση και οι βιοχημικές δοκιμές αυτού του βακτηρίου έδειξαν ότι είναι ένα κινητό βακτήριο Gram αρνητικό που δεν δεσμεύει το ερυθρό του κόκκο, διαφέρει από το γένος Azospirillum spp. από τις διαστάσεις (είναι πιο μικρό), δεν έχει απαιτήσεις για βιοτίνη και δεν χρησιμοποιεί γλυκόζη, φρουκτόζη και ασπαραχίνη σαν μόνη πηγή άνθρακα, αναπτύσσεται όμως πολύ καλά σε θρεπτικά υλικά ελεύθερα αζώτου των Azospirillum spp. με οργανικά οξέα σαν πηγές άνθρακα.

Η αναγωγή σκευλασίου που έδειξε όταν καλλιεργήθηκε σε ημιστερεό θρεπτικό υλικό ελεύθερο αζώτου (Nfb) δείχνει τη

παρουσία αζωτοδεσμευτικής ικανότητας. Επίσης, απ'ότι είδαμε δεν υπήρξαν ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ αυτού του βακτηρίου και του Azospirillum spp. Η συνύπαρξη αυτού του αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου με την καλλιέργεια του μύκητα P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231) είναι ένα σημαντικό γεγονός.

Από τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αύξηση και τα μεταβολικά προϊόντα που εκκρίνει στο περιβάλλον ο μύκητας P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231), ευνοεί την ανάπτυξη των δύο ειδών των Azospirillum. Η ευνοϊκή αυτή επίδραση όμως, δεν επιβεβαιώνεται απαραίτητα όταν εμβολιάζουμε τα φυτά του σιταριού με τους δύο μικροοργανισμούς. Γιά να ελέγξουμε λοιπόν, τις πιθανές αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των δύο μικροοργανισμών και της επίδρασης τους στην ανάπτυξη του σιταριού, και χιά να επαληθεύσουμε τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, πραγματοποιήσαμε το πείραμα της ανάπτυξης εμβολιασμένων φυτών σε γλάστρες.

Οι τιμές του ξηρού βάρους των ριζών όπως είπαμε και στα αποτελέσματα, δεν παρουσιάζουν καμμία διαφορά, ενώ οι τιμές του ξηρού βάρους βλαστών των φυτών που εμβολιάστηκαν με τα δύο στελέχη των Azospirillum spp. και με το μύκητα P. radicicola var. graminicola ήταν υψηλότερες από τις τιμές του ξηρού βάρους βλαστών των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες (που δεν εμβολιάστηκαν). Η αύξηση αυτή ήταν σημαντική εκτός από τη περίπτωση των φυτών που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος A. brasilense Sp7 (ATCC 29145). Στη περίπτωση αυτή η αύξηση στο ξηρό βάρος βλαστών ήταν μόνο 16% μεγαλύτερη από τους μάρτυρες.

Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα, στις συνθήκες αυτού του πειράματος, οι αλληλοεπιδράσεις μεταξύ A. lipoferum Sp59 (ATCC

29707) και P. radicicola var. graminicola (ATCC 28231) ευνοούν την απόδοση του σιταριού και είναι αποτελεσματικές.

## 5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν η αζωτοδεσμευτική ικανότητα διαφόρων στελεχών του γένους Azospirillum, οι βιοχημικές ιδιότητές τους, η επίδρασή τους στην αύξηση του σιταριού, καθώς και οι πιθανές συνεργιστικές σχέσεις με τον μη παθογόνο μύκητα Phialophora radicicola var. graminicola.

Από την μελέτη της κινητικής αύξησης διαπιστώθηκε πως η βιοτίνη επιδρά στο πληθυσμιακό επίπεδο της φάσης στασιμότητας (A) στο A. lipoferum, και το διπλασιάζει σε σύγκριση με εκείνο που επιτυγχάνεται όταν το θρεπτικό υλικό είναι ελεύθερο βιοτίνης. Επίσης, η παρουσία της θειαμίνης στο θρεπτικό υλικό, ευνοεί την ανάπτυξη του A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707), όχι όμως του A. brasilense Sp7 (ATCC 29145).

Η ασπαραχίνη και το ασπαραχινικό οξύ μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μόνες πηγές άνθρακα από το A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) όχι όμως από το A. brasilense Sp7 (ATCC 29145). Ο χαρακτήρας αυτός, δηλαδή η ανάπτυξη σε ασπαραχίνη ή ασπαραχινικό οξύ σαν μόνες πηγές αζώτου-άνθρακα και ενέργειας θεωρείται ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ταξινομικός των δύο αυτών ειδών. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι όταν το A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) αναπτύσσεται με ασπαραχίνη σαν μόνη πηγή άνθρακα δεν παρουσιάζει απαιτήσεις σε βιοτίνη.

Εξ' άλλου, η απομόνωση ενός στελέχους (H2/N2) που είναι παρόμοιο με το A. lipoferum, χρησιμοποιεί γλυκόζη, α-κετογλουταρικό και ασπαραχίνη σαν μόνες πηγές άνθρακα, ενώ δεν απαιτεί βιοτίνη χιιά την ανάπτυξή του όπως το A. brasilense, δείχνει ότι το υπάρχον σύστημα ταξινόμησης των Tarrand et al, (1978), χιιά το οποίο τα

τελευταία χρόνια ασκείται κριτική από ερευνητές που ασχολούνται με το θέμα, χρειάζεται πολλές ακόμα βελτιώσεις.

Η επίδραση του θρεπτικού υλικού και οι συνθήκες καλλιέργειας μελετήθηκαν τόσο στην κινητική αυξήσεως όσο και στην αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα των Azospirillum. Κατά την διερεύνηση της επίδρασης της πηγής άνθρακα (μηλικό οξύ, μηλικό νάτριο και ηλεκτρικό οξύ) πάνω στη κινητική αυξήσεως των στελεχών που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε ότι, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Ενώ σε σχέση με τη μείωση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα από 5gr/l στο 1gr/l διαπιστώθηκε ότι, η αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα των στελεχών που εξετάστηκαν μειώνεται και πιο πολύ στο στέλεχος T5. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το στέλεχος H2 στο οποίο η μείωση αυτή είναι πιο μικρή.

Τα Azospirillum αναπτύσσονται πολύ καλύτερα όταν το θρεπτικό υλικό περιέχει πηγή αζώτου, έχοντας διπλάσια μέχρις τετραπλάσια χωρητικότητα (A) της λοχιστικής καμπύλης σε σύγκριση με τη περίπτωση που το θρεπτικό υλικό δεν περιέχει άζωτο. Τη μεγαλύτερη χωρητικότητα  $A = 0,67$  την έχει το στέλεχος H2.

Η άριστη θερμοκρασία για τα στελέχη που εξετάστηκαν ήταν 35C με μία μικρή διαφορά όμως μεταξύ 35 C και 27 C. Μεγαλύτερη αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα παρουσιάζει το στέλεχος H2 που και στους 21 C διαφέρει από τα στελέχη B και T5 κατά 26% και 70% αντίστοιχα. Ενώ το στέλεχος B παράγει μεγαλύτερες ποσότητες αυξητικών ουσιών.

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την επίδραση αυτών των στελεχών στην αύξηση φυτών σιταριού επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα. Σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το μη εμβολιασμένο μάρτυρα στα νωπά και ξηρά βάρη των φυτών, δείξανε τα στελέχη



H2, Sp7 και B και στα δύο επίπεδα αζώτου, ενώ το στέλεχος T5 όχι.

Σχετικά με τις συνεργιστικές σχέσεις μεταξύ Azospirillum και P. radicum var. graminicola (ATCC 28231), αφού διαπιστώσαμε ότι, μεταξύ των δύο αυτών μικροοργανισμών δεν υπήρξαν ανταγωνιστικές σχέσεις, σχεδιάσαμε να ερευνήσουμε την επίδραση του υγρού στο οποίο είχε καλλιεργηθεί ο μύκητας στη κινητική αύξηση των A. lipoferum και A. brasilense. Διαπιστώθηκε ότι το υγρό καλλιέργειας του μύκητα επιδρά ευνοικά στην κινητική αύξηση των δύο ειδών A. brasilense Sp7 (ATCC 29145) και A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707). Φαίνεται ότι ο P. radicum var. graminicola (ATCC 28231) εκκρίνει στο περιβάλλον ουσίες, ευνοικές για την αύξηση των Azospirillum, που δρουν ανάλογα με το εκχύλισμα ζύμης. Διαπιστώθηκε επίσης η συνύπαρξη ενός αζιτοδεσμευτικού βακτηρίου συνόδου του P. radicum var. graminicola (ATCC 28231) που απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια

Από πειράματα ανάπτυξης εμβολιασμένων φυτών σε γλάστρες διαπιστώθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ A. lipoferum Sp59 (ATCC 29707) και P. radicum var. graminicola (ATCC 28231) ευνοικές στην αύξηση φυτών σιταριού.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alexander M. (1961). Introduction to soil microbiology. John Wiley & sons. New York and London.

2. Akkermans A.D.L., Abdulkadir S., Trinick M.J., (1978). N-fixing root nodules in Ulmaceae: Parasponia or (and) Trema. Plant Soil, 49:711-715.

3. Ayanaba A., Dart P.J., (eds) (1977). Biological nitrogen fixation in forming systems of the tropics. Wiley and Sons. New York pp 1-377.

4. Balandreau J. (1983). Microbiology of the association. Can. J. Microbiol. 29:851-859.

5. Balandreau L.P., Millier C.R., Dommergues Y.R., (1974). Applied Microbiol. 27:662-665.

6. Baldani V.L.D., Dobereiner J., (1980). Host plant specificity in the infection of cereals with Azospirillum spp. Soil Biol. Biochem. 12:433-439.

7. Baldani V.L., Dobereiner J., (1981). Host plant specificity in the infection of maize, wheat and rice with Azospirillum spp. In: Associative N-Fixation (P.B. Vose, A.P. Ruschel eds). Vol. 1 pp 131 CRC Press Boca Raton, Florida.

8. Baldani L.I., V.L.D. Baldani, L. Seldin, J. Dobereiner, (1986). Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium.

Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 36 No. 1 pp 86-93

9. Balis C. (1969)

Phialophora radiculicola as a root parasite of grasses and cereals ph.D. dissertation, University of Cambridge.

10. Balis C. (1970). A comparative study of *Phialophora radicum* an avirulent fungal root parasite of grasses and cereals. *Ann. Appl. Biol.* 66:59-73.

11. Bally R., D. T. Bauzon, Th. Heulin, J. Balandreau (1983). Determination of the most frequent N-fixing bacteria in a rice rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* 29:881-887.

12. Becking J. H. (1963). Fixation of molecular nitrogen by an aerobic *Vibrio* or *Spirillum* spp. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 29:326.

13. Benemann J. R., R. C. Valentine (1972). The pathways of nitrogen fixation. *Advances in Microbiol. Physiology.* 8:59-104.

14. Berlier and Lespinat (1980). Mass-spectrometric kinetic studies of the nitrogenase and hydrogenase activities in "in vivo" cultures of *A. brasilense*. *Arch. Microbiol.* 125: 67-72.

15. Bothe H., M. G. Yates and F. C. Canon (1975). In: inorganic plant Physiology, biochemistry and genetics of dinitrogen fixation. In: Inorganic plant nutrition pp 241. Eds. by A. Lauchli and R. L. Bielecki. *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 15 A*

16. Bothe H., Klein B., Stephan M. P., Dobereiner J., (1981). Transformations of inorganic nitrogen by *Azospirillum* spp. *Arch. Microbiol.* 130:96-100.

17. Bouton J. H., R. J. Smith, S. C. Schank, G. W. Burton, M. E. Tyler, R. C. Littell, R. N. Gallagher and K. H. Quesenberry (1979). Response of pearl millet inbreds and hybrids to inoculation with *A. brasilense*. *Crop Sci.* 19:12-16.

18. Brown C. M., D. S. Mac Donald-Brown, J. L. Meers, (1974). Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. *Advances in Microbial Physiology.* 11:1-52.

19. Burns R. C., Hardy R. W. F. (1975). Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer. Berlin Heidelberg New York pp 1-189.

20. Burris R. M. (1977). A synthesis paper on nonleguminous N - fixing systems. In: Newton W, Potsgate J. R., Rodrigues-Barrueco C eds Recent developments in nitrogen fixation. Academic Press, London New York

21. Burris R. H., Albrecht S. L., Okon Y. (1978). Physiology and biochemistry of *Spirillum lipoferum*. In: Dobereiner J., Burris R. H., Hollaender A. (eds) Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. Basic Life Sciences, Vol 10 Plenum New York, London.

22. Umali-Garcia M., Hubell D. H., Gaskins M. H. (1978). Process of infection of *Panicum maximum* and *Spirillum lipoferum*. Ecol. Bull. (Stockholm) 26:373-379.

23. Umali-Garcia M., Hubell D. H., Gaskins M. H., Dazzo F. B. (1980). Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Env. Microbiol. 39:219-226.

24. Umali-Garcia M., Hubell D. H., Gaskins M. H., Dazzo F. B. (1981). Adsorbtion and mode of entry of *A. brasilense* to grass roots. In: Associative N -fixation (P. B. Vose, A. P. Ruschel, eds ) vol 1 pp 49 CRC Press Inc Boca Raton, Florida.

25. Gatzle A., Martin P., (1981). Some interactions between *Azospirillum* spp. and grass seedlings. In: Associative N -fixation (P. B. Vose, A. P. Ruschel, eds) vol 1 pp 27. CRC Press Inc Boca Raton, Florida.

26. Day J. M., Neves M. C. P., Dobereiner J. (1975). Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses. Soil Biol. Biochem. 7:107-112.

27. Day J.M., Dobereiner J., (1976). Physiological aspects of N - fixation by a Spirillum from Digitaria roots.

Soil Biol. Biochem. 8:45-50.

28. Deiwiche C.C. (1983).

Cycling of elements in the biosphere. In inorganic plant nutrition pp 212. Eds. by A. Lauchli and R.L. Bielecki. Encyklopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 15A.

29. De-Polli H., Matsui E., Dobereiner J., Salati E., (1977).

Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by N incorporation. Soil Biol. Biochem. 9:119-123.

30. De-Polli H., Bohlool B.B., Dobereiner J., (1980). Serological differentiation of Azospirillum species belonging to different host plant specificity groups. Arch. Microbiol. 126:217-222.

31. Dobereiner J. (1983).

Dinitrogen fixation in rhizosphere and phyllosphere association. In: Inorganic Plant Nutrition. Eds. by A. Lauchli and R.L. Bielecki. Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 15A. pp 330.

32. Dobereiner J. (1978). Nitrogen fixation in grass-bacteria association in the tropics. Proc Isot Biol Dinitrogen Fix IAEA Vienna.

33. Dobereiner J., Day J.M., Dart P.J., (1972). Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. Plant Soil 37:191-196.

34. Dobereiner J., I.E. Marriel, M. Nery (1976). Ecological distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22:1464-1473.

35. Dobereiner J., Baldani V.L.D. (1979) Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant Azospirillum lipoferum and

other bacteria. Can. J. Microbiol. 25:1264-1269.

36. Dobereiner J., Day J.M., (1975). Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In: Nitrogen fixation by free living microorganism (W.D.P. Steward, eds) Cambridge University Press London, New York, Melbourne.

37. Dobereiner J., De-Polli H., (1980). Diazotrophic rizocoenoses. In: Stewart W.D.P., Gallon J.R. (eds) Nitrogen Fixation Academic Press London, New York.

38. Dobereiner J., Baldani V.L.D., (1979). Selective infection of maize roots by streptomycin resistant *A. lipoferum* and other bacteria. Can. J. Microbiol. 25:1264-1269.

39. Dobereiner J. (1977). Physiological aspects of N fixation in grass-bacteria association. In: Newton W., Potsgate J.R., Rodrigues - Barrueco (eds) Recent development in nitrogen fixation, Academic Press, London, New York.

40. Dobereiner J., Day J.M., Dart J.P. (1972). Nitrogenase activity and nitrogen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol. 71:103-116.

41. Eskew, Focht and Ting (1977). Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. Appl. Env. Microbiol. 34:583-585.

42. Zimmer W, Penteado Stephan M, Bothe H, (1984). Denitrification by *Azospirillum brasilense* Sp7. Growth with nitrite as respiratory electron acceptor. Arch. Microbiol. 138:206-211.

43. Hardy R.W.F. (1977-1979): A treatise on nitrogen fixation. Vol. 1-4 Academic Press London, New York.

44. Hardy R.W.F., Burns R.C., Holsten R.D. (1973). Applications of the acetylene-athylene assay for measurement of nitrogen fixation

Soil Biol. Biochem. 5:41-81.

45. Hartman A., Fu H., Burris R.H. (1988). Influence of aminoacids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. *Appl. Env. Microbiol.* 54:87-93.

46. Hegazi N.A., M. Mohib, H.A. Amer, El S. Shokr. (1983). Response of maize plants to inoculation with *Azospirillum* and (or) straw amendment in Egypt. *Can. J. Microbiol.* 29:888-894.

47. Hill S., Drozd J.W., Potsgate J.V., (1972). Environmental effect on the growth of nitrogen-fixing bacteria. *J. Appl. Chem. Biotechol.* 22:541-558.

48. Hubbell D.H., T.M. Tien, M.H. Gaskins, J. Lee, (1981). Physiological interaction in the *Azospirillum*-grass root Association. In: Associative N Fixation (P.B. Vose, A.P. Ruschel, eds) Vol. 1, pp 1, CRC Press Inc Boca Raton, Florida.

49. Chan, Nelson and Knowles (1980). Hydrogen metabolism of *A. brasilense* in nitrogen free-medium. *Can. J. Microbiol.* 26:1126-1131

50. Child and Kurz (1978). Inducing effects of plant cells on nitrogenase activity by *Spirillum* and *Rhizobium* in vitro. *Can. J. Microbiol.* 24:143-148.

51. Cohen E., Y. Okon, J. Kigel, I. Nur, Y. Henis (1980). Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* spp. *Plant Physiol.* 66:746-749.

52. Kaneshiro T., Kurtzman M.A., (1982). Glutamate as a differential nitrogen source for the characterization of acetylene-reducing *Rhizobium* strains. *J. Appl. Microbiol.* 52:201-207.

53. Kapulnik Y., S. Sarig, I. Nur, Y. Okon. (1983). Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. *Can. J. Microbiol.* 29:895-899.

54. Kapulnik Y., M. Feldman, Y. Okon, Y. Henis, (1985). Contribution of the nitrogen fixed by the Azospirillum to the N nutrition of spring wheat in Israel. Soil Biol. Biochem. 17:509-515.

55. Kavimandan S.K., Subba Rao N.S., Mohrir A.V., (1978). Isolation of Spirillum lipoferum from the stems of wheat and nitrogen fixation in enrichment cultures. Curr. Sci. 47:96-98.

56. Krieg N.R., Dobereiner J., (1984). Genus Azospirillum. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1 pp 94-104. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

57. Lakshmi-Kurami M., Kavimandan S.K., Subba Rao N.S., (1976). Occurrence of nitrogen fixing Spirillum in root of rice, maize and maize plants. Indian J. Exp. Biol. 14:638-639.

58. Lee K.K., Alimagno B., Yoshida T., (1977). Field technique using the acetylene reduction method to assay nitrogenase activity and its associations with the rice rhizosphere. Plant Soil 47:519-526.

59. Lin W., Y. Okon, R.W.F. Hardy, (1983). Enhanced mineral uptake by Zea mays and Sorghum bicolor roots inoculated with Azospirillum brasilense. Appl. Env. Microbiol. 45:1775-1779).

60. Ludden, Okon and Burris, (1978). The nitrogenase system of Spirillum lipoferum. Biochem. J. 173:1001-1003.

61. Magalhaes L.M.S., Neyra C.A., Dobereiner J., (1978). Nitrate and nitrite reductase negative mutants of N-fixing Azospirillum spp. Arch. Microbiol. 117:247-252.

62. Magalhaes F.M.M., Patriquin D., Dobereiner J., (1979). Infection of field-grown maize with Azospirillum spp.



Rev. Bras. Biol. 39:587-596.

63. Maier R.J., Hanns F.J., Evans H.J., (1979).

Regulation of hydrogenase in *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 137:824-829.

64. Martinez-Dretz G., M. del Gallo, C.L. Burpee, R.H. Burris (1984)

Catabolism of carbohydrate and organic acids by the *Azospirilla*. J. Bacteriol. 159:80-85.

65. Millbank J.W., (1969).

Nitrogen fixation in moulds and yeasts—a reappraisal.

Arch. Microbiol. 68:32-39.

66. Nelson L.M., Knowles R., (1978).

Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. Can. J. Microbiol. 24:1395-1403.

67. Neyra C.A., Dobereiner J. (1977).

Nitrogen fixation in grasses. Adv. Agron. 29:1-38.

68. Neyra C.A., van Berkum P., (1977).

Nitrat reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*.

Can. J. Microbiol. 23:306-310.

69. Nur, Steinitz, Okon and Hennis (1981).

Carotenoid composition and function in nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azospirillum*. J. Gen. Microbiol. 26:714-718.

70. Nur I., Y. Okon, Y. Hennis, (1980)

An increase in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. Can. J. Microbiol. 26:482-485.

71. Nur I., Y. Okon, Y. Hennis, (1980a).

Comparative studies of nitrogen fixing associated with grasses in Israel with *A. brasilense*. Can. J. Microbiol. 26:714-718.

72. Quispel A. (1974).

The biology of nitrogen fixation. North-Holland, Res. Monogr Frontiers Biol. Amsterdam Oxford pp 1-769.

73. O'Hara G.W., M.R. Davey, J.A. Lucas, (1987).

Effect of nitrogen on the yield response of *Penisetum americanum*, *Triticum aestivum* and *Zea mays* to inoculation with *A. brasilense* under temperate conditions. Biol. Fert. of Soils. 4:67-73.

74. Okon Y, Albrecht S.L., Burris R.H., (1976).

Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 125:1248-1254.

75. Okon Y, Albrecht S.L., Burris R.H., (1976b).

Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 128:592-597.

76. Okon Y, Albrecht S.L., Burris R.H., (1987).

Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. Appl. Env. Microbiol. 33:85-88.

77. Patriquin D.G., Dobereiner J., (1978).

Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brasil. Can. J. Microbiol. 24:734-742.

78. Potsgate J.R. (eds) (1971).

The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation. Plenum Press, New York London pp 1-326.

79. Potsgate J.R., (1978). Nitrogen fixation. Stud. Biol. No 92 Arnold London pp 1-67.

80. Rao A.V., Venkateswarly B, (1982).

Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with

dicotyledonous succulent plants on the Indian desert.

Can. J. Microbiol. 28:778-782.

81. Rennie R. J., (1980). N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *A. brasilense* associated with maize.

Can. J. Bot. 58:21-24.

82. Reinhold B., T. Hyrek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kerster S. Thielemans, J. de Ley. (1987).

*Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass.

Int. J. Syst. Bacteriol. Vol 37 No 1 pp 43-51.

83. Reinhold B., T. Hyrek, E. Niemann, I. Fendric, (1986).

Close association of *Azospirillum* and diazotrophic roots with different root zones of callar grasses.

Appl. Env. Microbiol. 52:520-526.

84. Reynders L, Vlassak K, (1976).

Nitrogen-fixing *Spirillum* species in Belgian soils.

Agriculture 24:329 336.

85. Rinaudo G., D. Gauthier, Y. Doumergues, (1981).

Enhancement of associative N-fixation through manipulation of the rhizosphere microflora. In: Associative N Fixation (P. B. Vose and A. P. Ruschel eds) Vol 1 pp 104-109 CRC Press Boca Raton Florida.

86. Rocha R. E. M., Baldani J., Dobereiner J., (1981).

Specificity of infection by *Azospirillum* spp in plant with C4 photosynthetic pathway. In: Associative N-Fixation (P. B. Vose and A. P. Ruschel eds) Vol 2 pp 67 CRC Press Inc Boca Raton Florida.

87. Rodrigues Caceras E., (1982)

Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp.

Appl. Env. Microbiol. 44:990 991.

88. Ruiz-Argueso T, Emerich D.W., Evans H.J., (1979).  
Hydrogenase system in legume nodules: A mechanism providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage.  
J. Bacteriol. 137:824-829.
89. Ruschel A.P., Vose P.B., Matsui E., Victoria R.L., Tsai S.M., Saito (1982). Field evaluation of N-Fixation and N-utilization by Phaseolus bean varieties determined by N-isotope dilution.  
Plant Soil 65:397-407.
90. Sampaio M.J.A.M., Vasconcelos de L., Dobereiner J., (1978).  
Characterization of three groups within Spirillum lipoferum Beijerinck. Ecol. Bull. (Stocholm). 26:364-365.
91. Silva da M.F.S., Dobereiner J., (1978).  
Occurrence of Azospirillum spp in soil and roots. Plant Soil. 37:191-196.
92. Smibert R.M., N.R. Krieg, (1981).  
General characterization. In: Manual of methods for general bacteriology (Eds P. Gerhardt) pp 409-449 American Society For Microbiology. Washington.
93. Soderlund R., Svensson B.H., (1976).  
The global nitrogen cycle. In: Svensson B.H., Soderlund R. (eds). Nitrogen, phosphorus and sulphur-global cycles. Scope Rep. 7. Ecol. Bull. (Stocholm) 22:23-72.
94. Sprent J. I., (1979).  
The biology of nitrogen-fixing organism. Mc Graw-Hill, Maidenhead.  
pp 1-196.
95. Stephan M.P., Pedrosa de O.F., Dobereiner J., (1981).  
Physiological studies with Azospirillum spp. In: Associative N-Fixation (P.B. Vose, A.P. Ruschel eds) Vol 1 CRC Press Boca Raton ,

Florida.

96. Stephan M.P., Zimmer W., Bothe H., (1984).

Denitrification by *Azospirillum brasilense* Sp7. Growth with nitrous oxide as respiratory electron acceptor.

Arch. Microbiol. 138:212-216.

97. Subba Rao N.S., (1981).

Response of crops to *Azospirillum* inoculation in India. In: Associative N-Fixation (P.B. Vose, A.P. Ruschel eds) Vol 1 CRC Press Boca Raton, Florida.

98. Tarrand J.J., Krieg N.R., Dobereiner J., (1978).

A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24:967-980.

99. Tarrand J.J., Krieg N.R., Dobereiner J., (1979).

Validation of the publication of the new names and new combinations previously published outside the I.J.S.B.

Int. J. Syst. Bacteriol. 29:78-80.

101. Tibelins K.H., Knowles R., (1984).

Uptake hydrogenase activity in denitrifying *Azospirillum brasilense* grown anaerobically with nitrous oxide or nitrate.

J. Bacteriol. 157:84-88.

102. Tien T.M., M.H. Gaskins, P.H. Hubell, (1979).

Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effects on the growth of Pearl millet (*Penisetum americanum*). Appl. Env. Microbiol. 37:1016-1024.

103. Trinick M.J., (1973).

Symbiosys between *Rhizobium* and the non-legume, *Trema aspera*.

Nature 244:459-460.

104. Tubb R. S., (1976).

Regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium* species.

Appl. Env. Microbiol. 32:483-488.

105. Yates M. G., (1977).

Physiological aspects of nitrogen fixation. pp 219-270.

In: Newton W., Potsgate J. R., Rodrigues-Barruico C., (eds) Recent developments in nitrogen fixation. Academic Press Inc. London New York

106. Yoch D. C., Pengra R. M., (1966).

Effect of aminoacids on the nitrogenase system of *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 92:618-622.

107. Ferreira M. C. B., Fernandes M. S., Dobereiner J., (1987).

Role of *Azospirillum brasilense* nitrat reductase in nitrat assimilation by weat plants. Biol. Fertil. Soils. 4:47-53.

108. Freitas J. L. M., Pereira P. A. A., Dobereiner J., (1981).

Effetc of organic matter and *Azospirillum* spp strains in the metabolism of nitrogen in *Sorghum vulgare*. In: Vose P. B., Ruschel A. P., (eds) Associative N-Fixation. Vol 1. CRC Press Boca Raton Florida.

109. van Berkum P., (1980).

Evaluation of acetylene by exciced roots for the determination of the nitrogen fixation in grasses. Soil Biol. Biochem. 12:141-145.

110. van Berkum P., B. Bohlool, (1980).

Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. Microbiol. Rev. 44:491-517.

111. van Berkum P., J. M. Day, (1979).

Nitrogenase activity associated with soil cores of grasses in

Brasil. Soil Biol. Biochem. 12:137-140.

112. Vlassak K., L. Reynders, (1981).

Agronomic aspects of biological dinitrogen fixation by *Azospirillum* spp. in temperate regions. In: Associative N-Fixation. (P.B. Vose, A.P. Ruschel eds) Vol 1 pp.93 CRC Press Inc Boca Raton Florida.

113. Vlassak K., Reynders L., (1978).

Conversion of tryptophan to auxin by *Azospirillum* spp. Proc. Steenbook-Kettering Int Symp. N-Fixation, Abstr. 44 Madison.

114. Volpon A.G.T., De-Polli H., Dobereiner J., (1981).

Changes in efficiency of nitrogen fixation in various growth stages of batch cultures of *Azospirillum lipoferum*. In: Associative N-Fixation (P.B. Vose, A.P. Ruschel eds) Vol.1 CRC Press Boca Raton Florida.

115. Volpon, De-Polli and Dobereiner, (1981).

Physiology of nitrogen fixation in *Azospirillum lipoferum* Br 17 ATCC (29709) Arch. Microbiol. 128:371-375.

116. Vose P.B. (1983).

Developments in non-legume N-fixing systems. Can. J. Microbiol. 29:837-850.

117. Wani S.P., Dart P.J., Upadhyaya M.N., (1983).

Factors affecting nitrogenase activity associated with Sorghum and millet estimated using the soil core assay. Can. J. Microbiol. 29:1063-1069.

118. Watanabe I, Barraquio W.I., Guzman de M.R, Cabrera D.A. (1979).

Nitrogen fixing (acetylene reduction) activity and population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing associated with wetland rice. Appl. Env. Microbiol. 37:813-819.

119. Weier K.L. (1980).

Nitrogenase activity associated with three tropical grasses growing in undisturbed soil cores. *Soil. Biol. Biochem.* 12:131-136.