



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

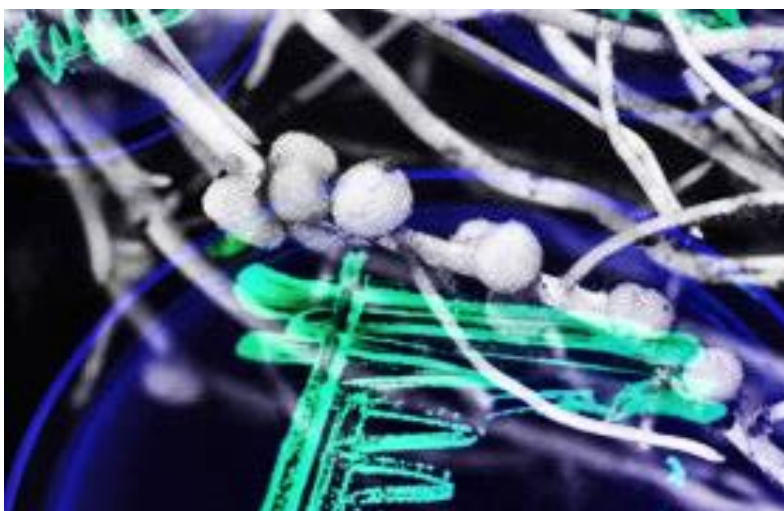
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΓΡΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ
ΣΗΜΑΣΙΑΣ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη των ιδιοτήτων που προάγουν την
ανάπτυξη των φυτών σε βακτήρια που
απομονώθηκαν από φυμάτια μαυρομάτικου
φασολιού

Γιαννακοπούλου Γ Μελίνα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ταμπακάκη Αναστασία



ΑΘΗΝΑ, 2019

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Μελέτη των ιδιοτήτων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών σε
βακτήρια που απομονώθηκαν από φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού**

**Study of the plant growth promoting characteristics of bacteria
isolated from cowpea nodules**

Γιαννακοπούλου Γ Μελίνα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ταμπακάκη Αναστασία

Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή :

Ταμπακάκη Αναστασία, Αναπλ. Καθηγήτρια

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Αναπλ. Καθηγητής

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής, στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών «Αγροβιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικής Σημασίας» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου κ. Ταμπακάκη Αναστασία για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια της υλοποίησης των πειραμάτων, καθώς και για την εμπιστοσύνη της, τη στήριξή της, τις γνώσεις και την υπομονή που επέδειξε κατά τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Αντιπρύτανη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη και το διευθυντή του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας κ. Κατινάκη Παναγιώτη για το χρόνο και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Ευσταθιάδου Ευδοξία για την πολύτιμη βοήθειά της, τη στήριξη, τις γνώσεις και τις συμβουλές της στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και τη βοήθειά τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, στην αδερφή μου και στους δικούς μου ανθρώπους που είναι δίπλα μου σε οτιδήποτε επιλέγω.

Περίληψη

Τα ριζόβια είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία φυματίων και για την αζωτοδέσμευση στα περισσότερα είδη ψυχανθών. Ωστόσο, τα φυμάτια αποικίζονται και από άλλα ριζοβακτήρια, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν φυμάτια. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα ριζοβακτήρια των φυματίων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία, συμπεριλαμβάνοντας περίπου το 99 % του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού. Όλο και περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν την ικανότητα ορισμένων ριζοβακτηρίων να ενισχύουν την ανάπτυξη των ψυχανθών μέσω της αζωτοδέσμευσης, της διαλυτοποίησης φωσφόρου, της ενίσχυσης της ικανότητας των συμβιωτικών ριζοβίων να δημιουργούν φυμάτια και να αζωτοδεσμεύουν. Από την άλλη πλευρά, ορισμένα μη-ριζόβια βακτήρια μπορεί να λειτουργούν αρνητικά, μειώνοντας την απόδοση των ριζοβακτηρίων ή πυροδοτώντας τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού, οι οποίοι αποτρέπουν την αποίκιση του ξενιστή από το βακτήριο. Παρ' όλα αυτά, η βιολογική συμβολή και οι αγρονομικές συνέπειες του ενδοφυτισμού στα φυμάτια, τελούν υπό διερεύνηση. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της ποικιλομορφίας των βακτηρίων που αποικίζουν τα ριζικά φυμάτια φυτών μαυρομάτικου φασολιού, τα οποία έχουν συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, καθώς και η μελέτη της ικανότητάς τους να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, ώστε να επιλεγούν εκείνα με την υψηλότερη απόδοση, τα οποία θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν ως βιολιπάσματα. Ενδοφυτικά βακτήρια απομονώθηκαν από φυμάτια καλλιεργούμενου μαυρομάτικου φασολιού και ταξινομήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικούς κλάδους (clusters), έπειτα από τη διενέργεια BOX-PCR. Στη συνέχεια, τα αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε κλάδο εξετάστηκαν για την παρουσία χαρακτηριστικών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και μελετήθηκε η φυλογενετική τους συγγένεια με την εφαρμογή ανάλυσης πολυτοπικής αλληλούχισης (Multilocus Sequence Analysis, MLSA) για τέσσερα γονίδια κυτταρικής επιμέλειας (*gyrB*, *rpoB*, *atpD* και *infB*). Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν συγγένεια με τα στελέχη *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter mori* και *Lelliottia amnigena* και πιθανά να συνιστούν νέα είδη ή υποείδη. Όλα τα υπό μελέτη στελέχη παρουσίασαν ποικίλα PGP χαρακτηριστικά *in vitro*: διαλυτοποίηση φωσφόρου, αζωτοδέσμευση, παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA) και σιδηροφόρων. Επιπλέον, παρουσίασαν υψηλή αντοχή στην αλατότητα (έως και 8 %). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμβαδίζουν με ευρήματα προηγούμενων ερευνών, οι οποίες αναφέρουν ότι αρκετά στελέχη *Enterobacter spp.* παρουσιάζουν ποικιλία PGP χαρακτηριστικών. Τα στελέχη που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά, για τη δημιουργία ενός φιλικού προς το περιβάλλον βιολιπάσματος για το μαυρομάτικο φασόλι και πιθανότατα και για άλλα σημαντικά είδη φυτών.

Λέξεις κλειδιά: ριζοβακτήρια, ενδοφυτικά βακτήρια, φυμάτια, μαυρομάτικο, φυλογένεια, διαλυτοποίηση φωσφόρου, αζωτοδέσμευση, παραγωγή IAA, παραγωγή σιδηροφόρων, προαγωγή ανάπτυξης φυτών.

Abstract

Rhizobia are responsible for root nodulation and nitrogen fixation in most legume species. However, legume nodules are occupied by other endophytic bacteria, called non-rhizobial bacteria. Recent studies have shown that a high diversity of non-rhizobial bacteria exist with nodules and they may encompass up to 99% of the total bacterial population. Growing evidence indicates that some of these non-rhizobial bacteria could be beneficial to their legume hosts by enhancing plant growth, fixing atmospheric nitrogen, solubilizing phosphate and improving the nodulation and N₂ fixation of legume–rhizobia symbionts. In contrast to these positive effects, some non-rhizobial bacteria may be able to reduce the fitness of nodulating rhizobia or to trigger host defense responses resulting in the prevention of the infection process. Nevertheless, the biological significance and the agronomic implications of nodule endophytism are still not well understood. This study aimed to characterize the diversity of bacteria associated with root-nodules of cowpea plants collected from different locations in Greece and to assess their ability for promoting plant growth in order to select potential PGPR that perform higher plant growth promotion for use as biofertilizers. Nodule endophytic bacteria were isolated from field grown cowpea plants and were grouped into four clusters by BOX-PCR. Representative isolates of each cluster were subjected to multilocus sequence analysis (MLSA) using four housekeeping genes (*gyrB*, *rpoB*, *atpD* and *infB* genes) to assess their phylogenetic affiliation and were screened for various plant growth promoting traits. Phylogenetic analysis showed that the nodule endophytic isolates were related to *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter mori*, and *Lelliottia amnigena* and they may constitute novel species or subspecies. All the test isolates possessed multiple plant-growth promoting characteristics *in vitro*: phosphate solubilization, nitrogen fixation, production of phytohormone indole acetic acid and siderophores. Moreover, the isolates exhibited high salt tolerance (up to 8%). The results are in line with previous studies reported that certain *Enterobacter* spp. possess multiple growth promoting activities. These isolates could be developed as an eco-friendly biofertilizer for cowpea and probably for other important plant species in future.

Keywords: rhizobacteria, endophytic bacteria, nodules, cowpea, phylogeny, phosphate solubilization, IAA production, siderophore production, plant growth promotion.

Περιεχόμενα

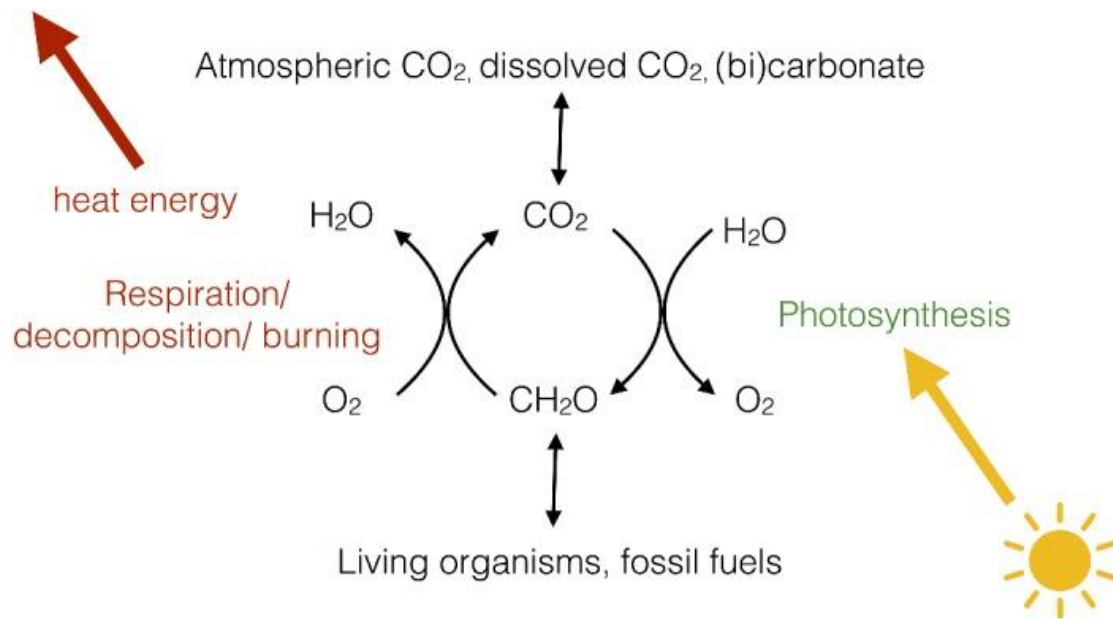
Περίληψη	3
Abstract.....	4
1. Εισαγωγή	8
1.1 Χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών	13
1.1.1 Διαλυτοποίηση Φωσφόρου	13
1.1.2 Δέσμευση Ατμοσφαιρικού Αζώτου	17
1.1.3 Παραγωγή Σιδηροφόρων	18
1.1.4 Παραγωγή Ινδολοξικού Οξέος - IAA.....	20
1.1.5 Αντοχή στην Αλατότητα	22
1.1.6 Ομαδική κινητικότητα.....	24
1.2 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί.....	25
1.2.1 Ριζικά ενδόφυτα	28
1.2.2 Μικροβίωμα φυματίων.....	28
1.2.3 Το μικροβίωμα των φυματίων του μαυρομάτικου φασολιού (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp).....	33
1.2.4 Στελέχη της τάξης Enterobacteriales	35
1.3 Σκευάσματα ενεργών μικροοργανισμών (Βιολιπάσματα)	41
1.4 Γονιδιώματα ενδοφύτων	43
1.4.1 Γονιδιωματική ανάλυση	43
1.4.3 Μεταγονιδιωματική ανάλυση	46
1.4.4 Μεταγραφωματική και Μεταμεταγραφωματική ανάλυση	46
1.4.5 Πρωτεομική και Μεταπρωτεομική ανάλυση.....	47
1.4.6 Μεταπρωτεογονιδιωματική	48
Σκοπός της Μελέτης	50
2. Υλικά και Μέθοδοι	51
2.1 Βιολογικό Υλικό.....	52
2.2 Καλλιέργεια και διατήρηση βακτηρίων.....	52
2.3 Μέτρηση ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών με φασματοφωτομετρία	52
2.4 Βιοδοκιμή ομαδικής κίνησης βακτηρίων	53
2.5 Βιοδοκιμή αντοχής βακτηρίων σε συνθήκες αλατότητας.....	53
2.6 Βιοδοκιμή διαλυτοποίησης φωσφόρου	53
2.6.1 Ποιοτική μέθοδος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	54
2.6.2 Ποσοτική μέθοδος σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα	55

2.7 Βιοδοκιμή ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	56
2.7.1 Μέθοδος γραμμικής επίστρωσης	56
2.7.2 Μέθοδος Kirby-Bauer διάχυσης εμποτισμένων δισκίων αντιβιοτικών.....	58
2.8 Παραγωγή σιδηροφόρων	59
2.8.1 Τεχνική O-CAS.....	60
2.8.2 Τροποποιημένη τεχνική O-CAS.....	61
2.9 Παραγωγή Ινδολοξικού οξέος (IAA)	62
2.9.1 Τεχνική PC	63
2.9.2 Τεχνική S2/1	63
2.10 Βιοδοκιμή αζώτου	64
2.11 Απομόνωση Ολικού Γονιδιωματικού DNA για Gram ⁻ (αρνητικά) βακτήρια	65
2.12 Ανάλυση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	66
2.13 Απομόνωση ζώνης DNA από πηκτή αγαρόζης	67
2.14 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας DNA.....	68
2.15 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και Αλληλούχηση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (DNA sequencing).....	68
2.16 Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση	71
3. Αποτελέσματα	73
3.1 Διερεύνηση της ομαδικής κίνησης των υπό μελέτη στελεχών.....	74
3.2 Διερεύνηση αντοχής βακτηριακών στελεχών σε συνθήκες αλατότητας	75
3.3 Διερεύνηση ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου.....	78
3.3.1. Ποιοτική Ανάλυση σε στερεό θρεπτικό υλικό NBRI-BPB-Agar.....	78
3.3.2 Ποσοτική ανάλυση σε υγρό θρεπτικό μέσο	80
3.4 Διερεύνηση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	82
3.4.1 Μέθοδος της γραμμικής επίστρωσης.....	82
3.4.2 Μέθοδος διάχυσης εμποτισμένων δισκίων	83
3.5 Διερεύνηση παραγωγής σιδηροφόρων.....	85
3.5.1 Τεχνική O-CAS.....	85
3.5.2 Τροποποιημένη τεχνική O-CAS.....	85
3.6 Διερεύνηση παραγωγής Ινδολοξικού οξέος (IAA)	87
3.7 Διερεύνηση αφομοίωσης αζώτου	91
3.8 Φυλογενετική ανάλυση	91
4. Συζήτηση	99
Ανάλυση ομαδικής κινητικότητας.....	99

Ανάλυση αντοχής βακτηρίων σε συνθήκες αλατότητας	99
Ανάλυση ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου.....	99
Ανάλυση ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων.....	100
Ανάλυση ικανότητας παραγωγής IAA.....	101
Ανάλυση ικανότητας αζωτοδέσμησης.....	102
Σύγκριση φυλογένειας των εξεταζόμενων στελεχών βάσει των γονιδίων κυτταρικής επιμέλειας <i>atpD</i> και <i>infB</i>	103
Σύγκριση φυλογένειας των εξεταζόμενων στελεχών βάσει της ακολουθίας των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων κυτταρικής επιμέλειας <i>atpD</i> , <i>infB</i> , <i>gyrB</i> και <i>proB</i>	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	105
Βιβλιογραφία.....	108

1. Εισαγωγή

Το φυτό αποτελεί τον πλέον σημαντικό οργανισμό για τη συνέχιση της ζωής στη Γη. Διαθέτει την ικανότητα να μετατρέπει την ηλιακή ακτινοβολία σε χημική ενέργεια μέσω του μηχανισμού της φωτοσύνθεσης, η οποία αποτελεί τη μοναδική ενεργειακή οδό της ηλιακής ακτινοβολίας προς εκμεταλλεύσιμες μορφές ενέργειας. Η χημική ενέργεια από τη φωτοσύνθεση «αποθηκεύεται» σε μόρια φορείς (ATP, NADPH) και στη συνέχεια χρησιμοποιείται σε μονοπάτια παραγωγής βιομορίων υψηλού ενεργειακού δυναμικού, των υδατανθράκων. Τα φυτά αποτελούν την κύρια μορφή τροφής για τους οργανισμούς του ζωικού βασιλείου, παρέχοντας τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξή τους. Επιπλέον, τα φυτά συμμετέχουν στον κύκλο του άνθρακα, μετατρέποντας το ανόργανο άζωτο σε οργανικά αζωτούχα βιομόρια (Γαλάτης et al., 2014).



Εικόνα 1. Η σχέση της κυτταρικής αναπνοής και της φωτοσύνθεσης, με τα παγκόσμια επίπεδα CO₂ και O₂ (Johnson, 2017).

Ο ανθρώπινος πληθυσμός αυξάνεται κατά 1,18 % κάθε χρόνο και υπολογίζεται ότι μέχρι το 2050 θα έχει φτάσει τα 9,7 δισεκατομμύρια (Department of Economic and Social Affairs/Population Division, 2015). Η αύξηση αυτή του πληθυσμού συνοδεύεται από πολλαπλασιασμό των διατροφικών αναγκών, ο οποίος με τη σειρά του οδηγεί σε υπερεκμετάλλευση των φυσικών πόρων, με ταυτόχρονη υποβάθμιση της βιοποικιλότητας, κλιματική αλλαγή και διατάραξη του κύκλου του αζώτου. Με στόχο την αύξηση των καλλιεργητικών αποδόσεων πραγματοποιείται αλόγιστη χρήση χημικών λιπασμάτων, κυρίως αζώτου και φωσφόρου. Η ανακάλυψη της διαδικασίας Haber-Bosch, από τον Fritz Haber το 1909, η οποία περιγράφει την αντίδραση του N₂ με το H₂ προς παραγωγή αμμωνίας (NH₃), αποτελεί ορόσημο στην ιστορία της «Πράσινης Επανάστασης», τροφοδοτώντας την επέκταση της παγκόσμιας γεωπονίας και δίνοντας λύση σε προβλήματα υποσιτισμού (Charles, 2005; Smil, 2001). Η ραγδαία αύξηση της παραγωγής συνθετικών αζωτούχων λιπασμάτων κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ανθρώπινες ενέργειες που επηρεάζουν την περιβαλλοντική ισορροπία. Περίπου το 50 % της ποσότητας λιπασμάτων που χορηγείται στα φυτά αδυνατεί να απορροφηθεί από αυτά, με αποτέλεσμα υψηλές ποσότητες αμμωνιακού αζώτου να συσσωρεύονται στο έδαφος και να

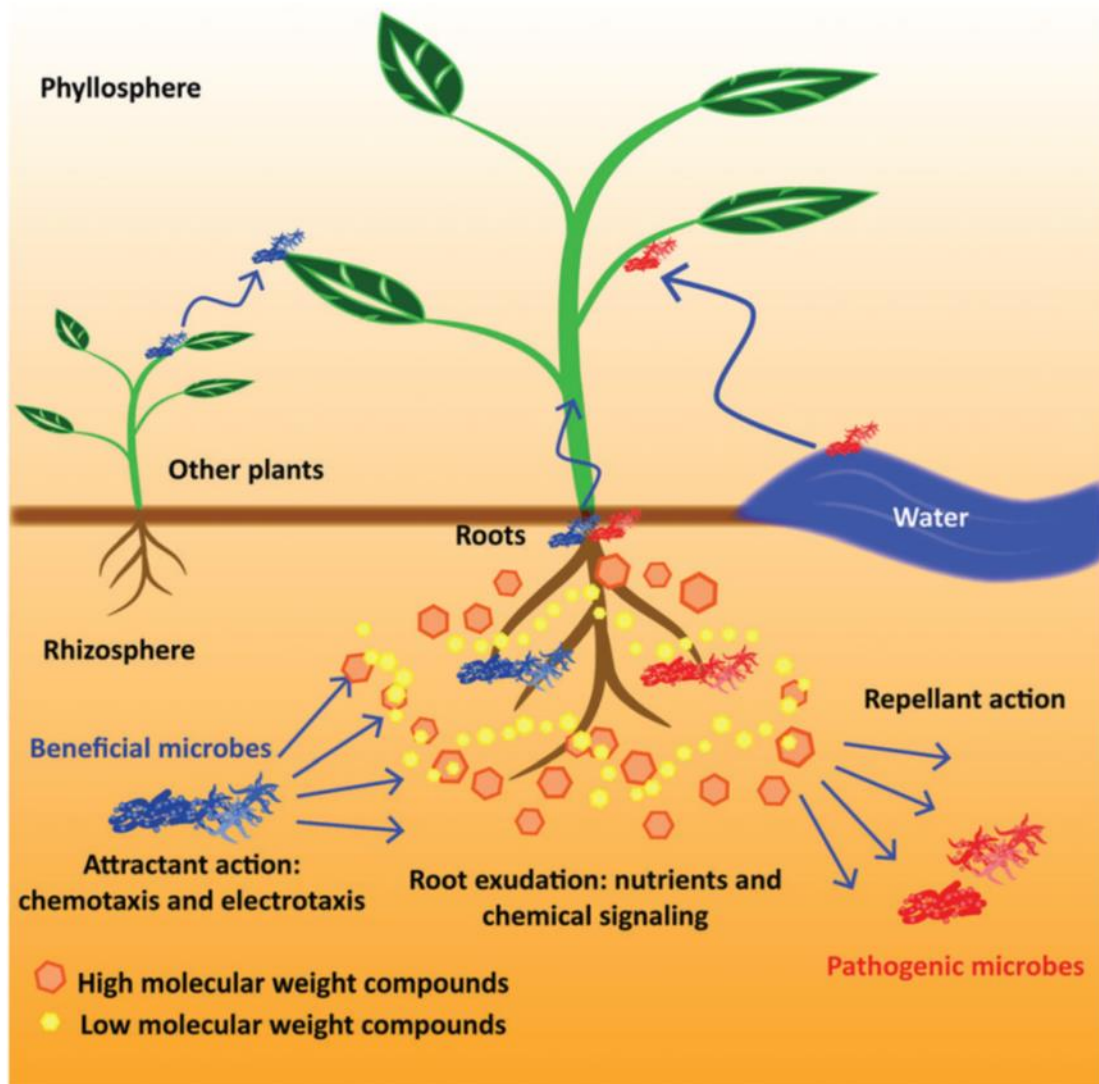
οξειδώνονται προς νιτρικά ιόντα με τη δράση ειδικών νιτροποιητικών βακτηρίων του εδάφους (*Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitococcus*, *Nitrospina*) (Bernhard, 2010). Τα νιτρικά ιόντα σε μεγάλες ποσότητες οδηγούνται σε απόπλυση από τη ριζόσφαιρα προς βαθύτερα στρώματα του εδάφους με αποτέλεσμα να καταλήγουν στον υδροφόρο ορίζοντα προκαλώντας φαινόμενα ευτροφισμού (Boesch, 2002). Το τελευταίο στάδιο του κύκλου του αζώτου περιλαμβάνει τη διαδικασία της απονιτροποίησης, η οποία καταλήγει στην επιστροφή του βιοδιαθέσιμου αζώτου στην ατμόσφαιρα (Bernhard, 2010). Παραπροϊόντα της αντίδρασης απονιτροποίησης αποτελούν το αέριο μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το αέριο υπεροξείδιο του αζώτου (N₂O), με το τελευταίο να αποτελεί ένα ισχυρό αέριο θερμοκηπίου με χρόνο ημιζωής στην ατμόσφαιρα τα 60 χρόνια και το οποίο συμβάλλει στην καταστροφή του όζοντος στο επίπεδο της στρατόσφαιρας (Schlesinger and Bernhardt, 2013; Vitousek et al., 1997). Απειλή για την περιβαλλοντική ισορροπία αποτελεί, επίσης, και η χορήγηση υψηλών ποσοτήτων αζώτου υπό μορφή ουρίας. Σε αρκετές περιπτώσεις, παρατηρείται επιφανειακή χορήγηση ουρίας, η οποία εάν δεν ενσωματωθεί στο έδαφος άμεσα, υδρολύεται από το ένζυμο ουρεάση παράγοντας αμμωνία η οποία εξαερώνεται. Η αμμωνία σε αέρια μορφή αντιδρά με τα υγρά σταγονίδια της ατμόσφαιρας και επιστρέφει στη Γη υπό τη μορφή όξινης βροχής (Bundy, 2001). Με σκοπό την εύρεση εναλλακτικών τρόπων για τη βελτίωση της ποιότητας των καλλιεργειών, αυξάνεται ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης των φυτών με τους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας, οι οποίοι μπορούν να λειτουργήσουν ως βιολιπάσματα και βιοπαρασιτοκτόνα (Premachandra et al., 2016; Vessey, 2003). Τα βιολιπάσματα είναι σκευάσματα τα οποία περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς και εφαρμόζονται σε σπόρους, στην επιφάνεια των φυτών ή στο έδαφος και αποικίζουν τη ριζόσφαιρα ή το εσωτερικό του φυτού (ενδοφυτικοί) ενισχύοντας την παροχή ή τη διαθεσιμότητα βασικών θρεπτικών συστατικών (Vessey, 2003). Τα βιοπαρασιτοκτόνα είναι φυσικές βιοχημικές ουσίες ή μικροοργανισμοί οι οποίοι συμβάλλουν στην επιβίωση των φυτών αποτρέποντας την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Chandler et al., 2011).

Τα φυτά αποικίζονται από μία πληθώρα μικροοργανισμών, οι οποίοι συμβάλλουν με διαφορετικούς τρόπους στην υγεία και την ανάπτυξή τους. Το φυτικό μικροβίωμα αποτελείται από μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, πρώτιστα, ωομύκητες και αρχαία), οι οποίοι αποικίζουν είτε το εξωτερικό του φυτού: ριζόσφαιρα και φυλλόσφαιρα, είτε το εσωτερικό του φυτού: ενδόσφαιρα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι παθογόνοι, ή να παρουσιάζουν ουδέτερη αλληλεπίδραση με το φυτό ή να δρουν προάγοντας την ανάπτυξη του φυτού. Το φυτικό μικροβίωμα αποτελεί ένα υποσύνολο του φυτοβιώματος, το οποίο περιλαμβάνει τα φυτά και το περιβάλλον τους καθώς και τους οργανισμούς (μικροοργανισμοί, ζώα και άλλα φυτά) που αλληλοεπιδρούν με το φυτό και επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την επιβίωσή του (Leach et al., 2017).

Ο όρος ριζόσφαιρα χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Hiltner το 1904 (Hartmann et al., 2008). Η ριζόσφαιρα αποτελεί τον περιβάλλοντα εδαφικό χώρο της ρίζας, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τη ρίζα με βλέννη (Taiz and Zeiger, 2010; Γαλάτης et al., 2014) και περιλαμβάνει μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες), καθώς και ανόργανα και οργανικά συστατικά, τα οποία είτε ανήκουν στην ίδια τη σύσταση του εδάφους, είτε εκκρίνονται από τη ρίζα του φυτού και από τους μικροοργανισμούς που διαβιούν στη ριζόσφαιρα. Οι βασικές δομές οι οποίες απαρτίζουν τη ριζόσφαιρα είναι τρεις: (i) το έδαφος της ριζόσφαιρας, το

οποίο επηρεάζεται από τα ριζικά εκκρίματα, βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη ρίζα και εκτείνεται από την επιφάνεια της ρίζας (rhizoplane) μέχρι το έδαφος (bulk soil), (ii) το επιφανειακό στρώμα της ρίζας (rhizoplane), το οποίο αποτελεί τη ζώνη η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη ρίζα και περιλαμβάνει την επιδερμίδα της ρίζας και το κολλώδες στρώμα (mucilage) και (iii) το εσωτερικό τμήμα της ρίζας (endorhizosphere) που περιλαμβάνει δομές όπως ο φλοιός και η ενδοδερμίδα (Azcón-Aguilar et al., 2005; Krishnaraj and Pasha, 2017).

Η περιοχή της ριζόσφαιρας χαρακτηρίζεται από έντονη μικροβιακή δραστηριότητα (Bakker et al., 2013; Berendsen et al., 2012; Berg et al., 2016), η οποία οφείλεται στην έκκριση ουσιών χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους από τις ρίζες των φυτών (Bais et al., 2006; Hartmann et al., 2008; Walker et al., 2003). Υπολογίζεται ότι περίπου 10^9 - 10^{11} βακτηριακά κύτταρα αποικίζουν ένα γραμμάριο ρίζας (Berg et al., 2016). Οι ριζικές εκκρίσεις επιδρούν ποικιλοτρόπως στο χημειοτακτισμό των βακτηρίων. Παρέχουν ένα περιβάλλον πλούσιο σε αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, φαινολικά, πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες και με αυτό τον τρόπο προσελκύουν ή απωθούν διαφορετικά είδη μικροοργανισμών με ποικίλες επιδράσεις στο φυτό (Bais et al., 2006; Haichar et al., 2008). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η έκκριση ισοφλαβονών από τις ρίζες του ψυχανθούς σόγια, οι οποίες προσελκύουν το συμβιωτικό βακτήριο *Bradyrhizobium japonicum* και το παθογόνο *Phytophthora sojae* (Morris et al., 1998). Οι εκκρίσεις των ριζών διαφέρουν μεταξύ των φυτών και επηρεάζουν το μικροβίωμα που τις περιβάλλει (Haichar et al., 2008). Περίπου το 5-21% του φωτοσυνθετικά παραγόμενου άνθρακα εκκρίνεται στη ριζόσφαιρα και αποτελεί πόλο έλξης για μία πληθώρα μικροοργανισμών, οι οποίοι συμβάλλουν στη δόμηση της μικροβιώματος που βρίσκεται σε επαφή με τη ρίζα του φυτού (Marschner, 2012).



Εικόνα 2. Αλληλεπιδράσεις φυτού και μικροοργανισμών στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Οι ριζικές εκκρίσεις δημιουργούν ένα περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικές ουσίες, οι οποίες λειτουργούν σαν χημικά σήματα, προσελκύοντας και απωθώντας διαφορετικούς τύπους μικροοργανισμών (Chagas et al., 2018).

Διαφορετικά γένη βακτηρίων αποικίζουν την περιοχή της ριζόσφαιρας συμβάλλοντας στη ροή των θρεπτικών συστατικών καθιστώντας το έδαφος κατάλληλο για γεωργική καλλιέργεια. Τα βακτήρια τα οποία αποικίζουν τη ριζόσφαιρα και παρουσιάζουν θετική αλληλεπίδραση με το φυτό ονομάζονται «βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών» (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) (Kloepper and Schroth, 1978). Δύο είναι οι βασικές κατηγορίες PGPB και διαχωρίζονται σύμφωνα με το τμήμα του φυτού το οποίο αποικίζουν. Τα PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) εντοπίζονται στη ριζόσφαιρα, στην επιφάνεια των ριζών, καθώς και 1 mm από την επιφάνεια της ρίζας, μία περιοχή η οποία ονομάζεται ριζόστρωμα (rhizosphere). Η δεύτερη κατηγορία PGPB περιλαμβάνει βακτήρια τα οποία εντοπίζονται στο εσωτερικό του φυτού και ονομάζονται ενδοφυτικά (endophytic) (Figueiredo et al., 2010; Lacava and Azevedo, 2013). Έρευνες έχουν αποδείξει την ύπαρξη PGPB σε φυμάτια ψυχανθών, όπου δρουν ενισχύοντας την ικανότητα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (N-fixing bacteria) να επιτελέσουν το έργο τους με επιτυχία (Antoun et al., 1998; Korir et al., 2017; Noel et al., 1996; Sturz et al., 2000; Subramanian, 2015).

Ο όρος PGPR χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Kloepper και Schroth το 1978 για το χαρακτηρισμό των ριζοσφαιρικών βακτηρίων τα οποία προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Kloepper and Schroth, 1978). Η παραπάνω ονομασία αντικατέστησε τον όρο «βακτηριακά λιπάσματα», ο οποίος χρησιμοποιούταν από τα τέλη της δεκαετίας του '50 για βακτήρια τα οποία εμβολιάζονταν σε σπόρους και ρίζες φυτών με σκοπό την ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών (Brown, 1974; Burr et al., 1978; Gebgardt, 1958; Mishustin and Naumova, 1962; Naumova et al., 1962). Τα PGPR αποικίζουν τη ριζόσφαιρα και ενισχύουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των φυτών με άμεσους ή έμμεσους μηχανισμούς. Οι άμεσοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν: (i) τη βελτίωση της διαθεσιμότητας κύριων θρεπτικών συστατικών όπως είναι ο φώσφορος και το άζωτο και (ii) την παραγωγή φυτορμονών όπως είναι οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες, οι γιββερελλίνες και το ινδολοξικό οξύ. Επιπλέον, κάποια PGPR έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα του αιθυλενίου στο φυτό, παράγοντας το ένζυμο 1-αμινοκυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικό οξύ (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC) απαμινάση, το οποίο υδρολύει το ACC, το πρόδρομο μόριο του αιθυλενίου, σε αμμωνία και α-κετοβουταρικό οξύ (Glick, 2014). Οι έμμεσοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν: (i) την παραγωγή αντιβιοτικών για την καταστολή παθογόνων μικροοργανισμών του φυτού (ii) την παραγωγή λυτικών ενζύμων, όπως οι χιτρινάσες, οι κυτταρινάσες, πρωτεάσες, λιπάσες, β-1,3 γλουκανάσες, τα οποία έχουν λυτική δράση έναντι παθογόνων μυκήτων, όπως είναι οι : *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora spp.*, *Rhizoctonia solani*, και *Pythium ultimum* (Frankowski et al., 2001; Kim et al., 2007; Ordentlich et al., 1988; Singh et al., 1999) και (iii) την ενίσχυση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (Induced Systemic Resistance, ISR) (Pieterse et al., 2009). Αξιοσημείωτη είναι ωστόσο και η συμβολή των PGPR στην ενίσχυση της αντοχής του φυτού σε συνθήκες αλατότητας και ξηρασίας μέσω της εκδήλωσης της επαγόμενης συστημικής αντοχής (Induced Systemic Tolerance, IST) (Yang et al., 2009).

1.1 Χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών

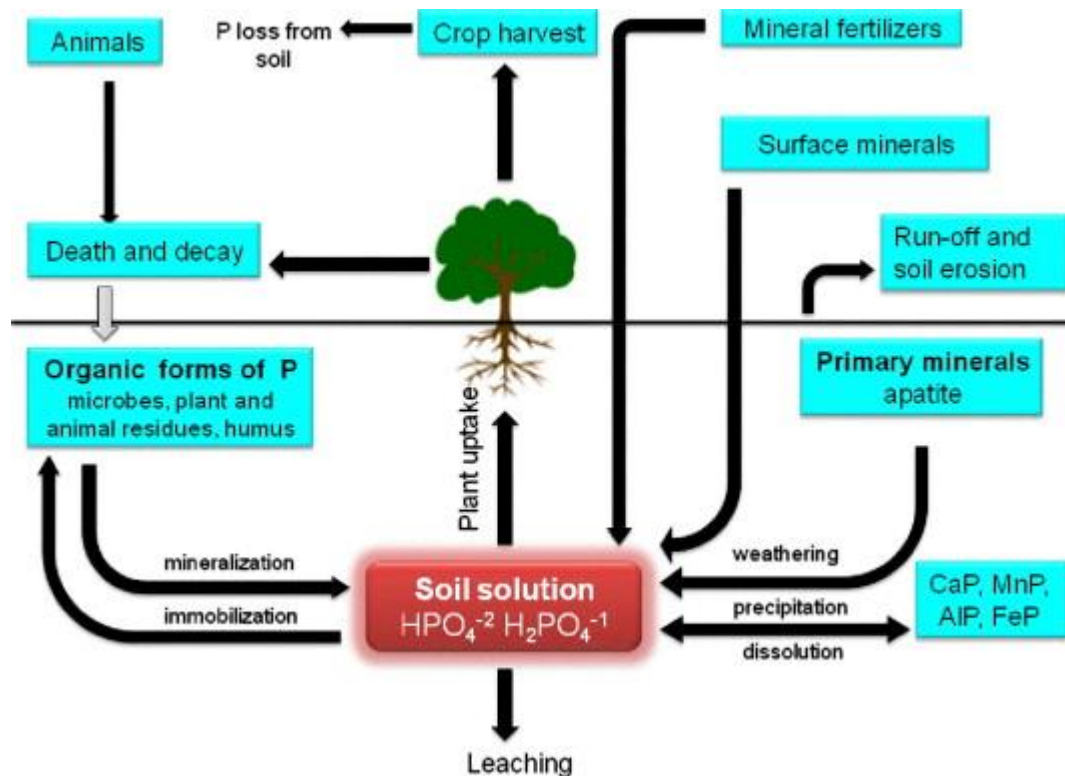
1.1.1 Διαλυτοποίηση Φωσφόρου

Ο φώσφορος P είναι το δεύτερο σημαντικότερο θρεπτικό συστατικό των φυτών, με πρώτο το άζωτο (N₂). Βρίσκεται κυρίως σε μορφή φωσφορικών ιόντων PO₄⁻³ και αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό σημαντικών ενώσεων των φυτικών κυττάρων, όπως είναι τα φωσφορικά σάκχαρα, τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών των φυτικών κυττάρων, το DNA και το RNA. Επιπροσθέτως, ο φώσφορος συμμετέχει σε λειτουργίες της κυτταρικής διαίρεσης, στη μεταφορά ενέργειας μέσω των μορίων φωσφορικής αδενοσίνης (ATP), στη μεταγωγή σημάτων, στη σύνθεση μακρομορίων, στην κυτταρική αναπνοή, στην αζωτοδέσμευση, καθώς και στην παραγωγή ελαίων, σακχάρων και αμύλων (Elser, 2012; Saber et al., 2005; Taiz and Zeiger, 2010). Η τροφопενία φωσφόρου παρεμποδίζει την αύξηση των νεαρών φυτών, οδηγώντας σε παραγωγή ισχών βλαστών, στο θάνατο παλαιότερων φύλλων, καθώς και στην καθυστέρηση της ωρίμανσης του φυτού (Taiz and Zeiger, 2010). Οι φαινοτυπικές αλλαγές της έλλειψης φωσφόρου περιλαμβάνουν τη δημιουργία σκουροπράσινων/πορφυρών φύλλων, λόγω περίσσειας ανθοκυανινών καθώς και στη δημιουργία νεκρωτικών κηλίδων στην επιφάνεια των φύλλων (Taiz and Zeiger, 2010).

Οι φωσφορικές ενώσεις του εδάφους, κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: (i) ανόργανες ενώσεις (ii) οργανικές ενώσεις του εδαφικού χούμου (iii) οργανικές και ανόργανες

φωσφορικές ενώσεις, οι οποίες σχετίζονται με κύτταρα ζωντανής ύλης. Τα φωσφορικά (HPO_4^{-2}) του εδάφους απορροφώνται από τις ρίζες των φυτών μέσω ενός συμμεταφορέα H^+ - HPO_4^{-2} και ενσωματώνονται σε οργανικές ενώσεις του κυττάρου. Δύο είναι οι κύριες αφομοιώσιμες μορφές του φωσφόρου: το φωσφορικό οξύ (HPO_4^{-2}) και το δισόξινο φωσφορικό (HPO_4^-) (Glass, 1989). Η κίνηση του φωσφόρου στο έδαφος περιλαμβάνει διαδικασίες διάχυσης και μαζικής ροής, με τη διάχυση να αποτελεί το σημαντικότερο μηχανισμό μετακίνησης φωσφόρου προερχόμενου από λίπανση (Barber et al., 1963).

Ο φωσφόρος συνιστά το 0,2% της ξηρής μάζας του φυτού και προσλαμβάνεται από το εδαφικό διάλυμα σε μορφή φωσφορικών ανιόντων (Alori et al., 2017; Yadav et al., 2011). Ωστόσο, σημαντική είναι η ποσότητα φωσφόρου που βρίσκεται σε αδιάλυτη μορφή. Ενδεικτικά, η περιεκτικότητα του εδάφους σε φωσφόρο είναι 0.05 % w/w, εκ των οποίων μόνο το 0.1 % βρίσκεται σε αφομοιώσιμη μορφή (Zhu et al., 2011). Τα ανιόντα φωσφόρου καθίστανται αδιάλυτα εξαιτίας της υψηλής δραστηριότητάς τους, η οποία διευκολύνει τη στερεοποίησή τους με κατιόντα αβεστίου, μαγνησίου, σιδήρου και αλουμινίου μέσω της διαδικασίας της κατακρήμνισης (Ezawa et al., 2002). Βασικοί παράγοντες αφομοίωσης φωσφόρου αποτελούν το pH και η σύσταση του εδάφους σε ιόντα αλάτων μετάλλων. Σε όξινα εδάφη ($\text{pH} < 7$), τα ανιόντα φωσφόρου σταθεροποιούνται με ιόντα αλουμινίου Al^{3+} (Αργίλιο) και σιδήρου Fe^{3+} , των οποίων η ποσότητα αυξάνεται με την οξίνιση του pH. Σε αλκαλικά, ασβεστώδη εδάφη ($\text{pH} > 7$), τα ανιόντα φωσφόρου αντιδρούν με τα κατιόντα ασβεστίου Ca^{3+} . Το αποτέλεσμα είναι, ο σχηματισμός μη διαλυτών στερεών ιζημάτων φωσφορικού άλατος (Gyaneshwar et al., 1999; Hao et al., 2002; Holford, 1997). Κύρια πηγή οργανικού φωσφόρου στο έδαφος, αποτελούν οργανικές ενώσεις υπό μορφή εξαφωσφορικής ινοσιτόλης IP6 (φυτικό οξύ). Η IP6 διασπάται από το ένζυμο φυτάση, το οποίο παράγεται σε χαμηλές ποσότητες από τις ρίζες του φυτού. Οι ποσότητες αυτές δεν επαρκούν για τη διάσπαση της IP6, έτσι, το φυτό αδυνατεί να χρησιμοποιήσει αυτή την πηγή φωσφόρου (Rodríguez and Fraga, 1999). Εναλλακτικές πηγές φωσφόρου στο έδαφος, αποτελούν οι φωσφομονοεστέρες, φωσφοδιεστέρες, φωσφολιπίδια, νουκλεϊκά οξέα, φωσφοτριεστέρες, ξενοβιοτικά φωσφονικά (xenobiotic phosphonates) και φωσφορικά προερχόμενα από εξωγενείς πηγές, όπως είναι τα εντομοκτόνα, τα απορρυπαντικά, τα αντιβιοτικά, τα οποία φέρουν σημαντικές ποσότητες φωσφορικών (Rodríguez and Fraga, 1999).



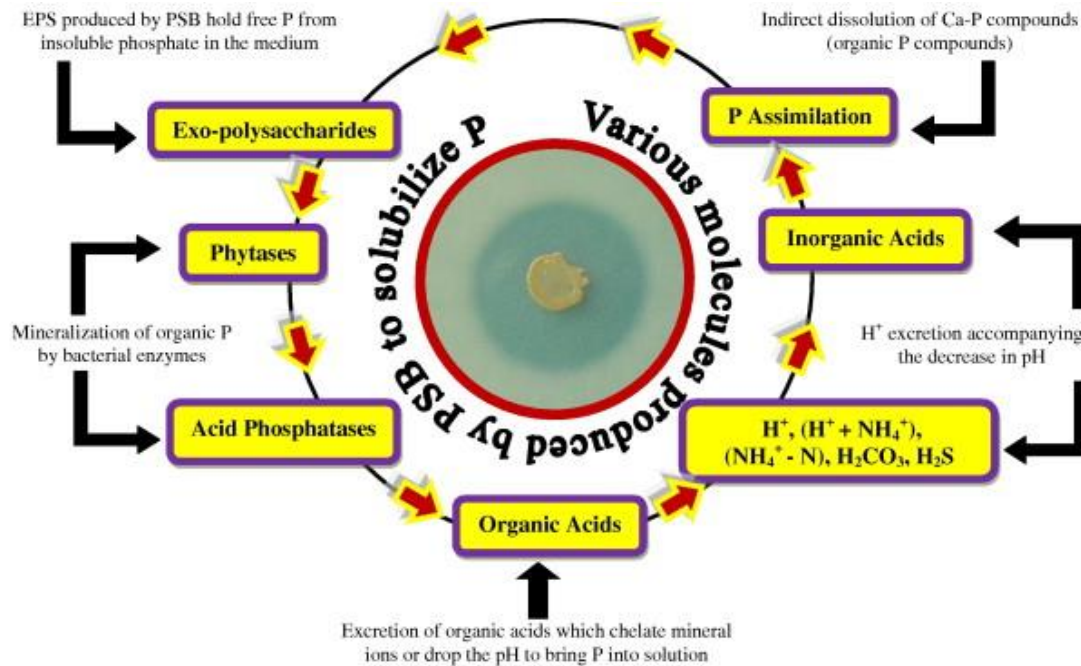
Εικόνα 3. Οι οδοί που ακολουθεί ο φώσφορος (P) στο έδαφος (Ahemad and Kibret, 2013).

Σημαντικός πληθυσμός των μικροοργανισμών του εδάφους, συμβάλλουν στη διαλυτοποίηση/ορυκτοποίηση του φωσφόρου καθιστώντας τον αφομοιώσιμο (Tarafdar and Claassen, 1988). Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ιδιότητα αυτή, αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως μικροοργανισμοί διαλυτοποίησης φωσφόρου (Phosphate Solubilizing Microorganisms, PSM) και περιλαμβάνουν, μύκητες, βακτήρια και ακτινομύκητες (Zhu et al., 2011). Η δράση των μικροοργανισμών με ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές και εδαφικές συνθήκες, από την κατάσταση του φυτού, καθώς και από το είδος των βακτηριακών στελεχών που αποικίζουν το εδαφικό διάλυμα (Gurta et al., 2015). Οι PSM εκτός από την ικανότητά τους να παρέχουν φώσφορο στο φυτό, επηρεάζουν ευνοϊκά την ανάπτυξή του με μία σειρά μηχανισμών. Παρέχουν στο φυτό θρεπτικά συστατικά, όπως το άζωτο N_2 , συμβάλλουν στην αύξηση της έκκρισης φυτοορμονών (ινδολοξικό οξύ, γιβεβερελικό οξύ), παρέχουν προστασία έναντι παθογόνων μικροοργανισμών του εδάφους, αυξάνουν την έκκριση ορισμένων ενζύμων κ. α. (Cassan et al., 2009; Kanamura et al., 2013). Οι μικροοργανισμοί αυτοί, επομένως, παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και μπορεί να λειτουργήσουν ως χρήσιμα εργαλεία για τη βελτίωση των καλλιεργειών με φιλικούς τρόπους προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο.

Με τη δράση των PSM, οι αδιάλυτες συμπλοκοποιημένες μορφές του φωσφόρου, το φωσφορικό ασβέστιο $Ca_3(PO_4)_2$, το φωσφορικό αργίλιο Al_3PO_4 και ο φωσφορικός σίδηρος Fe_3PO_4 μετατρέπονται σε διαλυτές μορφές. Οι μηχανισμοί δράσης των μικροοργανισμών αυτών είναι άμεσα εξαρτώμενοι από διεργασίες του κύκλου του φωσφόρου που επηρεάζουν τη συγκέντρωσή του στο έδαφος. Οι διεργασίες αυτές περιλαμβάνουν επιγραμματικά: (i) τη διάλυση-κατακρήμιση (ισορροπία ορυκτών) (ii) απορρόφηση-έκκριση (αλληλεπίδραση

μεταξύ φωσφόρου στο εδαφικό διάλυμα και σε στερεές επιφάνειες του εδάφους) (iii) ορυκτοποίηση-κινητοποίηση (Sims and Pierzynski, 2005).

Δύο από τους μηχανισμούς διαλυτοποίησης του φωσφόρου είναι η έκκριση οργανικών οξέων, καθώς και η ορυκτοποίηση οργανικών φωσφορικών ενώσεων, υπό την ενζυμική δράση φωσφατασών και φυτασών. Το δυναμικό της διαλυτοποίησης του φωσφόρου εξαρτάται από το είδος των οργανικών οξέων που εκκρίνονται στο μέσο, καθώς και από τη συγκέντρωσή τους. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που προτείνουν διαλυτοποίηση φωσφόρου, χωρίς τη συμμετοχή οργανικών οξέων.



Εικόνα 4. Ποικιλία οργανικών και ανόργανων ενώσεων που εκκρίνονται από τους PSM και είναι υπεύθυνες για τη διαλυτοποίηση του φωσφόρου στο έδαφος (Ahemad and Kibret, 2013).

Διαλυτοποίηση Ανόργανου Φωσφόρου

Ο ανόργανος φώσφορος του εδάφους διαλυτοποιείται με την απελευθέρωση διαφόρων τύπων οργανικών οξέων, από μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι κύριοι τύποι οργανικών οξέων είναι το γλουκονικό και το κετογλουκονικό οξύ (Deubel et al., 2000; Goldstein, 1995; Sharma et al., 2011). Οι καρβοξυλικές και υδροξυλικές ομάδες των οργανικών οξέων προσδέονται κατιόντα ασβεστίου, σιδήρου και αργιλίου (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) και απελευθερώνουν πρωτόνια (H^+) στον περιβάλλοντα εδαφικό χώρο (Khosro, 2012; Kromblekou and Tabatabai, 1994). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη απελευθέρωση φωσφορικών ανιόντων και η μείωση του pH, εξαιτίας των H^+ που απελευθερώνονται (Khan et al., 2007). Μείωση του pH παρατηρείται επίσης, με την κυτταρική αναπνοή, μέσω της ανταλλαγής αερίων O_2/CO_2 , μία διαδικασία η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση H^+ (Sharma et al., 2011). Η απελευθέρωση ανόργανων οξέων (θειικό, το νιτρικό και το καρβονικό οξύ) από τους PSM αποτελεί έναν επιπλέον μηχανισμό διαλυτοποίησης (Reyes et al., 2001). Ωστόσο, διατηρώντας σταθερό pH τα οργανικά οξέα αποδεικνύονται πιο αποτελεσματικά στη δράση τους (Kim et al., 1997). Φωσφορικά ανιόντα προερχόμενα από υδροξυαπατίτη

[Ca₅(PO₄)₃(OH)] διαλυτοποιούνται επιτυχώς από το υδροχλωρικό οξύ (HCL) (Goldstein, 1994; Sperber, 1958; Villegas and Fortin, 2011).

Η απελευθέρωση πρωτονίων με τη δέσμευση NH₄⁺ αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο διαλυτοποίησης φωσφόρου, απουσία παραγωγής οργανικών οξέων (Illmer et al., 1995; Sharan et al., 2008). Μελέτη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* sp. απέδειξε δυνατότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου, απουσία παραγωγής οργανικών οξέων (Illmer et al., 1995). Επιπροσθέτως, η παραγωγή υδρόθειου (H₂S) συμβάλλει στη διαλυτοποίηση φωσφόρου. Όταν το υδρόθειο αντιδρά με το φωσφορικό σίδηρο, αποδίδεται θειικός σίδηρος, με ταυτόχρονη απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων (Swaby and Sperder, 1958). Η παραγωγή σιδηροφόρων, επίσης, συμβάλλει στην απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων. Τα σιδηροφόρα είναι χηλικοί παράγοντες, οι οποίοι δεσμεύουν το σίδηρο από τα φωσφορικά άλατα του εδάφους απελευθερώνοντας φωσφορικά ανιόντα σε αξιοποιήσιμη μορφή από τα φυτά (Campbell and Eik, 2002; Hamdali et al., 2008).

Διαλυτοποίηση Οργανικού Φωσφόρου

Η διαλυτοποίηση του οργανικού φωσφόρου πραγματοποιείται κυρίως, με την απελευθέρωση ενζύμων από τους PSM. Τα ένζυμα αυτά είναι όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες, φυτάσες, φωσφονικά και C-P λυάσες (Maougal et al., 2014; Tarafdar and Claassen, 1988; Yadav and Tarafdar, 2003). Οι φωσφατάσες είναι μη ειδικά ένζυμα, τα οποία εκκρίνονται στο εξωτερικό του κυττάρου (εξω-ένζυμα) και χρησιμοποιούν τον οργανικό φωσφόρο ως υπόστρωμα για τη μετατροπή του σε ανόργανη μορφή. Οι μη ειδικές όξινες φωσφατάσες (non-specific acid phosphatases, NSAPs) αποτελούν το κύριο ένζυμο ορυκτοποίησης του εδαφικού οργανικού φωσφόρου. Καταλύουν την απελευθέρωση ανόργανου φωσφόρου από οργανικές ενώσεις, όπως η εξαφωσφορική ινοσιτόλη (Tarafdar and Jungk, 1987). Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει αποφωσφορυλίωση του φωσφοεστερικού ή φωσφοανυδριτικού δεσμού των οργανικών ενώσεων. Μία ενδιαφέρουσα διαδικασία ορυκτοποίησης οργανικού φωσφόρου αποτελεί η αποδόμηση του φυτικού οξέος με τη χρήση του ενζύμου φυτάση (Maougal et al., 2014). Η αδυναμία των φυτών να προσλάβουν ανόργανο φωσφόρο από το φυτικό οξύ, αποδεικνύεται και από μελέτη της ανάπτυξης του φυτού *Arabidopsis* υπό την παροχή φυτικού ως πηγή οργανικού φωσφόρου. Η ανάπτυξη του φυτού βελτιώθηκε σημαντικά, έπειτα από τη γενετική τροποποίησή του με το γονίδιο της φυτάσης (*phyA*), προερχόμενο από το μύκητα *Aspergillus niger* (Richardson, 2001).

1.1.2 Δέσμευση Ατμοσφαιρικού Αζώτου

Το άζωτο N₂ (N≡N) αποτελεί το σημαντικότερο θρεπτικό συστατικό των φυτών, καθώς αποτελεί δομικό στοιχείο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων. Η αφομοίωση του αζώτου από τα φυτά απαιτεί την πραγματοποίηση μιας υψηλής ενεργειακά αντίδρασης, κατά την οποία διασπάται ο τριπλός ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα σε δύο άτομα αζώτου (N≡N) προς παραγωγή αμμωνίας (NH₃) ή νιτρικών ιόντων (NO₃⁻). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αζωτοδέσμευση (nitrogen fixation, NF) και συντελείται με βιομηχανικές και φυσικές διεργασίες.

Τρεις είναι οι βασικές φυσικές διεργασίες δέσμευσης αζώτου και περιλαμβάνουν: τις αστραπές, οι οποίες ευθύνονται για το 8% του συνολικού δεσμευόμενου αζώτου, οι

φωτοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες ευθύνονται για το 2% και ακολουθεί η βιολογική δέσμευση αζώτου, η οποία ευθύνεται για το 90% του συνολικά δεσμευόμενου αζώτου. Συνολικά, από τις φυσικές διεργασίες δεσμεύονται ετησίως περίπου 190×10^{12} g αζώτου (Schlesinger and Bernhardt, 2013).

Η βιολογική αζωτοδέσμευση τελείται από βακτήρια και κυανοπράσινα φύκη (κυανοβακτήρια), τα οποία ανάγουν το ατμοσφαιρικό άζωτο N_2 σε αμμωνία (NH_3) (Franche et al., 2009; Newton, 2000). Όταν διαλυθεί η αμμωνία στο νερό, σχηματίζει αμμώνιο (NH_4^+). Οι αζωτοδεσμευτικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι είτε ελεύθερα διαβιούντες μικροοργανισμοί, είτε σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με ανώτερα φυτά. Οι συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών και φυτών ξενιστών στηρίζονται στην ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών, κατά την οποία οι προκαρυώτες προσφέρουν άζωτο στον ξενιστή και προσλαμβάνουν από αυτόν υδατάνθρακες και άλλα θρεπτικά στοιχεία (Franche et al., 2009). Συμβιωτικές σχέσεις αναπτύσσονται κυρίως μεταξύ αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και ψυχανθών. Ωστόσο, έρευνες έχουν αποδείξει συμβιωτική σχέση μεταξύ ριζοβίων και δημητριακών, καθώς και ριζοβίων με αγρωστώδη φυτά (sugarcane) (Geddes et al., 2015; Oldroyd and Dixon, 2014). Παραδείγματα αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών είναι: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Azoarcus*, *Achromobacter*, *Burkholderia* και *Herbaspirillum* (Babalola, 2010; Pérez-Montaño et al., 2014). Τα ριζόβια, είναι Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικίζουν τη ρίζα του φυτού δημιουργώντας εξειδικευμένες δομές, τα φυμάτια. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, η συμβίωση δεν απαιτεί τη δημιουργία φυματίων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των αγρωστωδών φυτών, οπότε και τα βακτήρια εγκαθίστανται στην εξωτερική επιφάνεια της ζώνης επιμήκυνσης και των ριζικών τριχιδίων της ρίζας (Γαλάτης et al., 2014).

Τα βακτήρια κινούνται βάσει χημειοτακτισμού, οδηγούμενα από τις εκκρίσεις των ριζών των φυτών και προσδένονται σε εκφυόμενα ριζίδια της κύριας ρίζας. Στην περίπτωση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης με δημιουργία φυματίων, ακολουθεί μία σειρά γεγονότων, που οδηγούν στη δημιουργία τους (Gage, 2004). Στο εσωτερικό του φυματίου, τα ριζόβια μετατρέπονται σε βακτηριοειδή και περιβάλλονται από μία περιβακτηριοειδή μεμβράνη. Το φυμάτιο αναπτύσσει ένα ηθμαγγειώδες σύστημα για τη διευκόλυνση της ανταλλαγής δεσμευόμενου αζώτου και θρεπτικών ουσιών, καθώς και μία στιβάδα κυττάρων που αποτρέπει την είσοδο του οξυγόνου O_2 στο εσωτερικό, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση της νιτρογενάσης, το ένζυμο που καταλύει τη βιολογική δέσμευση αζώτου (Olanrewaju et al., 2017). Με το ίδιο τρόπο λειτουργούν και τα ελεύθερα διαβιούντα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα οποία ανεξαρτήτως μορφολογίας, γενετικών χαρακτηριστικών και περιβάλλοντος που αποικίζουν, φέρουν το ένζυμο της νιτρογενάσης (de Souza et al., 2015; Dixon and Kahn, 2004).

1.1.3 Παραγωγή Σιδηροφόρων

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, ζώα, φυτά, μικροοργανισμοί, χρειάζονται σίδηρο για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους. Ο σίδηρος αποτελεί συστατικό των πρωτεϊνών και συμμετέχει σε βασικές διεργασίες όπως είναι η φωτοσύνθεση, η αναπνοή και η αζωτοδέσμευση (Guerinot, 2010; Zuo and Zhang, 2011). Παρά την αφθονία των αποθεμάτων σιδήρου στη φύση, οι μικροοργανισμοί και τα φυτά αδυνατούν να τον αφομοιώσουν

απευθείας από το περιβάλλον. Αυτό συμβαίνει διότι ο σίδηρος είναι διαθέσιμος στην τρισθενή του μορφή (Fe^{+3}), η οποία δημιουργεί αδιάλυτα οξείδια και υδροξείδια, τα οποία δεν μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο και να μεταβολιστούν (Lamanceau et al., 2009). Τα φυτά έχουν αναπτύξει δύο μηχανισμούς για την πρόσληψη του σιδήρου από το έδαφος. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την οξείδωση του εδάφους, η οποία ακολουθείται από την αναγωγή του Fe^{+3} στη δισθενή του μορφή (Fe^{+2}) από μία Fe-χηλική αναγωγάση προσδεσμένη στην κυτταρική μεμβράνη (Altomare and Tringovska, 2011; Guerinot, 2010; Mori, 1999). Στη συνέχεια, ο Fe^{+2} εισάγεται στα ριζικά κύτταρα και χρησιμοποιείται σε διεργασίες του κυττάρου. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την έκκριση φυτοσιδηροφόρων χαμηλού μοριακού βάρους, με στόχο τη διαλυτοποίηση και πρόσδεση του εδαφικού σιδήρου και εν συνεχεία τη μεταφορά του στο εσωτερικό των ριζικών κυττάρων με τη δράση μεμβρανικών πρωτεϊνών (Altomare and Tringovska, 2011; Guerinot, 2010). Οι μηχανισμοί αυτοί, ωστόσο, δεν επαρκούν ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες του φυτού σε σίδηρο, ιδιαίτερα σε ασβεστώδη και αλκαλικά εδάφη (Zuo and Zhang, 2011).

Η εφαρμογή PGPR στο έδαφος, με ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων, θα αποτελούσε μία στρατηγική για την αύξηση της διαθεσιμότητας του σιδήρου σε αφομοιώσιμη μορφή (Neilands, 1995). Η επιβίωση των μυκήτων και των βακτηρίων στο ανταγωνιστικό περιβάλλον της ριζόσφαιρας και η εξασφάλιση επαρκών ποσοτήτων σιδήρου για τη θρέψη τους εξασφαλίζεται με την έκκριση σιδηροφόρων χαμηλού μοριακού βάρους (~400 – 1.000 Da). Τα σιδηροφόρα είναι χηλικοί παράγοντες με υψηλή συγγένεια για το Fe^{+3} ($K_a = 10^{23} - 10^{52}$), με το οποίο δημιουργούν σύμπλοκα (Hider and Kong, 2010; Neilands, 1981). Τα σύμπλοκα αυτά προσλαμβάνονται από ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των βακτηριακών και φυτικών κυττάρων και εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου ο Fe^{+3} ανάγεται σε Fe^{+2} και απελευθερώνεται από το σιδηροφόρο (Glick, 2015).

Τα σιδηροφόρα διαθέτουν τρεις λειτουργικές ομάδες με δύο άτομα οξυγόνου, ή σπανιότερα δύο άτομα αζώτου, τα οποία αποτελούν τα σημεία πρόσδεσης του Fe^{+3} . Ένα σταθερό σύμπλοκο σιδηροφόρου- Fe^{+3} περιλαμβάνει ένα μόριο Fe^{+3} συνδεδεμένο με τρεις λειτουργικές ομάδες ενός σιδηροφόρου. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 500 διαφορετικά σιδηροφόρα, εκ των οποίων γνωστή είναι η δομή των 270 (Hider and Kong, 2010). Τα σιδηροφόρα κατατάσσονται σε διαφορετικές κατηγορίες σύμφωνα με το είδος των λειτουργικών ομάδων που διαθέτουν. Οι τρεις κύριες ομάδες σιδηροφόρων είναι τα σιδηροφόρα: (i) καρβοξυλικού τύπου, (ii) υδροξαμικού τύπου και (iii) κατεχολικού τύπου (Ali and Vidhale, 2013). Οι μύκητες διαθέτουν κυρίως σιδηροφόρα υδροξαμικού τύπου, σε αντίθεση με τα βακτήρια που διαθέτουν σιδηροφόρα κατεχολικού τύπου, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με το Fe^{+3} . Τα σιδηροφόρα των φυτών είναι ευθύγραμμα υδροξυ- και αμινο-υποκατεστημένα ιμινοκαρβοξυλικά οξέα, όπως είναι το μυρικό οξύ και το αβενικό οξύ, με χαμηλή συγγένεια για το Fe^{+3} (Glick, 2015). Παραπάνω από ένα είδος σιδηροφόρων μπορεί να εκκρίνεται από ένα βακτηριακό στέλεχος. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* sp. όπως είναι η *Pseudomonas fluorescens* και η *Pseudomonas aeruginosa* εκκρίνουν δύο βασικά είδη σιδηροφόρων, τις πυρολίνες και τις πυοβερντίνες (Lamont and Martin, 2003; Meyer et al., 2002; Vansuyt et al., 2007). Οι πυρολίνες είναι σιδηροφόρα φαινολικού τύπου με χαμηλή συγγένεια για το Fe^{+3} , ενώ οι πυοβερντίνες διαθέτουν λειτουργικές ομάδες που υπόκεινται σε διαφορετικές κατηγορίες και έχουν τη δυνατότητα να προσδέουν Fe^{+3} με υψηλότερη συγγένεια (Gensberg et al., 1992; Glick, 2015;

Lamont and Martin, 2003; Meyer, 2000). Οι πυοβερντίνες έχουν φθορίζον κιτρινο-πράσινο χρώμα κάτω από υπεριώδες φωτισμό και προσδίδουν στις φθορίζουσες ψευδομονάδες τη χαρακτηριστική τους εμφάνιση (Ringel and Brucer, 2018). Ριζοβακτήρια εκκρίνουν διάφορους τύπους σιδηροφόρων. Ενδεικτικά, η ριζοβακτήρινη παράγεται από το *S. meliloti* (Smith et al., 1985), το *B. japonicum* εκκρίνει σιδηροφόρα κιτρικού τύπου (Guerinot et al., 1990), το *R. leguminosarum* bv. *viciae* παράγει ανθρανλικού τύπου και βιμιμπακτίνη (Dilworth et al., 1998; Rioux et al., 1986), ενώ το *R. leguminosarum* IARI102 απελευθερώνει σιδηροφόρα φαινολικού τύπου (Patel et al., 1988). Μικροοργανισμοί με εξελικτικό πλεονέκτημα στο ανταγωνιστικό περιβάλλον της ριζόσφαιρας είναι εκείνοι που διαθέτουν ποικιλία μεμβρανικών υποδοχέων, ικανών να προσδέσουν διαφορετικά είδη σιδηροφόρων, ενώ παράλληλα εκκρίνουν σιδηροφόρα, τα οποία σπάνια μπορούν να προσδεθούν από άλλους μικροοργανισμούς (Glick, 2015).

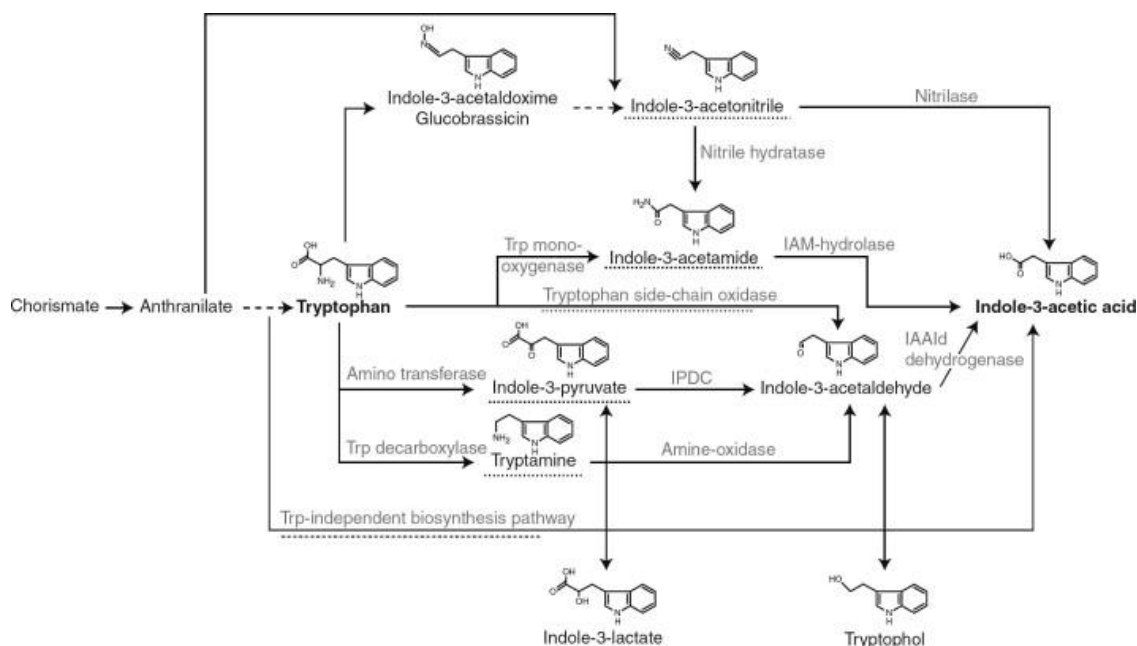
Τα βακτήρια με ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων επάγουν την ανάπτυξη των φυτών με δύο βασικούς τρόπους, με άμεση παραχώρηση σιδήρου στο φυτό για ενδογενή χρήση και με έμμεσο τρόπο, αφαιρώντας το σίδηρο από τη ριζόσφαιρα, μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητά του για τους παθογόνους μικροοργανισμούς του εδάφους (Beneduzi et al., 2012; Kloepper et al., 1980). Τα παραπάνω αποδεικνύονται πειραματικά μέσω διαφορετικών ερευνών. Για παράδειγμα, ο εμβολιασμός αραβόσιτου με PGPB, με ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων, σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, οδήγησε σε αύξηση του ύψους του βλαστού και της ρίζας, καθώς και σε αύξηση του ξηρού βάρους του φυτού συγκριτικά με μη εμβολιασμένα στελέχη φυτών (Sharma and Johri, 2003). Επιπροσθέτως, έχει αποδειχθεί ότι βακτήρια του γένους *Rhizobium*, με ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων, έχουν ανασταλτική δράση έναντι παθογόνων μυκήτων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την αναστολή της δράσης του μύκητα *M. phaseolina* από το βακτηριακό στέλεχος *R. meliloti* (*S. meliloti*) (Arora et al., 2001; Chandra et al., 2007; Chao, 1990).

1.1.4 Παραγωγή Ινδολοξικού Οξέος - IAA

Οι φυτοορμόνες είναι χημικές ενώσεις, οι οποίες βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο φυτό και προάγουν την αύξηση, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων και ιστών. Οι φυτοορμόνες συμβάλλουν στην ομοίωση του φυτού, λειτουργώντας ως μοριακά σήματα για την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για τη βελτιστοποίηση της αύξησης και ανάπτυξης του φυτού. Οι αυξίνες είναι φυτοορμόνες με ικανότητα να επηρεάζουν ποικίλες πτυχές της φυσιολογίας του φυτού, όπως είναι η προώθηση της αύξησης και διαίρεσης των φυτικών κυττάρων, η ικανότητα ανταπόκρισης του βλαστού και της ρίζας στο φως και στη βαρύτητα αντίστοιχα, η διαφοροποίηση του αγγειακού ιστού, η κυτταρική διαίρεση, η αύξηση της ρίζας και η κυριαρχία της κορυφής (Abel and Theologis, 1996; Benjamins and Scheres, 2008; Teale et al., 2006; Tomic et al., 1998). Μέχρι το 1973, ο όρος αυξίνη αποτελούσε συνώνυμο της φυτοορμόνης (Kende and Zeevaart, 1997). Μετέπειτα, ανακαλύφθηκαν και άλλες φυτοορμόνες, όπως οι γιββερελλίνες, οι κυτοκινίνες, το αιθυλένιο, το αμπισικό οξύ και το σαλικυλικό οξύ (Taiz and Zeiger, 2010).

Το Ινδολοξικό οξύ (Indole-3-acetic acid, IAA) είναι μία αυξίνη και αποτελεί τη συχνότερα απαντώμενη φυσική ορμόνη (Bartel, 1997). Το IAA είναι ένα καρβοξυλικό οξύ, το οποίο επηρεάζει ποικίλες διεργασίες του φυτού, όπως είναι η θρέψη και η ανάπτυξή του, η φωτοσύνθεση, η σύνθεση χρωστικών, η βιοσύνθεση μεταβολιτών και η αντοχή σε αβιοτικές

καταπονήσεις (Bartel, 1997). Το IAA παράγεται από φυτά και μικροοργανισμούς και συγκαταλέγεται στους μηχανισμούς δράσης αρκετών PGPB (Etesami et al., 2015; Sraeren and Vanderleyden, 2011). Η Τρυπτοφάνη (Trp) αποτελεί πρόδρομο μόριο του IAA και συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων IAA που παράγονται από ριζοβακτήρια (Carreño-Lopez et al., 2000; Patten and Glick, 2002a; Prinsen et al., 1993). Η βιοσύνθεση IAA στα βακτήρια περιλαμβάνει πέντε μονοπάτια εξαρτώμενα από Trp: (i) το IAM (Indole-3-acetamide, ινδολο-3-ακεταμίδιο), το οποίο χρησιμοποιείται από παθογόνα βακτήρια, όπως είναι τα στελέχη, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *savastanoi* και *Agrobacterium tumefaciens* (Comai and Kosuge, 1982; Liu et al., 1982; Mazzola and White, 1994; White and Ziegler, 1991), αλλά και από PGPB, (ii) το IPA (Indole-3-pyruvic acid, ινδολο-3-πυρουβικό οξύ), το οποίο απαντάται συχνά σε PGPB, όπως είναι τα στελέχη, *Enterobacter cloacae* και *Azospirillum brasilense* (Malhotra and Srivastava, 2007; Ryu and Patten, 2008; Saleh and Glick, 2001), ωστόσο χρησιμοποιείται και από παθογόνα βακτήρια, (iii) το IAN (Indole-3-acetonitrile, ινδολο-3-ακετονιτρίλιο), (iv) το TSO (Tryptophan side chain oxidase, οξειδάση της πλευρικής αλυσίδας της τρυπτοφάνης) και (v) το μονοπάτι της τρυπταμίνης (Ahemad and Kibret, 2013; Sraeren and Vanderleyden, 2011). Επιπλέον, τα βακτήρια χρησιμοποιούν και ένα μονοπάτι μη εξαρτώμενο από την Trp (Ahemad and Kibret, 2013; Sraeren and Vanderleyden, 2011). Η αλληλούχιση γονιδιωμάτων των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas putida* UWA4, *P. fluorescens* SBW25 και *P. putida* F1 μαρτυρούν τη χρήση δύο διαφορετικών μονοπατιών για την παραγωγή, αυτά του IAA του IAM και του IAN (Patten and Glick, 2002a).



Εικόνα 5. Διαγραμματική απεικόνιση των μονοπατιών παραγωγής IAA στα βακτήρια. IAAid: ινδολο-3-ακεταλδεΐδη, IAM: ινδολο-3-ακεταμίδιο, IPDC: ινδολο-3-αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού, Trp: Τρυπτοφάνη (Sraeren et al., 2007).

Η συγκέντρωση του IAA έχει ποικίλες επιδράσεις στη φυσιολογία του φυτού, οι οποίες εξαρτώνται από το είδος του φυτού, το είδος του ιστού στον οποίο επιδρά και από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού. Η ιδανική αναλογία ενδογενούς IAA είναι ~ 5 τάξεις μεγέθους χαμηλότερο επίπεδο για τις ρίζες συγκριτικά με αυτό των βλαστών. Η προσθήκη

εξωγενούς IAA μπορεί να ευνοήσει ή να καταστείλει την ανάπτυξη του φυτού, λόγω υπερσυσσώρευσης (Glick, 2015, 2012). Η εφαρμογή PGPB με ικανότητα παραγωγής IAA, σε ρίζες μοσχευμάτων βατόμουρου και σε ρίζες δέντρων βυσσινιάς προκάλεσε επαγωγή της ανάπτυξης για το πρώτο και αναστολή της ανάπτυξης για το δεύτερο. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή του PGPB, *Pseudomonas putida* GR12-2 (*P. putida* GR12-2) σε φυτά κράμβης και μοσχεύματα ροβίτσας (Patten and Glick, 2002b; Xie et al., 1996). Στην παραπάνω μελέτη, σπόροι κράμβης εμβολιάστηκαν με τον άγριο τύπο του στελέχους *P. putida* GR12-2, και με μεταλλαγμένο τύπο του στελέχους, το οποίο παρουσιάζει αδυναμία παραγωγής IAA. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον άγριο τύπο *P. putida* GR12-2 παρουσίασαν 35 – 50 % μεγαλύτερο μέγεθος ριζών από αυτά που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο τύπο και από εκείνα που δεν εμβολιάστηκαν καθόλου (Patten and Glick, 2002). Από την άλλη πλευρά, μοσχεύματα ροβίτσας τα οποία εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο τύπο του ίδιου στελέχους, το οποίο παρήγαγε υψηλότερες ποσότητες IAA, παρουσίασαν υποανάπτυξη των ριζών (Xie et al., 1996). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευτεί, εάν λάβουμε υπόψη μας τις επιδράσεις του IAA στη φυσιολογία του φυτού. Παράλληλα με την προαγωγή της ανάπτυξης και τον πολλαπλασιασμό των φυτικών κυττάρων, το IAA πυροδοτεί τη μετάφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο της συνθάσης του ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, 1-αμινοκυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικό), οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής ACC και επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης του αιθυλενίου, μία ορμόνη που παρεμποδίζει τη ριζική ανάπτυξη (Abel et al., 1995; Rion and Yang, 1989; Stepanova et al., 2005). Επομένως, ένα βακτήριο με ικανότητα ταυτόχρονης παραγωγής IAA και απαμινάσης του ACC, θα ήταν το καταλληλότερο για την προστασία του φυτού από τις αρνητικές επιδράσεις του αβιοτικού στρες (Gamalero and Glick, 2015; Glick et al., 2007; Sgroj et al., 2009).

Βάσει των παραπάνω, το παραγόμενο από τα βακτήρια της ριζόσφαιρας IAA αυξάνει την επιφάνεια και το μήκος της ρίζας, επιτρέποντας στο φυτό να έχει ευκολότερη πρόσβαση στα θρεπτικά συστατικά του εδάφους (Glick, 2012). Επιπλέον, το βακτηριακό IAA συμβάλλει στη θρέψη του βακτηρίου, καθώς προκαλεί τη χαλάρωση των κυτταρικών τοιχωμάτων των ριζικών φυτικών κυττάρων, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τις ριζικές εκκρίσεις, οι οποίες αποτελούν πηγή θρεπτικών συστατικών για τα ριζοβακτήρια (Glick, 2012). Η δράση του IAA δεν περιορίζεται στα παραπάνω, καθώς έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη δημιουργία φυματίων σε ρίζες ψυχανθών (Mathesius et al., 1998). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εφαρμογή μεταλλαγμένων στελεχών *Bradyrhizobium elkanii*, με ανεπάρκεια παραγωγής IAA σε ρίζες φυτών σόγιας. Τα φυτά τα οποία εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος παρουσίασαν δημιουργία μικρότερου αριθμού φυματίων από τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον άγριο τύπο του στελέχους (Fukuhabara et al., 1994).

1.1.5 Αντοχή στην Αλατότητα

Η αλατότητα του εδάφους αποτελεί μία από τις σημαντικότερες πηγές αβιοτικών καταπονήσεων για τα φυτά. Υπολογίζεται ότι παραπάνω από 900 εκατομμύρια εκτάρια γης παρουσιάζουν πρόβλημα αλατότητας, το οποίο αντιστοιχεί σε 6 % της συνολικής πεδινής έκτασης της Γης και σε 20 % της παγκόσμιας καλλιεργήσιμης έκτασης (Flowers, 2004; Gamalero et al., 2009). Αλάτωση του εδάφους αποτελεί η συσσώρευση υδατοδιαλυτών αλάτων στο εδαφικό διάλυμα και προέρχεται από τις βροχοπτώσεις, τη διάβρωση

πετρωμάτων, την αιολική και υδάτινη διάβρωση, από τη χαμηλή ποιότητα του νερού ποτίσματος, καθώς και από την εισχώρηση θαλάσσιου νερού στο έδαφος (Rengasamy, 2006).

Όταν τα φυτά εκτίθενται σε υψηλή αλατότητα παρουσιάζουν μείωση των ρυθμών ανάπτυξης και φωτοσύνθεσης, παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) και της φυτοορμόνης του αμψισικού οξέος (Bartels and Sunkar, 2005). Τα ιόντα νατρίου που προσλαμβάνονται από τις ρίζες, μεταφέρονται στους βλαστούς, μέσω του φυτικού ξυλώματος και έχουν τη δυνατότητα να επιστρέψουν στη ρίζα μέσω του φλοιώματος (Smith et al., 1980; Tester and Davenport, 2003). Ωστόσο, η ροή μέσω του φλοιώματος είναι μειωμένη, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται υψηλότερες ποσότητες ιόντων νατρίου στο βλαστό. Οι δομές οι οποίες επηρεάζονται λιγότερο από τη συσσώρευση ιόντων νατρίου είναι οι καρποί και οι σπόροι του φυτού, καθώς προσλαμβάνουν τα θρεπτικά τους συστατικά κυρίως από το φλοιώμα (Tester and Davenport, 2003). Η τοξικότητα της αυξημένης συγκέντρωσης των ιόντων νατρίου έγκειται στον ανταγωνισμό που αυτά παρουσιάζουν απέναντι στις θέσεις πρόσδεσης των ιόντων καλίου, προκαλώντας απορρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας (Gamalero et al., 2009).

Τα φυτά έχουν αναπτύξει ορισμένους μηχανισμούς για την αντιμετώπιση της αλατότητας, όπως είναι η επιλεκτική συσσώρευση ή ο αποκλεισμός των ιόντων νατρίου, ο έλεγχος της ποσότητας των ιόντων που προσλαμβάνονται από τις ρίζες και μεταφέρονται στα φύλλα, η διοχέτευση των ιόντων σε όλα τα επίπεδα του φυτού, η σύνθεση προλίνης και τρεχαλόζης, τα οποία αποτελούν συμβατές διαλυτές ουσίες που βοηθούν στην καταπολέμηση της ωσμωτικής πίεσης, η αλλαγή της μεμβρανικής μορφολογίας, η ρύθμιση των επιπέδων των φυτοορμονών, αυξίνης, κυτοκινίνης, αιθυλενίου και η επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως είναι το ένζυμο του υπεροξειδίου της δισμουτάσης και της περοξειδάσης (Khan and Rizvi, 1994; Parida and Das, 2005). Ο εμβολιασμός του φυτού με PGPB που παρουσιάζουν αντοχή στην αλατότητα, προσφέρει ένα επιπλέον, αν όχι το κύριο πλεονέκτημα για την επιβίωσή του. Η συμβολή των PGPB αποδίδεται στο συνδυασμό των μηχανισμών δράσης τους, οι οποίοι περιλαμβάνουν κυρίως, την παραγωγή IAA, κυτοκινίνης, απαμινάσης του ACC, τρεχαλόζης, προλίνης και εξωπολυσακχαριτών (Gamalero et al., 2009; Glick, 2015).

Η παροχή εξωγενούς IAA προάγει την ανάπτυξη του φυτού ακόμη και υπό την παρουσία παρεμποδιστικών παραγόντων. Ο εμβολιασμός φυτών *Medicago truncatula* με ένα μετασηματισμένο στέλεχος *Synorhizobium meliloti*, με αυξημένη ικανότητα παραγωγής IAA κατέστησε τα φυτά ανθεκτικά στην αλατότητα του εδάφους (Bianco and Defez, 2009). Ωστόσο, η αυξημένη παραγωγή IAA οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα τρεχαλόζης στο φυτό. Η τρεχαλόζη είναι ένα σάκχαρο το οποίο προστατεύει τα φυτά από το ωσμωτικό στρες. Επομένως, δεν είναι ξεκάθαρο εάν η παραγωγή IAA από το *S. meliloti* ευνόησε άμεσα ή έμμεσα, μέσω της παραγωγής τρεχαλόζης, την άμυνα του φυτού (Bianco and Defez, 2009). Μία διαφορετική επιστημονική έρευνα αποδεικνύει τα οφέλη του εμβολιασμού του φυτού *Silybum marianum* με το ριζοβακτήριο *Pseudomonas extremorientalis*, το οποίο παρουσιάζει ικανότητα παραγωγής IAA. Σε συνθήκες αλατότητας, παρατηρήθηκε επιμήκυνση της ρίζας και του βλαστού, καθώς και αύξηση του ξηρού βάρους των φυτών τα οποία είχαν εμβολιαστεί με το *P. extremorientalis* (Egamberdieva et al., 2013).

Σε συνθήκες αβιοτικού στρες αυξάνεται η ποσότητα του αιθυλενίου στο φυτό, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των φυτικών κυττάρων (Taiz and Zeiger, 2010). Η παρουσία ενός βακτηρίου με ικανότητα παραγωγής απαμινάσης του ACC συμβάλλει στην ανακούφιση του φυτικού οργανισμού από τις υψηλές συγκεντρώσεις αιθυλενίου. Ορισμένες ποσότητες ACC απορροφώνται από το μικροοργανισμό και διασπώνται σε αμμωνία και α-κετοβουταρικό οξύ, μειώνοντας τη συγκέντρωση του ACC και ως εκ τούτου και του αιθυλενίου (Glick, 2004). Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, ξηρασίας και υψηλής θερμοκρασίας, φυτά ροδίτσας (*Vigna radiata*) εμβολιάστηκαν με στελέχη *Bradyrhizobium* sp., καθώς και με PGPB με ικανότητα παραγωγής απαμινάσης του ACC, *Enterobacter* sp. ACC1, *Enterobacter* sp. ACC2, και *Chryseobacterium* sp. ACC3. Τα φυτά τα οποία εμβολιάστηκαν παρουσίασαν υψηλότερο ξηρό βάρος φυτού από τα μη εμβολιασμένα (Tittabutr et al., 2013).

Η τρεχαλόζη αποτελεί έναν μη αναγωγικό δισακχαρίτη, ο οποίος παράγεται από βακτήρια, μύκητες, ασπώνδυλα και φυτά (Elbein et al., 2003). Λειτουργεί ως προστατευτικός παράγοντας για το φυτό σε συνθήκες ξηρασίας, αλατότητας και υψηλής θερμοκρασία (Glick, 2012). Η τρεχαλόζη είναι ένα σταθερό μόριο, το οποίο μετασχηματίζεται σε μορφή γέλης αντικαθιστώντας το νερό όταν τα κύτταρα αφυδατώνονται, μειώνοντας έτσι τις επιπτώσεις της ξηρασίας και της αλατότητας (Crowe et al., 1984). Επομένως, η εφαρμογή γενετικά τροποποιημένων PGPB, ώστε να παράγουν μεγάλες ποσότητες τρεχαλόζης, στα φυτά αποτελεί μία τεχνική αντιμετώπισης της υψηλής αλατότητας. Το συμβιωτικό βακτήριο *Rhizobium etlii* τροποποιήθηκε γενετικά για να παράγει υψηλές ποσότητες τρεχαλόζης και έπειτα χορηγήθηκε σε φυτά φασολιού, τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ξηρασίας και αλατότητας. Το αποτέλεσμα ήταν τα εμβολιασμένα φυτά να παρουσιάσουν υψηλότερο αριθμό φυματίων και υψηλότερη βιομάζα, από τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον άγριο τύπο του στελέχους (Suárez et al., 2008).

Οι εξωπολυσακχαρίτες (exopolysaccharides, EPS) είναι μόρια υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία εκκρίνονται από ένα εύρος μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των βακτηρίων. Το στρώμα πολυσακχαριτών στην εξωτερική επιφάνεια ορισμένων PGPB συμβάλλει στη δημιουργία βιοϋμενίων και στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνειες, όπως είναι οι ρίζες των φυτών. Επιπλέον, συμβάλλει στην προστασία του βακτηρίου σε συνθήκες αλατότητας, καθώς δημιουργεί έναν επιπλέον φραγμό στην είσοδο των ιόντων νατρίου στο εσωτερικό του βακτηρίου (Timmusk and Wagner, 1999; Vardharajula et al., 2011).

1.1.6 Ομαδική κινητικότητα

Η ικανότητα των βακτηρίων να μετακινούνται από το ένα μέρος στο άλλο ονομάζεται ομαδική κινητικότητα και αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα επιβίωσης, καθώς επιτρέπει στα βακτήρια να δημιουργούν συμβιωτικές ή ακόμη και παθογόνες αλληλεπιδράσεις με ζώα και φυτά. Επιπροσθέτως, συμβάλλει στην αύξηση της αποδοτικότητας των βακτηρίων κατά την αναζήτηση τροφής, στην αποφυγή τοξικών ουσιών, στη μετακίνηση σε πιο ευνοϊκά για την επιβίωσή τους περιβάλλοντα, καθώς και στον αποικισμό του καταλληλότερου ξενιστή (Ottemann and Miller, 1997).

Οι βασικοί τύποι ομαδικής κινητικότητας βακτηρίων είναι πέντε και κατηγοριοποιούνται βάσει των επιφανειακών αποφύσεων ή εσωτερικών δομών που δημιουργούνται κατά τη μετακίνηση (Henrichsen, 1972; Jarrell and McBride, 2008). Ένα βακτηριακό στέλεχος μπορεί να χρησιμοποιεί παραπάνω από έναν τύπο μετακίνησης. Η ομαδική κίνηση (swarming) περιλαμβάνει την επιφανειακή πολυκύτταρη κίνηση, η οποία τροφοδοτείται από την περιστροφική κίνηση των μαστιγίων (Harshey, 1994; Kearns, 2010). Για τη διεκπεραίωση της ομαδικής κίνησης απαιτείται η αύξηση στη βιοσύνθεση των μαστιγίων και οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις (Kearns, 2010). Τα κινούμενα βακτήρια σχηματίζουν ζώνες-σχεδίες και όσα κύτταρα διαφεύγουν από τη σχεδία χάνουν την κινητικότητά τους. Η κολυμβητική κίνηση (swimming) αναφέρεται στην ικανότητα των βακτηρίων να μετακινούνται ως μεμονωμένες δομές σε υγρό περιβάλλον, με τη βοήθεια μαστιγίων (Jarrell and McBride, 2008). Η κίνηση μέσω συσπάσεων (twitching) περιλαμβάνει την επιμήκυνση και βράχυνση των τριχιδίων (pili) τύπου IV (Henrichsen, 1983; Kearns, 2010; Wall and Kaiser, 1999). Η μετακίνηση ολίσθησης (gliding) η οποία περιλαμβάνει την αναδιάταξη του σχήματος των κυττάρων, εξαρτάται από ενδογενείς κινητήριες δυνάμεις, από την προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους και με την επιφάνεια αλληλεπίδρασης και από την έκκριση επιφανειοδραστικών ουσιών από τους πόλους των κυττάρων (Harshey, 2003). Η μετακίνηση με ολίσθηση (sliding) είναι μία παθητική διαδικασία, κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αποτελεί την κινητήρια δύναμη που μετατοπίζει τα κύτταρα περιφερειακά της κυτταρικής μάζας (Henrichsen, 1972). Παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η ομαδική κινητικότητα, αποτελεί μία ενεργοβόρα διαδικασία και εξαρτάται από την υγρασία της επιφάνειας (Ottemann and Miller, 1997). Η απώλεια της ικανότητας μετακίνησης μπορεί να θεωρηθεί ως ένας προσαρμοστικός μηχανισμός των βακτηρίων ώστε να επιβιώσουν σε δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες. Κατά την αλληλεπίδραση των φυτών με τα βακτήρια, η ικανότητα μετακίνησης των βακτηρίων συμβάλλει στην αποίκιση της εσωτερικής ή εξωτερικής επιφάνειας των φυτών, στη δημιουργία βιοϋμενίων, στη λοιμογόνο δράση τους, καθώς και σε προστατευτικές λειτουργίες των βακτηρίων (Barak et al., 2009; Harshey, 2003; Ottemann and Miller, 1997).

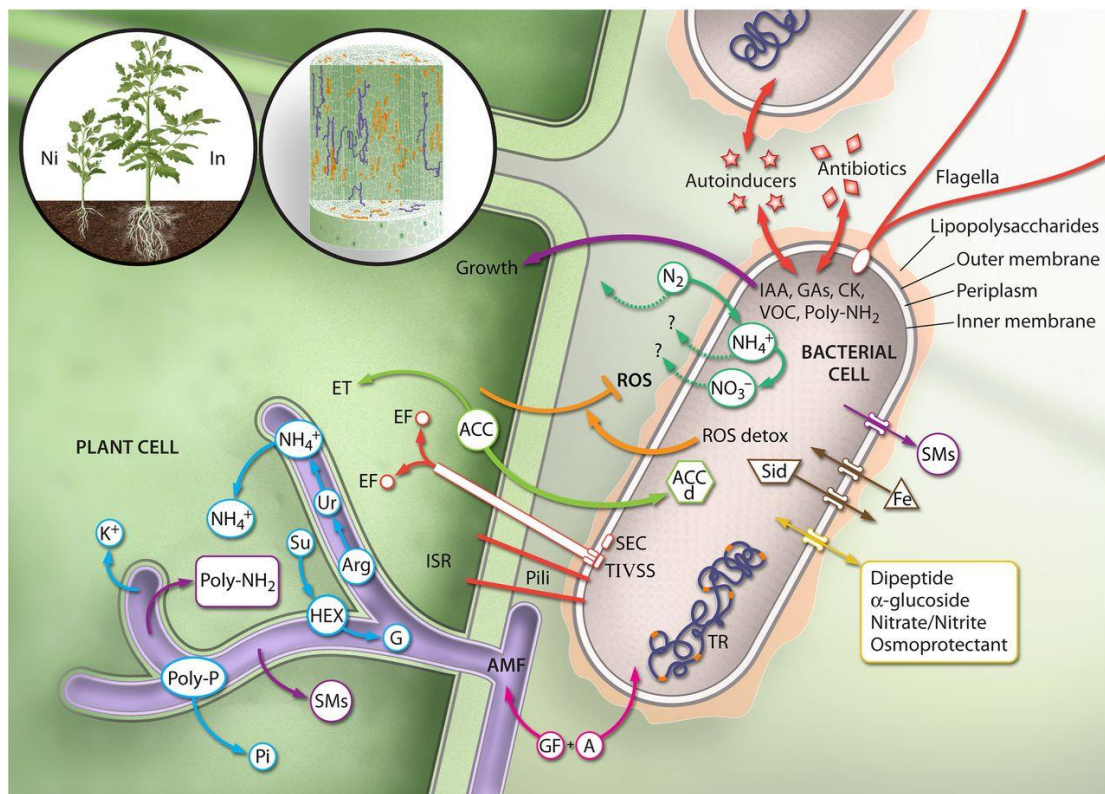
1.2 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

Τα φυτά αποτελούν ξενιστές διαφόρων τύπων μικροβιακών ενδοφύτων, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των μυκήτων, των αρχαίων και ορισμένων μονοκύτταρων οργανισμών, όπως τα φύκη (Trémouillaux-Guiller et al., 2002) και τις αμοιβάδες (Muller and Doring, 2009). Ο όρος ενδόφυτα, ως "*Endophytæ*" χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από το Γερμανό Heinrich Friedrich Link, το 1809, για το χαρακτηρισμό μίας ξεχωριστής ομάδας μερικώς παρασιτικών μυκήτων, που αποικίζουν τα φυτά (Hodkinson et al., 2019). Από τότε και έπειτα, έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί ορισμοί για την περιγραφή των ενδοφυτικών οργανισμών. Ο Orlando Petrini, το 1991 περιέγραψε τα ενδόφυτα ως το σύνολο των οργανισμών που αποικίζουν την επιφάνεια του φυτού και οι οποίοι σε κάποιο στάδιο του κύκλου ζωής τους μπορούν να αποικίσουν τους εσωτερικούς φυτικούς ιστούς χωρίς να προκαλέσουν εμφανή βλάβη στον ξενιστή τους (Petrini, 1991). Το 1997, ο Hallman και οι συνάδελφοί του έστρεψαν την προσοχή τους στα ενδοφυτικά βακτήρια, τα οποία περιέγραψαν ως εκείνα τα βακτήρια τα οποία μπορούν να απομονωθούν από επιφανειακά αποστειρωμένους φυτικούς ιστούς ή από το εσωτερικό του φυτού και τα οποία δεν προκαλούν βλάβη σε αυτό (Hallmann et al., 1997). Ωστόσο, ο Wennstrom (1994) ήταν ο

πρώτος που αμφισβήτησε την προσέγγιση των ενδοφυτικών οργανισμών μόνο από την πλευρά της ευεργετικής αλληλεπίδρασής τους με τον ξενιστή, στηρίζοντας το επιχείρημα αυτό στη δυσκολία που παρουσιάζεται κατά την εξέταση της φυτοπαθογένειας ενός μικροοργανισμού (Wennstrom, 1994). Η σχέση του μικροοργανισμού με τον ξενιστή του μπορεί να είναι σχέση αμοιβαιότητας (mutualistic), κατά την οποία και τα δύο είδη επωφελούνται από τη συμβίωση, σχέση ουδετερότητας (neutralistic) και σχέση ανταγωνιστικότητας κατά την οποία ο μικροοργανισμός μπορεί είναι παθογόνος ή δυνητικά παθογόνος (Barea et al., 2004). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση φυτού-μικροοργανισμού είναι ο γονότυπος των δύο ειδών, ο αριθμός των μικροοργανισμών, η παθογόνος ικανότητα του μικροοργανισμού και οι περιβαλλοντικές συνθήκες. Ένας πιο πρόσφατος ορισμός για τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς από το Murphy (2014) περιγράφει ότι τα ενδόφυτα είναι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, μονοκύτταροι ευκαρυώτες) οι οποίοι αποικίζουν το εσωτερικό του φυτού παροδικά ή για όλη τους τη ζωή, συνήθως χωρίς να προκαλούν παθογόνο αντίδραση (Murphy et al., 2014). Αυτή η κατηγορία μικροοργανισμών περιλαμβάνει μικροοργανισμούς οι οποίοι φέρουν γονίδια τα οποία τους καθιστούν ικανούς να διατηρήσουν την αλληλεπίδραση φυτού και μικροοργανισμού (Hardoim et al., 2008; Murphy et al., 2014), δυνητικά ενδοφυτικούς, υποχρεωτικά ενδοφυτικούς, περιστασιακά ενδοφυτικούς και «passenger» ενδοφυτικούς οργανισμούς, οι οποίοι εισέρχονται στο εσωτερικό του φυτού εξαιτίας τυχαίων γεγονότων, χωρίς να υπάρχουν επιλεκτικές δυνάμεις ικανές να το συγκρατήσουν στο εσωτερικό του φυτού (Murphy et al., 2014). Σύμφωνα με τον Hardoim και τους συνεργάτες του (2015), οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μπορεί να είναι παθογόνοι και μη παθογόνοι και οφείλουν να ορίζονται βάσει του ενδιαιτήματός τους και όχι βάσει της λειτουργίας τους (Hardoim et al., 2015). Ανεξαρτήτως της κατηγορίας στην οποία ανήκουν, οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ικανότητα προσαρμογής, επιβίωσης και πολλαπλασιασμού στις συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό των φυτικών ιστών (Hardoim et al., 2015).

Η πλειοψηφία των ενδοφυτικών μικροοργανισμών προέρχεται από το περιβάλλον της ριζόσφαιρας, το οποίο είναι πλούσιο σε ριζικές εκκρίσεις. Η σύσταση των ριζικών εκκρίσεων εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και από την παρουσία μικροοργανισμών (Huang et al., 2014; Pinton et al., 2007). Το είδος των ριζικών εκκρίσεων επηρεάζει το μικροβιακό δυναμικό της ριζόσφαιρας, προσελκύοντας μικροοργανισμούς ευνοϊκούς για την υγεία του φυτού και αποτρέποντας παθογόνους μικροοργανισμούς (Chaparro et al., 2013; De Coninck et al., 2015; Dutta et al., 2013; Li et al., 2013). Ταυτόχρονα, οι μικροοργανισμοί επηρεάζουν τη σύσταση των ριζικών εκκρίσεων (Huang et al., 2014; Matilla et al., 2010; Meier et al., 2013; Miché et al., 2006; Talboys et al., 2014). Αλλαγές στη σύσταση των ριζικών εκκρίσεων σε αμινοξέα έχουν παρατηρηθεί παρουσία μικροβιακών ουσιών όπως είναι η φαιναζίνη, η 2,4-διακετυλοφθορογλυκινόλη (DAPG) και ζεαραλενόνη (Phillips et al., 2004). Υποστηρίζεται, ότι η είσοδος των ενδοφυτικών βακτηρίων στις ρίζες των φυτών συμβαίνει μέσω του αποικισμού των ριζικών τριχιδίων (Mercado-Blanco and Prieto, 2012). Οι επιφάνειες της φυλλόσφαιρας παράγουν εκκρίσεις οι οποίες προσελκύουν μικροοργανισμούς, ωστόσο, εξαιτίας της παρουσίας της υπεριώδους ακτινοβολίας, της απουσίας θρεπτικών συστατικών και της αποξήρανσης, ένας μικρός αριθμός βακτηρίων μπορεί να επιβιώσει και να εισέλθει στο εσωτερικό του φυτού μέσω των στομάτων, πληγών και υδατωδών (Compant, 2010; Hallman, 2001). Οι ενδοφυτικοί

μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στο φυτό μέσω των άνθων και των καρπών αποικίζοντας την ανθόσφαιρα και την καρπόσφαιρα, αντίστοιχα (Comprant, 2010; Comprant et al., 2011). Διάφορες οδοί εισόδου των ενδοφύτων έχουν περιγραφεί και περιλαμβάνουν παθητικούς ή ενεργητικούς μηχανισμούς, οι οποίοι επιτρέπουν στα βακτήρια της ριζόσφαιρας να μεταναστεύσουν από το ριζόστρωμα (rhizoplane) στο κυτταρικό στρώμα του φλοιού, όπου η ενδοδερμίδα αποτελεί εμπόδιο στην είσοδο των μικροοργανισμών (Comprant, 2010; Mercado-Blanco and Lugtenberg, 2014). Μία άλλη κατηγορία βακτηρίων περιλαμβάνει στελέχη τα οποία είναι ικανά να διαπεράσουν το εμπόδιο της ενδοδερμίδας και να κινηθούν μέσω του αγγειακού συστήματος του ξυλώματος για να αποικίσουν τα εσωτερικά διαμερίσματα του φυτού, ενώ άλλα βακτήρια αποικίζουν τοπικά το διακυτταρικό χώρο (James et al., 2002). Επίσης, τα βακτήρια αποικίζουν τα αγγεία του ξυλώματος και κινούνται μέσω των πλακών διατήρησης του αγωγού αυτού ιστού (Bell et al., 1995; Comprant, 2010; Comprant et al., 2005; James et al., 2001). Νησίδες αποίκησης βακτηριακών ενδοφύτων έχουν ταυτοποιηθεί σε διαφορετικές φυτικές ταξινομικές κατηγορίες, όπως είναι τα Βρυόφυτα, τα Πτεριδόφυτα, τα Γυμνόσπερμα και τα Αγγειόσπερμα (Bragina et al., 2012; Comprant, 2010; Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006). Ενδοφυτικά βακτήρια έχουν απομονωθεί κυρίως από το εσωτερικό ριζών ψυχανθών και άλλων φυτών, καθώς και από φυμάτια ψυχανθών (Dudeja et al., 2012; Hoque et al., 2011; Sulas et al., 2008).



Εικόνα 6. Οι μηχανισμοί των ενδοφυτικών μικροοργανισμών που ενισχύουν την ανάπτυξη των φυτών. Στο αριστερό τμήμα παρουσιάζεται η διαφορά ανάπτυξης μεταξύ ενός φυτού, το οποίο έχει εμβολιαστεί με ευεργετικούς μικροοργανισμούς (In) και ενός μη-εμβολιασμένου φυτού (Ni) (Hardoim et al., 2015).

1.2.1 Ριζικά ενδόφυτα

Βάσει της αλληλούχισης της γονιδιακής αλληλουχίας του 16S rRNA, οι προκαρυωτικοί ενδοφυτικοί οργανισμοί αντιπροσωπεύονται από 23 φύλα από τα οποία, τα 21 ανήκουν στην επικράτεια των Βακτηρίων και τα 2 στην επικράτεια των Αρχαίων. Παρά την ποικιλομορφία που παρουσιάζουν, το 96 % των αλληλουχιών κατανέμεται σε 4 βακτηριακά φύλα: 54% Πρωτεοβακτήρια, 20% Ακτινοβακτήρια, 16% Firmicutes και 6% Βακτηριοειδή, τα οποία είναι κυρίαρχα στο φυτικό περιβάλλον (Bulgarelli et al., 2013; Vorholt, 2012). Ένα χαμηλό ποσοστό αλληλουχιών Αρχαίων έχουν απομονωθεί από κόκκους καφέ (Oliveira et al., 2013), ρίζες ριζιού και αραβόσιτου (Chelius and Triplett, 2001; Sun et al., 2008) και από καλαμιές της αρκτικής τούνδρας *Juncus trifidus* (van Elsas et al., 2012). Το 26% των προκαρυωτικών ενδόφυτων απαρτίζεται από βακτήρια του φύλου Πρωτεοβακτήρια και συγκεκριμένα την ομοταξία γ-Πρωτεοβακτήρια, τα οποία αποτελούνται από 56 ταυτοποιημένα και 7 μη ταυτοποιημένα γένη. Στην πλειοψηφία τους, τα γ-Πρωτεοβακτήρια αντιπροσωπεύονται από τα γένη: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* και *Serratia* (Berg et al., 2005; da Silva et al., 2013; Leite et al., 2013; Taghavi et al., 2009; Torres et al., 2008; Tsavkelova et al., 2007). Μέλη του γένους *Enterobacter* αλληλεπιδρούν με ένα εύρος φυτικών ιστών με διττό ρόλο, είτε αναπτύσσοντας σχέση αμοιβαιότητας με το φυτό, είτε λειτουργώντας ως παθογόνα (Bull et al., 2012, 2010). Τέσσερα είδη του γένους *Enterobacter* δρουν ως παθογόνα, ενώ πέντε είδη λειτουργούν ευεργετικά για το φυτό, συμπεριλαμβάνοντας και το μονοφυλλετικό κλάδο, που πρόσφατα ονομάστηκε *Kosakonia* (C Brady et al., 2013; Hardoim et al., 2013a). Με παρόμοιο τρόπο λειτουργούν και τα υπόλοιπα γένη των γ-Πρωτεοβακτηρίων που αποικίζουν το εσωτερικό τμήμα του φυτού. 16% των ενδοφυτικών αλληλουχιών απαρτίζονται από α-Πρωτεοβακτήρια, με 57 ταυτοποιημένα και 14 μη ταυτοποιημένα γένη. Οι περισσότερες αλληλουχίες εντάσσονται στα γένη *Rhizobium* και *Bradyrhizobium*, τα οποία είναι γνωστά για την αζωτοδεσμευτική τους δράση και τη συμβιωτική σχέση που αναπτύσσουν με τα ψυχανθή, καθώς και στα γένη *Methylobacterium* και *Sphingomonas* (Dalton et al., 2004; Kaga et al., 2009; Ulrich et al., 2008). Βακτήρια του γένους *Methylobacterium* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας τη μεθανόλη ως αποκλειστική πηγή αζώτου και αποικίζουν κυρίως τη φυλλόσφαιρα (Sy et al., 2005). Τα β-Πρωτεοβακτήρια αποτελούν το 10% των ενδοφυτικών βακτηρίων, με κύριους εκπροσώπους τα γένη *Burkholderia*, *Massilia* *Variovorax* και *Collimonas* (Hardoim et al., 2015). Θετικά κατά Gram βακτήρια της ομοταξίας των Ακτινοβακτηρίων αποτελούν το 20% των ενδοφυτικών μικροοργανισμών και αντιπροσωπεύονται κυρίως από τα γένη *Streptomyces*, τα οποία είναι γνωστά για την ικανότητα σύνθεσης αντιβιοτικών, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* και *Curtobacterium* (Hardoim et al., 2015; Liu et al., 2013). Η ομοταξία Bacilli αποτελεί το 15% των ενδοφυτικών βακτηρίων, με κυρίαρχα τα γένη: *Bacillus*, *Paenibacillus* και *Staphylococcus* τα οποία αντιστοιχούν σε 100 περίπου αλληλουχίες (Hardoim et al., 2015). Τα περισσότερα ενδοφυτικά βακτήρια ανήκουν σε 4 κυρίως φύλα, τα οποία ωστόσο περιλαμβάνουν πολυάριθμα γένη και είδη. Η δράση τους εξαρτάται από τον ξενιστή τους, καθώς και από περιβαλλοντικές παραμέτρους.

1.2.2 Μικροβίωμα φυματίων

Για αρκετά χρόνια επικρατούσε η ιδέα ότι τα φυμάτια των ψυχανθών αποικίζονται αποκλειστικά από α-rhizobia, μέλη της ομοταξίας των α-Πρωτεοβακτηρίων, όπως είναι τα γένη *Rhizobium* και *Bradyrhizobium* και από β-rhizobia, μέλη της ομοταξίας των β-

Πρωτεοβακτηρίων, όπως είναι τα γένη *Cupriavidus* και *Burkholderia* (Gyaneshwar et al., 2011). Πρόσφατες μελέτες ωστόσο, αποκαλύπτουν τη συνύπαρξη των παραπάνω με διαφορετικά είδη θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, πολλά από τα οποία παρουσιάζουν ικανότητα αζωτοδέσμευσης, τα οποία συχνά αναφέρονται και ως NAB (nodule associated bacteria). Το μικροβίωμα των φυματίων των ψυχανθών διαφέρει αισθητά από το μικροβίωμα των υπόλοιπων μελών του φυτού, καθώς και από το μικροβίωμα διαφορετικών φυτών (Scheublin et al., 2004).

Ριζόβια και μη-ριζόβια βακτήρια με ικανότητα αζωτοδέσμευσης και δημιουργίας φυματίων

Βακτήρια του φύλου των Πρωτεοβακτηρίων με ικανότητα δημιουργίας φυματίων και να αζωτοδέσμευσης έχουν απομονωθεί από φυμάτια ψυχανθών. Το *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο ανήκει στην ομοταξία των α-Πρωτεοβακτηρίων έχει απομονωθεί από φυμάτια του ψυχανθούς *Sesbania cannabina* (Cummings et al., 2009). Διαθέτει *nod* και *nif* γονίδια, τα οποία το καθιστούν ικανό να δημιουργεί φυμάτια κατά την εκ νέου μόλυνση του φυτού. Βακτήρια του γένους *Methylobacterium* (α-Πρωτεοβακτήρια), με ικανότητα δημιουργίας φυματίων, έχουν απομονωθεί από φυμάτια των φυτών *Crotalaria rodocarpa*, *Crotalaria perrotteti* και *Crotalaria glaucoides* (Sy et al., 2001). Βακτήρια του γένους *Microvirga* (α-Πρωτεοβακτήρια, Methylobacteriaceae) αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 2012 ως ενδοσυμβιωτικοί μικροοργανισμοί (Ardley et al., 2012). Περιγράφηκαν τρία καινούργια είδη: *Microvirga lotononidis*, *Microvirga lupini* και *Microvirga zambiensis*, τα οποία είναι ικανά να δημιουργήσουν φυμάτια σε φυτά *Listia angolensis* και *Lupinus texensis* (Ardley et al., 2013, 2012). Επιπλέον, ένα καινούργιο είδος *Microvirga*, το *Microvirga vignae* BR έχει απομονωθεί πρόσφατα από φυμάτια *Vigna unguiculata* (μαυρομάτικο φασόλι) (Zilli et al., 2015). Βακτήρια του γένους *Phyllobacterium* (α-Πρωτεοβακτήρια, οικογένεια: Rhizobacteriaceae) περιλαμβάνουν στελέχη ικανά να δημιουργήσουν φυμάτια, όπως το *Phyllobacterium trifolii* (Valverde et al., 2005). Ένα γονίδιο παρόμοιο με το *nodC* έχει ταυτοποιηθεί από βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Phyllobacterium*, τα οποία έχουν απομονωθεί από φυμάτια *Ononis tridentata* (Rincón et al., 2008). Η παρουσία γονιδίων *nif* και *nod* σε γένη βακτηρίων που δεν ανήκουν στην οικογένεια Rhizobacteriaceae υπολογίζεται ότι προέκυψε από πλευρική μεταφορά των γονιδίων αυτών. Τα βακτήρια αυτά φαίνεται να φέρουν γονίδια υπεύθυνα για χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, τα οποία απουσιάζουν από ριζοβακτήρια (Andrews and Andrews, 2017).

Η ομοταξία των β-Πρωτεοβακτηρίων περιλαμβάνει διαφορετικά είδη του γένους *Burkholderia* τα οποία είναι ικανά να δημιουργήσουν φυμάτια σε διάφορα είδη ψυχανθών (Moulin et al., 2001; Velázquez et al., 2013), όπως είναι τα Papilionoid και τα Mimosoid (Gyaneshwar et al., 2011). Η εκτενέστερη εξέταση των βακτηρίων του γένους *Burkholderia* υπέδειξε την ύπαρξη δύο διαφορετικών γενεαλογικών σειρών, για τις οποίες προτάθηκε ο εξής διαχωρισμός: τα παθογόνα στελέχη να περιλαμβάνονται στο γένος *Burkholderia*, ενώ τα συμβιωτικά και ελεύθερα διαβιούντα στελέχη να εντάσσονται σε ένα καινούργιο γένος, το οποίο ονομάζεται *Caballeronia* (Estrada-de los Santos, 2016; Estrada-de los Santos et al., 2013; Gyaneshwar et al., 2011). Ωστόσο, ορισμένα είδη τοποθετήθηκαν προσωρινά σε ένα επίσης καινούργιο γένος, το *Paraburkholderia* (Sawana et al., 2014). Το 2016 οι Dobritsa A. (Dobritsa and Samadpour, 2016) και οι συνεργάτες της πρότειναν την μετονομασία του

γένους αυτού σε *Caballeronia*, στο οποίο έχουν μεταφερθεί 25 στελέχη μέχρι σήμερα (Dobritsa et al., 2017; Dobritsa and Samadpour, 2016).

Στην οικογένεια Burkholderiaceae συμπεριλαμβάνονται βακτήρια του γένους *Cupriavidus*, τα οποία είναι ικανά να δημιουργήσουν φυμάτια και να αζωτοδεσμεύσουν. Το στέλεχος *Ralstonia taiwanensis*, το οποίο έχει απομονωθεί από φυμάτια του φυτού *Mimosa* (Chen et al., 2001) και αποτελεί το καταλληλότερο ριζόβιο για το φυτό αυτό (Chen et al., 2003), έχει μετονομαστεί σε *Cupriavidus taiwanensis* (Vandamme and Coenye, 2004). Ορισμένα βακτήρια του γένους *Cupriavidus*, εκτός από την ικανότητά τους να προάγουν την ανάπτυξη ψυχανθών δεσμεύοντας ατμοσφαιρικό άζωτο, παρουσιάζουν αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, λειτουργώντας αποτελεσματικά στην αποκατάσταση μολυσμένων εδαφών (Marques et al., 2013). Στελέχη με ικανότητα δημιουργίας φυμάτων φέρουν διαφορετικά είδη *nod* γονιδίων τα οποία έχουν ομοιότητες μεταξύ τους, συντελώντας ένα διαφορετικό κλάδο προερχόμενο από έναν κοινό πρόγονο του γένους *Burkholderia* (Andam et al., 2007; Bontemps et al., 2010; Chen et al., 2005; De Meyer et al., 2016). Εξαιτίας της ομοιότητας των βακτηρίων του γένους *Cupriavidus* με παθογόνα βακτήρια, η χρήση των βακτηρίων αυτών για τον εμβολιασμό του εδάφους μπορεί να ενέχει κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία.

Ορισμένα βακτήρια της ομοταξίας των γ-Πρωτεοβακτηρίων, τα οποία έχουν απομονωθεί από φυμάτια ψυχανθών παρουσιάζουν ικανότητα δημιουργίας φυμάτων. Η πρώτη αναφορά αλληλεπίδρασης γ-Πρωτεοβακτηρίων με ψυχανθή χρονολογείται σχετικά πρόσφατα, το 2004, οπότε στελέχη της ομοταξίας αυτής απομονώθηκαν από φυμάτια του φυτού *Hedysarum* (Benhizia et al., 2004). Απομονώθηκαν τα στελέχη, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia vulneris*, και στελέχη *Pseudomonas* sp.. Η απουσία στελεχών του γένους *Rhizobium* υποδηλώνει ότι βακτήρια των τάξεων Enterobacteriales και Pseudomonales ίσως είναι υπεύθυνα για την επαγωγή φυμάτων σε αυτά τα ψυχανθή (Benhizia et al., 2004). Επίσης, στελέχη *Pseudomonas* και *Burkholderia* spp. βρέθηκε ότι μπορούν να δημιουργήσουν φυμάτια στο φυτό *Robinia pseudoacacia*. Τα βακτήρια αυτά φαίνεται να φέρουν γονίδια *nodA* και *nodC* παρόμοια με αυτά των *Agrobacterium* και *Mesorhizobium*, παραπέμποντας σε οριζόντια μεταφορά των γονιδίων αυτών (Shiraishi et al., 2010).

Ένας μεγάλος πληθυσμός στελεχών της οικογένειας Enterobacteriaceae έχει απομονωθεί από φυμάτια ψυχανθών. Στελέχη που ανήκουν στα γένη *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. και *Klebsiella* sp. έχουν απομονωθεί από φυμάτια του *Arachis hypogaea* στην Αργεντινή (Ibañez et al., 2009), ενώ στελέχη του γένους *Enterobacter* sp. έχουν απομονωθεί από φυμάτια φυτών του γένους *Acacia* (Hoque et al., 2011). Μία σειρά ερευνών στην Κίνα ταυτοποίησε την ύπαρξη βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae σε φυμάτια των ψυχανθών, *Vicia faba*, *Vicia angustifolia*, *Oxytropis glabra* και *Oxytropis ochrocephala* (Kan et al., 2007). Το στέλεχος *Serratia plymuthica* έχει βρεθεί σε φυμάτια του φυτού *Sphaerophysa salsula* (Deng et al., 2011), ενώ βακτήρια του γένους *Pantoea* sp. και *Serratia* sp. έχουν βρεθεί σε φυμάτια του ψυχανθούς *Glycine max* (σόγια) (Li et al., 2008). Τα βακτήρια αυτά παρουσίασαν χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών *in vitro*, όπως η παραγωγή ινδολοξικού οξέος, η διαλυτοποίηση φωσφόρου και η δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου, ωστόσο μετά τον εμβολιασμό τους στα φυτά σόγια δεν παρατηρήθηκε προαγωγή της

δημιουργίας φυματίων και της ανάπτυξης των φυτών (Li et al., 2008). Βακτήρια του φύλου των Ακτινοβακτηρίων, έχουν επίσης απομονωθεί από φυμάτια των ψυχανθών *Lotus corniculatus* και *Anthyllis vulneraria* στη Σουηδία. Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης αποδείχθηκε ότι όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν διαθέτουν γονίδια *nodA* και μπορούν να δημιουργήσουν φυμάτια στο ψυχανθές *Lotus corniculatus* (Amromah and Huss-Danell, 2011).

Βακτήρια που αποικίζουν φυμάτια αλλά δεν έχουν ικανότητα δημιουργίας φυματίων

Αρκετά μεγάλος είναι και ο πληθυσμός των βακτηρίων που αποικίζουν φυμάτια, αλλά δε διαθέτουν την ικανότητα να δημιουργούν τα ίδια από μόνα τους φυμάτια σε εκ νέου μόλυνση του φυτού. Τα βακτήρια αυτά χαρακτηρίζονται κυρίως από την ικανότητά τους να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, παρουσιάζοντας μία σειρά PGP (Plant Growth Promoting) χαρακτηριστικών, όπως είναι η παραγωγή IAA, η παραγωγή σιδηροφόρων, η δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου, η διαλυτοποίηση φωσφόρου, η παραγωγή αντιβιοτικών και η παραγωγή λυτικών ενζύμων. Τα χαρακτηριστικά αυτά τα καθιστούν υποψήφια σαν παράγοντες βιολογικού ελέγχου (biocontrol agents). Τα βακτήρια αυτά περιλαμβάνουν κυρίως στελέχη των φύλων, Πρωτεοβακτήρια, Firmicutes και Ακτινοβακτήρια. Το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων αντιπροσωπεύεται από στελέχη των τριών ομοταξιών, α-Πρωτεοβακτήρια, β-Πρωτεοβακτήρια και γ-Πρωτεοβακτήρια. Συχνά απαντώμενα γένη α-Πρωτεοβακτηρίων είναι αυτά των *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* και *Ochrobactrum*. Το *Azospirillum* αποτελεί το πιο μελετημένο γένος, όσον αφορά στην ικανότητα των στελεχών του να λειτουργούν ως PGPR και PGPB. Στελέχη του γένους αυτού χρησιμοποιούνται εμπορικά σε ορισμένες χώρες, ως σκευάσματα εμβολίων (bioinoculants) για την προαγωγή της ανάπτυξης ποικύλων καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένων και των ψυχανθών (Glick et al., 1999). Το στέλεχος *Azospirillum brasilense* έχει την ικανότητα να δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο αλληλεπιδρώντας με μη ψυχανθή φυτά (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). Η αλληλεπίδραση του *Azospirillum brasilense* με βακτήρια που δημιουργούν φυμάτια σε φυτά alfalfa επηρέασε θετικά την απόδοση των δευτέρων, εξαιτίας την αύξησης της παραγωγής φλαβονοειδών από τα πρώτα, η οποία προάγει την έκφραση των γονιδίων *nod* (Volpin, 1996). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο εμβολιασμός του στελέχους *Pseudomonas fluorescens* P-93 ή του *Azospirillum lipoferum* S-21 μαζί με *Rhizobium* σε ρίζες φυτών *Phaseolus vulgaris* αύξησε την παραγωγή (Yadegari et al., 2008). Στελέχη του γένους *Gluconacetobacter* είναι γνωστά για την ικανότητά τους να λειτουργούν ως PGPR και PGPB και να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο. Ο εμβολιασμός φυτών σόγιας με το στέλεχος *Gluconacetobacter diazotrophicus* σε συνδυασμό με ριζόβια στελέχη ενίσχυσε την απόδοση των καλλιεργειών (Reis and Teixeira, 2015). Βακτήρια του γένους *Ochrobactrum* είναι γνωστά κυρίως για την ικανότητά τους να δημιουργούν φυμάτια, ωστόσο έχουν απομονωθεί στελέχη που δεν παρουσιάζουν την ικανότητα αυτή από φυμάτια των *Cicer arietinum*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Cytisus scorpius* και άλλων ψυχανθών. Στελέχη *Ochrobactrum* απομονωμένα από φυμάτια του *Pisum sativum* παρουσίασαν PGP χαρακτηριστικά, όπως η διαλυτοποίηση φωσφόρου και η δημιουργία βιοϋμενίων (Tariq et al., 2013). Επιπροσθέτως, ο εμβολιασμός φυτών *Lupinus luteus* με PGPB ανθεκτικά στα βαρέα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένου και του στελέχους *Ochrobactrum cytisi* με στόχο τη φυτοεξυγίανση μολυσμένων εδαφών, οδήγησε σε αύξηση της καλλιέργειας

των *Lupinus luteus* καθώς και σε μείωση της συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων (Dary et al., 2010).

Γένη των β-Πρωτεοβακτηρίων τα οποία χρησιμοποιούν φυμάτια ψυχανθών ως ενδιαίτημα είναι το *Burkholderia* και το *Variovorax*. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αρκετά μέλη του γένους *Burkholderia* φέρουν την ικανότητα δημιουργίας φυματίων, ωστόσο ορισμένα στελέχη που έχουν απομονωθεί από φυμάτια των φυτών, *Mimosa*, *Glycine*, *Arachis*, *Lespedeza* και *Vigna unguiculata* αδυνατούν να δημιουργήσουν φυμάτια. Διαθέτουν PGP χαρακτηριστικά, τα οποία συμβάλλουν στην ορθή λειτουργία των φυματίων (J. Chen et al., 2014; Li et al., 2008; Palaniappan et al., 2010; Pandey et al., 2005). Στελέχη του γένους *Variovorax* έχουν απομονωθεί από φυμάτια *Crotalaria incana* στην Αιθιοπία, οπότε και παρουσίασαν υδρολυτική ενζυματική δράση, συνθέτοντας λιπάση, κυτταρινάση και πρωτεάση (Aserse et al., 2013). Στην Αυστραλία στελέχη φυλογενετικά κοντά με το *Variovorax paradoxus* απομονώθηκαν από φυμάτια *Acacia salicina* και *Acacia stenophylla* (Hoque et al., 2011).

Στελέχη γ-Πρεοβακτήρια, που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Enterobacter* και *Klebsiella* έχουν απομονωθεί από φυμάτια *Arachis hypogaea*. Όταν τα στελέχη εμβολιάστηκαν εκ νέου στο ίδιο φυτό, μαζί με βακτήρια του γένους *Bradyrhizobium*, βρέθηκε ότι αυξάνουν τον αριθμό των φυματίων στο φυτό, προάγοντας ταυτόχρονα την ανάπτυξή του (Ibañez et al., 2009). Τα στελέχη *Pseudomonas fluorescens* και *Klebsiella pneumoniae* βρέθηκε ότι μπορούν να αποικίσουν φυμάτια *Vigna radiata* όταν χορηγηθούν σε συνδυασμό με το στέλεχος *Ensifer adhaerens*, το οποίο είναι ικανό να δημιουργήσει φυμάτια (Pandya et al., 2013). Στελέχη *Pantoea*, με ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου έχουν απομονωθεί από φυμάτια σόγια στην Κίνα (Li et al., 2008). Επιπροσθέτως, στελέχη *Pantoea* έχουν απομονωθεί από φυμάτια *Phaseolus vulgaris* στην Αιθιοπία (Aserse et al., 2013). Σε μία άλλη μελέτη στη Δυτική Κένυα, ο εμβολιασμός του *Phaseolus vulgaris* με ποικίλα στελέχη γ-Πρωτεοβακτηρίων σε συνδυασμό με στελέχη του γένους *Rhizobium* είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών συγκριτικά με φυτά τα οποία είχαν εμβολιαστεί μόνο με *Rhizobium* (Wekesa et al., 2016).

Το φύλο Firmicutes αντιπροσωπεύεται κυρίως από στελέχη του γένους *Bacillus*, τα οποία συναντώνται σε αφθονία σε φυμάτια ψυχανθών (Xu et al., 2014). Τα περισσότερα στελέχη του γένους αυτού έχουν εξεταστεί για τα PGP χαρακτηριστικά τους. Ο εμβολιασμός φυτών σόγιας με το στέλεχος *Bacillus megaterium* σε συνδυασμό με το *Bradyrhizobium japonicum* οδήγησε στην αύξηση της συγκέντρωσης αζώτου και της αιμοσφαιρίνης των ψυχανθών (Subramanian, 2015). Πρόσφατα, η αλληλούχιση του γονιδιώματος του *Bacillus simplex* αποκάλυψε την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την προαγωγή της ανάπτυξης εμβολιασμένων φυτών *Pisum sativum*. Τέτοια γονίδια είναι αυτά που ευθύνονται για την παραγωγή πολυαμιδής, λιποπεπτιδίων, υδρολυτικών ενζύμων, καθώς και για τη διαλυτοποίηση φωσφόρου και την παραγωγή σιδηροφόρων (Maymon et al., 2015). Το *Bacillus simplex* είναι γνωστό για τα PGP χαρακτηριστικά που διαθέτει και έχει απομονωθεί ως ενδόφυτο από αρκετά φυτά καθώς και ως NAB (nodule associated bacteria) από φυμάτια μπιζελιού, έπειτα από εμβολιασμό του σε συνδυασμό με το στέλεχος *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* (Schwartz et al., 2013). Λιγότερο συχνή, αλλά εξίσου σημαντική

είναι η αποίκιση των φυματίων ψυχανθών από στελέχη του γένους *Paenibacillus*. Στελέχη έχουν απομονωθεί από φυμάτια του ψυχανθούς *Medicago sativa* (Lai et al., 2015).

Τα φυμάτια αποικίζονται επίσης και από στελέχη του φύλου Ακτινοβακτήρια, με τα γένη *Arthrobacter*, *Brevibacterium* και *Micromonospora* να συναντώνται συχνότερα. Στελέχη του γένους *Arthrobacter* έχουν απομονωθεί από φυμάτια του ψυχανθούς *Lespedeza*, όπου παρουσίασαν την ικανότητα παραγωγής απαμινάσης του ACC και σιδηροφόρων (Palaniappan et al., 2010). Το στέλεχος *Arthrobacter protophormiae*, το οποίο παράγει απαμινάση του ACC προσφέρει αντοχή σε συνθήκες αλατότητας σε εμβολιασμένα φυτά *Pisum sativum* (Barnawal et al., 2014). Στελέχη *Brevibacterium* έχουν απομονωθεί από φυμάτια ψυχανθών στην Κίνα (Xu et al., 2014). Ο εμβολιασμός φυτών *Cicer arietinum* και *Cajanus cajan* με στελέχη *Brevibacterium* ευνόησε την ανάπτυξη των φυματίων και βελτίωσε τη λειτουργία τους. Αυτό επιδεικνύει ότι τα στελέχη του γένους αυτού συμβιώνουν αποτελεσματικά με στελέχη του γένους *Rhizobium* στα φυμάτια ψυχανθών (Gopalakrishnan et al., 2016). Στελέχη του γένους *Micromonospora* έχουν απομονωθεί, τα τελευταία χρόνια από φυμάτια ψυχανθών (Carro et al., 2012; Martínez-Hidalgo et al., 2014a; Niner et al., 1996). Παρουσιάζουν δράση εναντίον μυκήτων (Martínez-Hidalgo et al., 2015) καθώς και PGP χαρακτηριστικά, όταν εμβολιάζονται σε φυτά alfalfa και *Lupinus* (Martínez-Hidalgo et al., 2014b). Βακτήρια του γένους *Streptomyces* συναντώνται επίσης σε φυμάτια ψυχανθών, παρουσιάζοντας αντιμυκητιασική δράση καθώς και ιδιότητες που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Schrey and Tarkka, 2008).

1.2.3 Το μικροβίωμα των φυματίων του μαυρομάτικου φασολιού (*Vigna unguiculata* L. Walp)

Το ψυχανθές *Vigna unguiculata* (μαυρομάτικο φασόλι) ανήκει στο γένος *Vigna* και η προέλευσή του εντοπίζεται στη Δυτική Αφρική (Padulosi and Ng, 1997; Verdcourt, 1970). Το μαυρομάτικο φασόλι παρουσιάζει αντοχή στην ξηρασία και τη θερμότητα, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 25-35° C. Αναπτύσσεται καλύτερα σε αμμώδη και ξηρά εδάφη, από το επίπεδο της θάλασσας, μέχρι και το υψόμετρο των 1.500 μέτρων (Gonçalves et al., 2016). Έχει χαμηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά, καθώς τα φυμάτια των ριζών του εξασφαλίζουν τις απαιτούμενες ποσότητες αζώτου για την επιβίωσή του και έτσι μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει σε άγονα εδάφη. Διαθέτει αντοχή σε ακραίες τιμές pH, από το όξινες τιμές (pH 4.0) έως πολύ αλκαλικές (Fery, 2002). Αναπτύσσεται κυρίως σε ημι-άνυδρες περιοχές της Αφρικής, της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής, της Νότιας Ευρώπης και της Ασίας. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή μαυρομάτικου φασολιού είναι η Νιγηρία, ο Νίγηρας, η Βραζιλία, η Αϊτή, η Ινδία η Σρι Λάνκα, η Μιανμάρ, η Αυστραλία, και οι Ηνωμένες Πολιτείες (TJAI, 2010).

Σύμφωνα με μια πρόσφατη έρευνα, το μικροβίωμα φυματίων σε δύο ποικιλίες μαυρομάτικου φασολιού που είχαν αναπτυχθεί σε ημίξηρη περιοχή της Βραζιλίας βρέθηκε να απαρτίζεται κυρίως από στελέχη του γένους *Bradyrhizobium* (25%) (Leite et al., 2017). Ωστόσο, το 60% των αλληλουχιών που απομονώθηκαν ανήκουν στα γένη, *Enterobacter*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium* και μη ταξινομημένα Enterobacteriaceae. Υποστηρίζεται, ότι τα στελέχη του γένους *Chryseobacterium* συμβάλλουν στην αντοχή του φυτού στην αλατότητα των ημι-άνυδρων περιοχών στις οποίες αναπτύσσεται, όπως έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση του *Phaseolus vulgaris* σε παλαιότερη έρευνα (Estévez et

al., 2009; Leite et al., 2017). Στελέχη φυλογενετικά όμοια με το *Bradyrhizobium neotropicale* απομονώθηκαν από όλα τα φυτά που εξετάστηκαν στην παραπάνω έρευνα και θεωρήθηκε ότι αποτελούν τους βασικούς συμβιώτες του μαυρομάτικου φασολιού. Βρέθηκε, ότι το μικροβίωμα των φυματίων απαρτίζεται από τα φύλα που ανήκουν στα Πρωτεοβακτήρια, Βακτηριοειδή, Ακτινοβακτήρια και Firmicutes, με τα Πρωτεοβακτήρια να συνιστούν το επικρατές φύλο και τα γ-Πρωτεοβακτήρια και α-Πρωτεοβακτήρια να αποτελούν το 29 % και 25%, αντίστοιχα, του συνόλου των Πρωτεοβακτηρίων (Leite et al., 2017).

Έρευνες που διεξήχθησαν σε περιοχές της Αφρικής και της Ασίας, χώρες οι οποίες θεωρούνται οι περιοχές προέλευσης του μαυρομάτικου φασολιού, υπέδειξαν ότι το κυρίαρχο γένος που αποικίζει τα φυμάτια του είναι το *Bradyrhizobium*, τα στελέχη του οποίου είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία φυματίων στο μαυρομάτικο φασόλι (Pule-Meulenberg et al., 2010; Sarr et al., 2009; Steenkamp et al., 2008; Wade et al., 2014). Στη Βραζιλία, όπου το μαυρομάτικο φασόλι αποτελεί εισαγόμενη και όχι γηγενή καλλιέργεια, παρατηρείται μεγαλύτερη ποικιλία στα στελέχη που αποικίζουν τα φυμάτια, τα οποία κυρίως ανήκουν στα γένη *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* και *Sinorhizobium* και σε γένη του φύλου Firmicutes, *Bacillus* και *Paenibacillus* (Costa, 2013; Leite et al., 2009; Martins et al., 1997). Φυμάτια από μαυρομάτικα φασόλια της περιοχής του Αμαζονίου παρουσίασαν στελέχη τα οποία κατατάσσονται στα γένη *Pseudomonas*, *Enterobacter* (γ-Πρωτεοβακτήρια), *Bacillus* και *Paenibacillus*. Τα στελέχη αυτά δεν παρουσιάζουν την ικανότητα δημιουργίας φυματίων, αν και ορισμένα αυτά έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και να παράγουν Ινδολοξικό οξύ (IAA), συμβάλλοντας στη θρέψη του φυτού (Jaramillo et al., 2013). Μικρότερος αριθμός ερευνών οι οποίες έχουν διεξαχθεί σε ημι-άνυδρα εδάφη της Βραζιλίας έχει υποδείξει την αποίκιση των φυματίων του μαυρομάτικου φασολιού από το στέλεχος *Microvirga vignae*, άλλοτε σε χαμηλές και άλλοτε σε υψηλές συγκεντρώσεις (Leite et al., 2017; Radl et al., 2013; Zilli et al., 2015). Η διαφορά αυτή των συγκεντρώσεων του στελέχους αυτού μεταξύ των διαφορετικών περιοχών πιθανόν να οφείλονται στις διαφορές της σύστασης του εδάφους (Leite et al., 2017). Κατά τη διεξαγωγή ερευνών του De Meyer και συνεργατών (2015) (De Meyer et al., 2015) απομονώθηκαν γένη, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus* από φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού, αποτελέσματα τα οποία συμβαδίζουν με αυτά των Leite και συνεργατών (2017) (Leite et al., 2017). Βρέθηκε ότι διαφορετικά γένη επικρατούν σε διαφορετικές περιοχές καλλιέργειας, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η σύσταση του εδάφους είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει το μικροβίωμα των φυματίων, ενώ ο γονότυπος του φυτού συμβάλλει σε μικρότερο βαθμό (De Meyer et al., 2015; Leite et al., 2017).

Βακτήρια του γένους *Enterobacter* και κυρίως της τάξης των γ-Πρωτεοβακτηρίων έχουν απομονωθεί από φυμάτια ψυχανθών σόγιας και μαυρομάτικου φασολιού (De Meyer et al., 2015; de Oliveira-Longatti et al., 2014; Deng et al., 2011; Leite et al., 2017, 2009; Li et al., 2008). Τα στελέχη αυτά δε διαθέτουν ικανότητα δημιουργίας φυματίων, ωστόσο είναι γνωστά για τη συμβολή τους στην ανάπτυξη των φυτών, μέσω της αζωτοδέσμευσης και της παραγωγής ινδολοξικού οξέος (Aserse et al., 2013).

1.2.4 Στελέχη της τάξης Enterobacteriales

1.2.4.α Γένος *Enterobacter*

Το γένος *Enterobacter* ανήκει στην ομοταξία των γ-Πρωτεοβακτήρια, του φύλου Πρωτεοβακτήρια, στην τάξη των Enterobacteriales και στην οικογένεια των Enterobacteriaceae. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Hormaeche και Edwards το 1960, οι οποίοι πρότειναν τη μετονομασία του γένους *Aerobacter* σε *Enterobacter* (Hormaeche and Edwards, 1960). Οι μικροοργανισμοί που συγκαταλέγονται στην οικογένεια των Enterobacteriaceae, περιλαμβάνουν στελέχη τα οποία είναι αρνητικά κατά Gram, είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, δε δημιουργούν σπόρια, διαθέτουν ραβδόμορφο σχήμα και έχουν τη δυνατότητα μετακίνησης, κυρίως με τη χρήση μαστιγίων (flagella). Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή τους είναι 25°-28° C. Ορισμένοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη, ως τη μόνη πηγή άνθρακα, ενώ άλλοι χρειάζονται την παρουσία βιταμινών και αμινοξέων (Brenner and III Farmer, 2005). Το αντιπροσωπευτικό γένος της οικογένειας των Enterobacteriaceae είναι το γένος *Escherichia* (Castellani and Chalmers, 1919), ενώ στην οικογένεια ανήκουν επίσης τα γένη, *Shigella*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Lelliottia*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Candidatus*, *Proteus*, *Yokenella*, *Arsenophonus*, *Photorhabdus* και *Xenorhabdus* (Brenner and III Farmer, 2005).

Το γένος *Enterobacter* περιλαμβάνει 13 είδη και 5 υποείδη, τα 3 εκ των οποίων περιλαμβάνουν υποείδη του στελέχους *Enterobacter hormaechei* και είναι, το *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae*, το *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* και το *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (Hoffmann et al., 2005b; O'Hara et al., 1989) και άλλα 2 αποτελούν υποείδη του στελέχους *Enterobacter cloacae* και περιλαμβάνουν, το *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* και το *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* (Hoffmann et al., 2005a; Liu et al., 2012a). Τα στελέχη που συγκαταλέγονται στο γένος *Enterobacter* είναι, το *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter bugandensis* (Doijad et al., 2016), *Enterobacter cancerogenus* το οποίο θεωρείται συνώνυμο του *Enterobacter taylorae* (Grimont and Ageron, 1989), το *Enterobacter kobei* (Kosako et al., 1996), το *Enterobacter ludwigii* (Hoffmann et al., 2005c), το *Enterobacter mori* (B. Zhu et al., 2011), το *Enterobacter muelleri* (Kämpfer et al., 2015), το *Enterobacter siamensis* (Khunthongpan et al., 2013), το *Enterobacter soli* (Manter et al., 2011), το *Enterobacter tabaci* (Duan et al., 2015) και το *Enterobacter xiangfangensis* (Gu et al., 2014).

Η φυλογενετική ανάλυση βάσει της αλληλουχίας του *rrs* γονιδίου (κωδικοποιεί το 16S rRNA) έχει χαμηλή διακριτική ικανότητα, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ταυτοποίηση συγγενικών σχέσεων των στελεχών της τάξης Enterobacteriales, έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί επιπλέον γονίδια, όπως το *gyrB* (Dauga, 2002; Fukushima et al., 2002), το *dnaJ* (Nhung et al., 2007), το *oriC* (Roggenkamp, 2007) και το *recA* (Tailliez et al., 2010), για την εύρεση της φυλογενετικής συγγένειας που συνδέει τα στελέχη μεταξύ τους. Επίσης, μία πιο πρόσφατη προσέγγιση για τη διερεύνηση της φυλογένειας των στελεχών των μελών της τάξης των Enterobacteriales περιλαμβάνει την αλληλούχιση πολλών γενετικών τόπων (Multilocus sequence analysis, MLSA), που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες γονιδίων: (i) *tuf* και *atpD* (Paradis et al., 2005) (ii) *atpD*, *carA* και *recA* (Young and Park, 2007) (iii) *gapA*, *gyrA* και *ompA* (Naum et al., 2011) (iv) *rpoB*, *gyrB*, *dnaJ* και *recA* (Hata et al., 2016) (v) *fusA*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*

και *sucA* (Ee et al., 2016)(vi) *gyrB*, *rpoB*, *atpD* και *infB*, η οποία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη (Brady et al., 2008; C Brady et al., 2013; Brady et al., 2014; Zhang and Qiu, 2015). Οι μελέτες αυτές έχουν οδηγήσει σε αναταξινομήσεις εντός της τάξης των Enterobacteriales.

Ορισμένα στελέχη τα οποία στο παρελθόν συγκαταλέγονταν στο γένος *Enterobacter*, εξαιτίας της ενδελεχούς έρευνας του γονιδιώματος και των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά γένη και μετονομάστηκαν. Αυτά τα στελέχη περιλαμβάνουν, το στέλεχος *Enterobacter aerogenes*, το οποίο μεταφέρθηκε στο γένος *Klebsiella* με την ονομασία *Klebsiella mobilis* (Bascomb et al., 1971; Izard et al., 1980b; Tindall et al., 2016), το *Enterobacter agglomerans*, το οποίο μετονομάστηκε σε *Pantoea agglomerans* (Ewing and Fife, 1972; Gavini et al., 1989), το *Enterobacter amnigenus*, που μετονομάστηκε σε *Lelliottia amnigenus* (C Brady et al., 2013; Izard et al., 1981), το στέλεχος *Enterobacter arachidis* μετονομάστηκε σε *Kosakonia arachidis* (C Brady et al., 2013; Madhaiyan et al., 2010), το *Enterobacter cowanii* μετονομάστηκε σε *Kosakonia cowanii* (C Brady et al., 2013; Inoue et al., 2000), το *Enterobacter gergoviae* σε *Pluralibacter gergoviae* (C Brady et al., 2013; Brenner et al., 1980), το *Enterobacter helveticus* σε *Cronobacter helveticus* και το *Enterobacter turicensis* σε *Cronobacter zurichensis* (C Brady et al., 2013; Stephan et al., 2007), το *Enterobacter intermedius* μετονομάστηκε σε *Kluyvera intermedia* (Izard et al., 1980a; Pavan et al., 2005), το *Enterobacter massiliensis* σε *Metakosakonia massiliensis* (Alnajjar and Gupta, 2017; Lagier et al., 2013), το *Enterobacter nimipressuralis* σε *Lelliottia nimipressuralis* (C Brady et al., 2013; Brenner et al., 1986a), το *Enterobacter oryzae* σε *Kosakonia oryzae* (C Brady et al., 2013; Peng et al., 2009), το *Enterobacter oryzendophyticus* σε *Kosakonia oryzendophytica* και το *Enterobacter oryziphilus* σε *Kosakonia oryziphila* (Hardoim et al., 2013b; Li et al., 2016), το *Enterobacter pulveris* σε *Cronobacter pulveris* (C Brady et al., 2013; Stephan et al., 2008), το *Enterobacter pyrinus* σε *Pluralibacter pyrinus* (C Brady et al., 2013; Chung et al., 1993), το *Enterobacter radicincitans* σε *Kosakonia radicincitans* (Carrie Brady et al., 2013; Kämpfer et al., 2005), το *Enterobacter sacchari* σε *Kosakonia sacchari* (Gu et al., 2014; Zhu et al., 2013), το *Enterobacter sakazakii* σε *Cronobacter sakazakii* (Ill Farmer et al., 1980; Iversen et al., 2007), το *Enterobacter taylora* σε *Enterobacter cancerogenus* (Ill Farmer et al., 1985; Schønheyder et al., 1994) και τέλος, το *Enterobacter turicensis* σε *Cronobacter zurichensis* (C Brady et al., 2013; Stephan et al., 2007).

Μέλη του γένους *Enterobacter* μπορούν να αποικίσουν ποικίλα ενδιαιτήματα, όπως είναι το έδαφος, το νερό και τα απόβλητα. Επίσης, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ζωντανούς οργανισμούς, φυτά, έντομα, ζώα, καθώς και με τον άνθρωπο. Στελέχη του γένους *Enterobacter* είναι υπεύθυνα για ένα μεγάλο μέρος νοσοκομειακών λοιμώξεων, εξαιτίας της αντοχής τους απέναντι σε απολυμαντικά και αντιμικροβιακούς παράγοντες (Grimont and Grimont, 2005; Wang et al., 2015). Το μεγαλύτερο ποσοστό βακτηριακών οφείλεται στο στέλεχος *E. cloacae* και ακολουθούν τα στελέχη *E. agglomerans* και *E. sakazakii* και άλλα, με σειρά συχνότητας (Regli and Pagès, 2015). Η παρουσία στελεχών *Enterobacter* sp. έχει παρατηρηθεί κατά τη μόλυνση της κατώτερης αναπνευστικής οδού με πνευμονία, εμπύεμα, πυώδη βρογχίτιδα και πνευμονικό οίδημα. Άτομα με προσθετικές βαλβίδες και άτομα χρήστες εξαρτησιογόνων ουσιών με τη χρήση σύριγγας έχουν παρουσιάσει ενδοκαρδίτιδα οφειλόμενη σε στελέχη του γένους *Enterobacter* (Grimont and Grimont, 2005). Στελέχη *E. hormaechei* έχουν απομονωθεί από τραύματα, πτύελα και από δείγματα αίματος (O'Hara et

al., 1989). Έχει επίσης περιγραφεί η μόλυνση πρόωρων νεογνών από το *E. hormaechei* (Wenger et al., 1997). Επιπροσθέτως, το στέλεχος *E. asburiae* έχει απομονωθεί από κλινικά δείγματα, ούρων, αναπνευστικής οδού, κοπράνων, τραυμάτων και αίματος (Brenner et al., 1986b).

Τα στελέχη *Enterobacter* sp. αποικίζουν σε ένα μεγάλο βαθμό τη ριζόσφαιρα, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP). Η λειτουργία τους στηρίζεται σε τρεις βασικούς μηχανισμούς οι οποίοι περιλαμβάνουν, τη σύνθεση θρεπτικών συστατικών για το φυτό, τη διευκόλυνση της πρόσληψης θρεπτικών από το έδαφος και την προστασία των φυτών από παθογόνα, όπως και από τη συσσώρευση βαρέων μετάλλων (Jha et al., 2011). Ωστόσο, βακτήρια του γένους *Enterobacter* sp. δρουν ως παθογόνα για ορισμένα φυτά. Ένα παράδειγμα αποτελεί το *E. cancerogenus*, το οποίο βρέθηκε ότι προκαλεί σαράκι σε φυτά λεύκας (*Populus* sp.) (Grimont and Grimont, 2005), ενώ το *E. mori* έχει συνδεθεί με το μαρασμό φυτών *Morus alba* L. (λευκή μουριά) (B. Zhu et al., 2011).

Βακτήρια του γένους *Enterobacter* έχουν απομονωθεί από το εσωτερικό ριζών και βλαστών, καθώς και από το εσωτερικό φυματίων ψυχανθών. Το στέλεχος *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* έχει απομονωθεί από την ενδόσφαιρα φυτών ρυζιού (*Oryza sativa* L.), όπου συνέβαλλε στη δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου (Prakamhang et al., 2009), ενώ το *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* έχει απομονωθεί ως ενδόφυτο από το φυτό *Capsicum annuum* στο Χονγκ Κονγκ, το οποίο είχε προσβληθεί από φυτοπαθογόνο *Ralstonia solanacearum* (Liu et al., 2012b). Βακτήρια *Enterobacter* sp., φυλογενετικά κοντά με τα στελέχη *E. cloacae*, *E. hormaechei* και *E. asburiae* έχουν απομονωθεί από φυμάτια φασολιού στην Κένυα (Wekesa et al., 2017), όπως και από φυμάτια *Phaseolus vulgaris* στην Κούβα (Sánchez et al., 2014). Στέλεχος φυλογενετικά κοντά (99.4 %) με το *Enterobacter asburiae* έχει απομονωθεί από ρίζες φυτών *Zea mays* (Ogbo and Okonkwo, 2012). Το στέλεχος αυτό παρουσίασε ικανότητα παραγωγής IAA, αμμωνίας, καθώς και υδρολυτικών ενζύμων, όπως η πεκτινάση και η κυτταρινάση. Εκ νέου εμβολιασμός *in vitro*, σπόρων ρυζιού και του αραβόσιτου από το οποίο απομονώθηκε (*Zea mays*) απέδειξε ότι προάγει την ανάπτυξη των φυτών αυτών και ότι συμβάλλει στη δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου (Ogbo and Okonkwo, 2012). Το στέλεχος *Enterobacter* sp. FD17 έχει απομονωθεί από ρίζες φυτών ρυζιού και έχει επιδείξει υψηλή ικανότητα αποίκησης της ρίζας, καθώς και ικανότητα προαγωγής της ανάπτυξης του φυτού (Naveed et al., 2014). Ο εμβολιασμός φυτών ρυζιού με το στέλεχος αυτό ευνόησε τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού συστήματος II (PSII) και μείωσε το χρόνο άνθισης (Naveed et al., 2014). Βακτήρια φυλογενετικά όμοια με τα στελέχη *Enterobacter cancerogenus* και *Enterobacter asburiae* έχουν απομονωθεί από το εσωτερικό ριζών του φυτού *Hypericum silenoides* (López-Fuentes et al., 2012). Στελέχη *Enterobacter* sp. απομονωμένα από το εσωτερικό της ρίζας ζαχαροκάλαμου στην Κίνα έχουν την ικανότητα αζωτοδέσμευσης και προαγωγής της ανάπτυξης του φυτού, μέσω της παραγωγής σιδηροφόρων, IAA, απαμινάσης του ACC και διαλυτοποίησης φωσφόρου (Lin et al., 2012). Το ανθεκτικό στην αλατότητα στέλεχος *Enterobacter* sp. P23 απομονώθηκε από ορυζώνες στην Ινδία και βρέθηκε να συμβάλλει στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών ρυζιού σε συνθήκες αλατότητας, κυρίως μέσω της παραγωγής απαμινάσης του ACC (Sarkar et al., 2018). Ορισμένα στελέχη του γένους *Enterobacter*, όπως τα *E. cloacae* (Nishikawa et al.,

1979) και *E. ludwigii* (Kwon et al., 2007; Pawlicki-Jullian et al., 2010; Roblot et al., 2013) έχουν την ικανότητα να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες (exopolysaccharides, EPS), οι οποίοι λόγω του υψηλού αριθμού αρνητικά φορτισμένων λειτουργικών ομάδων που φέρουν, έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μέταλλα, συμβάλλοντας στη εξυγίανση μολυσμένων εδαφών (Brown and Lester, 1982).

Enterobacter cloacae

Το *E. cloacae* έχει αποδειχθεί ότι έχει την ικανότητα να παράγει IAA, μέσω του μονοπατιού IPA (indole-3-pyruvate, ινδολο-3-πυρουβικό οξύ). Το γονίδιο *ipdC*, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο IPDC, είναι υπεύθυνο για την ικανότητα του βακτηρίου να παράγει IAA (Koga et al., 1991; Ryu and Patten, 2008; Saleh and Glick, 2001). Το *E. cloacae* αδυνατεί να παράγει IAA απουσία του *ipdC*, αποτέλεσμα το οποίο παρατηρείται και σε στελέχη όπως το *Azospillum brasilense* και το *Erwinia herbicola* που παράγουν IAA μέσω του IPA μονοπατιού (Brandl and Lindow, 1996; Costacurta et al., 1994). Το στέλεχος *E. cloacae* παρουσιάζει μία σειρά χαρακτηριστικών, τα οποία το καθιστούν ικανό να προάγει την ανάπτυξη των φυτών. Τα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνουν την παραγωγή IAA, σιδηροφόρων, απαμινάσης του ACC, διαλυτοποίηση φωσφόρου και δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου (Glick et al., 1995; Khalifa et al., 2016; Shah et al., 1998; Swamy et al., 2016). Επίσης, έχει την ικανότητα συνθέτει αντιβιοτικά, λειτουργώντας αποτελεσματικά σαν παράγοντας βιολογικού ελέγχου (biocontrol agent), όπως στην περίπτωση της παρεμπόδισης της δράσης του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pythium ultimum* σε καλλιέργειες αγγουριού, μαρουλιού, τομάτας, σιταριού, καρότου, βαμβακιού, ηλιοτρόπιου και ρεπανιού (Kageyama and Nelson, 2003; Nelson et al., 1986; Roberts et al., 1994; Windstam and Nelson, 2008) και στην περίπτωση του νηματώδους *Meloidogyne incognita* (Duronnois et al., 1999). Η ικανότητα του *E. cloacae* να συνθέτει αντιβιοτικούς παράγοντες, όπως η β-λακταμάση, το καθιστά σημαντικό εργαλείο για τις βιομηχανίες φαρμάκων για την παραγωγή αντιβιοτικών ευρέος φάσματος, της ομάδας των κεφαλοσπορινών (Minami et al., 1980). Ο εμβολιασμός του ψυχανθούς *Pisum sativum* με *E. cloacae* οδήγησε σε αύξηση του ύψους και του ξηρού βάρους των φυτών (Khalifa et al., 2016). Το στέλεχος *E. cloacae* φέρει ένα γονίδιο ομόλογο με το γονίδιο *hns*, το οποίο κωδικοποιεί τη μικρή πρωτεΐνη ιστονικού τύπου H-NS (small histone-like protein) σε στελέχη του *Enterobacter* sp. και στο *E. coli* (English et al., 2010). Η πρωτεΐνη H-NS αποτελεί κύριο συστατικό της βακτηριακής χρωματίνης που επηρεάζει τη δομή του DNA και την έκφραση γονιδίων (Laurent-Winter et al., 1997; Williams and Rimsky, 1997). Η έκφραση του 5 % του συνολικού αριθμού των γονιδίων του *E. coli* ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη H-NS (Hommais et al., 2001). Η H-NS συμβάλλει στην παραγωγή μαστιγίνης, τη δομική πρωτεΐνη των βακτηριακών μαστιγίων, συμβάλλοντας έτσι στη βελτίωση της κινητικότητας των βακτηρίων η οποία με τη σειρά της είναι σημαντική για την αποίκιση ποικίλων ενδιαιτημάτων, όπως οι φυτικές ρίζες (Landini and Zehnder, 2002; Ono et al., 2005). Επιπλέον, η H-NS συμβάλλει στη σύνθεση μεμβρανικών πορινών, στη βιοσύνθεση λιποπολυσακχαριτών, καθώς και στην αντοχή των βακτηρίων σε περιβαλλοντικές αλλαγές που περιλαμβάνουν διαφοροποιήσεις στη θερμοκρασία, το pH και την οσμωτικότητα (Hommais et al., 2001; Landini and Zehnder, 2002; Laurent-Winter et al., 1997; Ono et al., 2005).

E. cloacae έχει απομονωθεί από φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού (*Vigna unguiculata* L. Walp) στη Κένυα και στο Δυτικό Αμαζόνιο (Jaramillo et al., 2013; Ndungu et al., 2018), όπως επίσης και από ρίζες φυτών μηδικής (alfalfa) σε περιοχή της Σαουδικής Αραβίας (Khalifa et

al., 2016). Φυμάτια του ψυχανθούς *Hedysarum* έχει βρεθεί ότι αποικίζονται από στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae, όπως το *Enterobacter cloacae*, το *Enterobacter kobei*, το *Escherichia vulneris* και το *Pantoea agglomerans*, (Muresu et al., 2008). Το *E. cloacae* βρέθηκε επίσης να αλληλεπιδρά με τη ρίζα και το βλαστό φυτών ρυζιού, όπου συνέβαλε στη δέσμευση ατμοσφαιρικού αζώτου (Ladha et al., 1983). Σε σχετικά πρόσφατη έρευνα, στελέχη *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter ludwigii* απομονώθηκαν από φυμάτια ψυχανθών *Glycine max*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata*, *Arachis hypogaea* και *Vigna mungo* (Dhole et al., 2016). Τα στελέχη αυτά ήταν θετικά για το γονίδιο *nifH* και φαίνεται να επηρέασαν θετικά την ανάπτυξη της καλλιέργειας του αράπικου φιστικιού (*Arachis hypogaea*), μέσω της αζωτοδέσμευσης, της παραγωγής IAA και σιδηροφόρων και της διαλυτοποίησης φωσφόρου. Το *E. cloacae* επέδειξε υψηλή ικανότητα παραγωγής απαμινάσης του ACC (Dhole et al., 2016). Σε διαφορετική έρευνα, το στέλεχος *E. cloacae* απομονώθηκε από φυμάτια σόγιας στο Μαλάουι της Αφρικής, όπου παρουσίασε παραγωγή IAA και σιδηροφόρων, όπως και ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου (Mwafuilirwa et al., 2018). Ως ενδόφυτο έχει απομονωθεί το στέλεχος *E. cloacae* από το εσωτερικό γυρεόκοκκων από πεύκα στην περιοχή της Μεσογείου (Madmony et al., 2005). Η αποίκιση των γυρεόκοκκων προσφέρει στο στέλεχος ευνοϊκές συνθήκες επιβίωσης, προστατεύοντάς το από την υπεριώδη ακτινοβολία, από αντιβιοτικά, καθώς και από υψηλές θερμοκρασίες. Από την πλευρά του, το στέλεχος φαίνεται να συμβάλλει στη βλάστηση των πεύκων παρέχοντας IAA (Madmony et al., 2005).

Enterobacter ludwigii

Τα στελέχη *E. ludwigii* SRI-211 και SRI-229 έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα οργανικής καλλιέργειας ρυζιού και έχει βρεθεί ότι δρουν έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Macrophomina phaseolina*, διαθέτοντας ταυτόχρονα ικανότητα προαγωγής της ανάπτυξης φυτών σόργου και ρυζιού (Gopalakrishnan et al., 2012, 2011). Η εφαρμογή των στελεχών αυτών σε φυτά ρεβιθιού και φάβας έδειξε να αυξάνει τον αριθμό και το βάρος των φυματίων τους καθώς και το βάρος της ρίζας και του βλαστού τους (Gopalakrishnan et al., 2016). Σειρά ερευνών έχει αποδείξει την ικανότητα στελεχών *E. ludwigii* να παράγουν IAA. Στέλεχος με 99,8% φυλογενετική ομοιότητα με το *E. ludwigii* απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Lolium perenne* και παρουσίασε ικανότητα παραγωγής IAA, διαλυτοποίησης φωσφόρου, καθώς και δράση ενάντια στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium solani* (Shoebitz et al., 2009). Ικανότητα παραγωγής IAA παρουσίασε, επίσης όταν απομονώθηκε ως ενδόφυτο από φυτά τζίντζερ στην Κίνα (T. Chen et al., 2014), καθώς και από ψυχανθή σόγιας στη Βραζιλία, όπου παρουσίασε και ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου (de Almeida Lopes et al., 2016). Το στέλεχος *E. ludwigii* έχει απομονωθεί ως ενδόφυτο από φυτά σίτου στην Ινδία, οπότε και βρέθηκε να συμβάλει στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών αυτών σε συνθήκες ξηρασίας (Gontia-Mishra et al., 2016). Το στέλεχος *Enterobacter ludwigii* βρέθηκε να αποικίζει τα φυμάτια του ψυχανθούς *Trigonella foenum graecum*, στην Ινδία, μαζί με τα στελέχη *Enterobacter cloacae* και *Pantoea dispersa* (Roy et al., 2016). Όλα τα στελέχη επέδειξαν ικανότητα αζωτοδέσμευσης και παραγωγής IAA, σιδηροφόρων και απαμινάσης του ACC. Το *E. ludwigii* παρουσίασε την υψηλότερη αζωτοδεσμευτική ικανότητα και την παραγωγή της υψηλότερης συγκέντρωσης απαμινάσης του ACC εκ των τριών (Roy et al., 2016). *E. ludwigii* έχει απομονωθεί από φυμάτια *Medicago lupulina* στην αποκλεισμένη περιοχή του Τσέρνομπιλ (Pawllicki-Jullian et al., 2010). Τα στελέχη *E. ludwigii* και *E. hormaechei* έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα φυτών τομάτας σε θερμοκήπια στη Νότιο

Κορέα (Walrola and Arunakumara, 2016). Τα δύο στελέχη ήταν θετικά για την παραγωγή IAA και για την ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου (Walrola and Arunakumara, 2016). Έρευνες έχουν υποδείξει την ικανότητα του *E. ludwigii* να παράγει εξωπολυσακχαρίτες, καθιστώντας το χρήσιμο εργαλείο για την προστασία φυτών από συσσώρευση βαρέων μετάλλων (Kwon et al., 2007; Pawlicki-Jullian et al., 2010; Roblot et al., 2013). Στελέχη *E. ludwigii* έχουν απομονωθεί από φυμάτια *Vigna unguiculata* (Dhole et al., 2016).

1.2.4.β Γένος *Lelliottia*

Το γένος *Lelliottia*, όπως και το γένος *Enterobacter* ανήκει στην ομοταξία των γ-Πρωτεοβακτηρίων, του φύλου Πρωτεοβακτήρια, στην τάξη των Enterobacteriales και στην οικογένεια των Enterobacteriaceae. Το γένος *Lelliottia* περιλαμβάνει 4 είδη, το *Lelliottia jeotgali* (Yuk et al., 2018), το *Lelliottia aquatilis* (Kämpfer et al., 2018), το *Lelliottia amnigena* (πρώην *Enterobacter amnigenus*) και το *Lelliottia nimipressuralis* (πρώην *Enterobacter nimipressuralis*), τα οποία έχουν αναταξινομηθεί από το γένος *Enterobacter* (C Brady et al., 2013). Τα στελέχη του γένους *Lelliottia* είναι βακτήρια αρνητικά κατά Gram με ραβδόμορφο σχήμα, προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί με ικανότητα μετακίνησης, τα οποία έχουν απομονωθεί κυρίως από το φυσικό περιβάλλον και από τροφές (Yuk et al., 2018). Το *Lelliottia nimipressuralis* αποικίζει φυτά, ενώ το *Lelliottia amnigena* έχει απομονωθεί από κρεμμύδια, ακατέργαστο γάλα, κρέμες, κασικίσιο τυρί και από Ισπανικό λουκάνικο και χρησιμοποιείται ως δείκτης επιμόλυνσης τροφίμων (García Fontán et al., 2007; Liu et al., 2016; Tamagnini et al., 2008). Τα δύο αυτά στελέχη μπορεί να παρουσιάσουν παθογόνο δράση σε ανθρώπους, αλλά και σε φυτά. Το *L. nimipressuralis* έχει απομονωθεί από κλινικά δείγματα αίματος και έχει συνδεθεί με ψευδώς θετικά αποτελέσματα βακτηριαμίας (Kim et al., 2010), ενώ το *L. amnigena* έχει απομονωθεί από ασθενή με ενδοφθαλμίτιδα και από ασθενή που έχει υποβληθεί σε μεταμόσχευση καρδιάς (Bollet et al., 1991; Westerfeld et al., 2009). Ως φυτοπαθογόνο, το *L. amnigena* έχει απομονωθεί από φυτά κρεμμυδιού στην Κίνα, στα οποία προκάλεσε σήψη (Liu et al., 2016). Το στέλεχος *Lelliottia aquatilis* έχει απομονωθεί από πόσιμο νερό (Kämpfer et al., 2018), ενώ το *Lelliottia jeotgali* από αχιβάδες (Yuk et al., 2018).

Lelliottia amnigena έχει απομονωθεί από ρίζες αραβόσιτου στην Ισπανία και βρέθηκε θετικό για την παραγωγή IAA, σιδηροφόρων, απαμινάσης του ACC και για την ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου (Menendez et al., 2016), ενώ στέλεχος με 99,4 % φυλογενετική ομοιότητα με το *L. amnigena* έχει απομονωθεί ως ενδόφυτο από ρίζες φυτών μπανάνας στην Κένυα παρουσιάζοντας τα παραπάνω PGP χαρακτηριστικά (Ngamau et al., 2012). Έχει αποδειχθεί από έρευνες ότι το στέλεχος *L. amnigena* παρουσιάζει παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βιοεξυγίανση εδαφών με υψηλή περιεκτικότητα βαρέων μετάλλων (Cescutti et al., 2005). Το *L. amnigena* έχει επίσης απομονωθεί ως ενδόφυτο από φυτά πατάτας (Reiter et al., 2002) και από φυμάτια του ψυχανθούς *Vicia faba* στη Βόρεια και Νότια Τυνησία (Saïdi et al., 2012).

1.3 Σκευάσματα ενεργών μικροοργανισμών (Bioinoculants)

Τα σκευάσματα ενεργών μικροοργανισμών (bioinoculants) αποτελούν μείγματα ωφέλιμων μικροοργανισμών, τα οποία όταν προστεθούν στο έδαφος αυξάνουν την πυκνότητα του μικροβιακού πληθυσμού στη ριζόσφαιρα και ενισχύουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών στο φυτό ξενιστή, προάγοντας έτσι την ανάπτυξη του φυτού (Tallapragada and Seshagiri, 2017). Τα σκευάσματα αυτά λειτουργούν ως βιολιπάσματα (biofertilizer), βιοδιεγέρτες (biostimulator), ρυθμιστές του αβιοτικού στρες (stress regulator) και ως παράγοντες βιοελέγχου (biocontrol agents) (Tallapragada and Seshagiri, 2017). Οι τρόποι με τους οποίους χορηγούνται τα σκευάσματα ενεργών μικροοργανισμών περιλαμβάνει: (i) εφαρμογή σε σπόρους, (ii) εφαρμογή στη ριζόσφαιρα, (iii) εμφύτευση της ρίζας του φυτού σε ενδεδειγμένη ποσότητα σκευάσματος.

Η εφαρμογή σκευασμάτων ενεργών μικροοργανισμών που περιέχουν PGPR/PGPB, στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των φυτών έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη του βλαστού και της ρίζας τους, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της βιομάζας τους. Έχει αποδειχθεί ότι στελέχη *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp. και *Azospirillum* sp. παρουσιάζουν PGP χαρακτηριστικά, τα οποία τα καθιστούν κατάλληλα για τη χρήση τους σαν συστατικά σκευασμάτων ενεργών μικροοργανισμών. Η συνδυαστική χορήγηση των PGPR, *Bacillus pumilus* και *Pseudomonas pseudoalcaligenes* σε καλλιέργειες *Oryza sativa* L. φαίνεται να προάγει την ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (Jha and Subramanian, 2013). Τα εμβολιασμένα φυτά παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης, υψηλότερο ξηρό βάρος και ύψος, περισσότερη βλάστηση και μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα θρεπτικά συστατικά, άζωτο (N), φώσφορος (P) και κάλιο (K) (Jha and Subramanian, 2013). Ο εμβολιασμός του φυτού *Triticum aestivum* L. με τα στελέχη, *Pseudomonas putida* W2 και *P. fluorescens* W17 προσέφερε προστασία και προαγωγή της ανάπτυξης του φυτού σε συνθήκες αλατότητας (Nadeem et al., 2010). Τα εμβολιασμένα φυτά παρουσίασαν αύξηση του ύψους του βλαστού και του μεγέθους της ρίζας, καθώς και ενίσχυση της καλλιέργειας. Η παραγωγή απαμινάσης του ACC από τα παραπάνω στελέχη θεωρήθηκε υπεύθυνη για την προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών *Triticum aestivum* L. (Nadeem et al., 2010). Θετική ήταν και η επίδραση των στελεχών *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* και *Azospirillum lipoferum* σε φυτά *Brassica napus* L. σε συνθήκες αλατότητας (Saber et al., 2013). Ολοένα και περισσότερα στελέχη PGPR/PGPB έχουν μελετηθεί για τις ιδιότητές τους και αρκετά από αυτά έχουν εμπορευματοποιηθεί ως σκευάσματα ενεργών μικροοργανισμών, με κύριους εκπροσώπους τα γένη, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* και *Agrobacterium* (Saharan and Nehra, 2011). Βακτήρια και του γένους *Pseudomonas* χρησιμοποιούνται ευρέως στην αγορά σε σκευάσματα ενεργών μικροοργανισμών, με σημαντικότερο πλεονέκτημα την ικανότητά τους να παράγουν υψηλά επίπεδα IAA σε φυσικές συνθήκες, αλλά και σε συνθήκες αβιοτικού στρες (Bano and Musarrat, 2004; Pandey et al., 2011).

Σημαντική είναι η συμβολή των μυκήτων και ιδιαίτερα των ενδο-μυκορριζικών μυκήτων (Arbuscular Mycorrhiza Fungi, AMF) στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών. Οι AMF ανήκουν στο φύλο Glomeromycota και συμβιώνουν υποχρεωτικά με αυτότροφους οργανισμούς, κυρίως στις ρίζες των φυτών (Fitter, 2005). Οι μύκητες αυτοί σχηματίζουν θυσάνους (arbuscules) στο εσωτερικό των ριζών, μέσω των οποίων μεταφέρουν φωσφορικά

ιόντα στο φυτό, ενώ ταυτόχρονα οι ίδιοι προσπορίζονται υδατάνθρακες από αυτό (Smith et al., 2001). Η ανταλλαγή υδατανθράκων και φωσφόρου είναι θεμελιώδης για τη συμβίωση φυτού και AMF. Οι AMF και τα ριζόβια βακτήρια θεωρούνται οι σημαντικότεροι ωφέλιμοι συμβιώτες των φυτών καθώς συμβάλλουν στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, οι AMF από την πλευρά τους αποδίδουν στο φυτό φώσφορο ενώ τα ριζόβια άζωτο (Scheublin and Van Der Heijden, 2006). Η συμβίωση AMF, ριζοβίων και ψυχανθών μπορεί να είναι επωφελής ή ζημιογόνα (Franzini et al., 2010; Scheublin and Van Der Heijden, 2006; Xiao et al., 2010). Σειρά ερευνών έχει δείξει ότι η συνεργιστική δράση AMF με ορισμένα στελέχη βακτηρίων συμβάλλει στην ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών με έμμεσο τρόπο, διευκολύνοντας την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, ενισχύοντας ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και αναστέλλοντας τη δράση φυτοπαθογόνων μυκήτων (Abohatem et al., 2011; Barea et al., 2002; Gamalero et al., 2002; Wehner et al., 2010). Επομένως, ο συνδυασμός AMF με τα κατάλληλα PGPR/PGPB για τη σύνθεση σκευασμάτων ενεργών μικροοργανισμών θα συνέβαλλε σημαντικά στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών. Η χορήγηση *Azospirillum* σε συνδυασμό με AMF σε φυτά ρυζιού φαίνεται να συνέβαλλε στη βελτίωση της ανάπτυξης φυτών σε συνθήκες ξηρασίας (Ruiz-Sánchez et al., 2010). Η συνεργιστική δράση του AMF *Glomus mosseae* με το ριζόβιο *Mesorhizobium mediterraneum* σε φυτά *Lathyrus sativus* φαίνεται να μείωσε την αρνητική επίδραση της αλατότητας στη θρέψη και την ανάπτυξη του φυτού, συγκριτικά με τα μη εμβολιασμένα φυτά (Jin et al., 2010). Ο εμβολιασμός φυτών *Phaseolus vulgaris* L. με το ριζόβιο στέλεχος, *Rhizobium tropici* CIAT899 και τον AMF, *Glomus intraradices* βελτίωσε την αποδοτικότητα της χρήσης του φωσφόρου, συνέβαλλε στη θρέψη του φυτού με άζωτο, αύξησε την απόδοση της καλλιέργειας και προσέφερε προστασία απέναντι σε φυτοπαθογόνους μύκητες (Tajini, 2012). Η εφαρμογή των βακτηριακών στελεχών *Bacillus megaterium* και *Pseudomonas fluorescens*, σε συνδυασμό με τον AMF *Glomus fasciculatum* έδειξε να αυξάνει την ανάπτυξη και τη βιομάζα φυτών *Ocimum basilicum* (Hemavathi et al., 2006). Η συνδυαστική δράση του στελέχους *Pseudomonas fluorescens* με τους μύκητες *Glomus mosseae* και *Acaulospora laevis* ευνόησε την πρόσληψη φωσφόρου από λίπανση και συνέβαλλε στην αύξηση της καλλιέργειας φυτών *Capsicum annuum* (Tanwar et al., 2013).

Η εμπορευματοποίηση των PGPB/PGPR και των AMF είναι σημαντική για την ανάπτυξη της αειφόρου γεωργίας και απαιτεί συντονισμένη δράση επιστημονικών φορέων και βιομηχανιών. Ορισμένα από τα στάδια που ακολουθούνται για την εμπορευματοποίηση ενός μικροοργανισμού, είναι αρχικά η απομόνωσή του και η μελέτη των ιδιοτήτων του, η μελέτη της δράσης του εναντίων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, η διερεύνηση της ικανότητάς του να αποικίζει με εκ νέου μόλυνση τη ριζόσφαιρα ή την ενδόσφαιρα του φυτού και να λειτουργεί ενισχύοντας την ανάπτυξή του, η εξέταση της αποδοτικότητάς του στο πεδίο της καλλιέργειας, η μελέτη των απαραίτητων συνθηκών για παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα, ο τοξικολογικός έλεγχος και ο ποιοτικός έλεγχος του σκευάσματος (Nandakumar et al., 2001). Ένας μικροοργανισμός που προορίζεται για χρήση σε εμπορικά σκευάσματα, θα πρέπει να είναι ασφαλής για το περιβάλλον και τον άνθρωπο και να έχει την ικανότητα να συμβιώνει με άλλους ριζόβιους οργανισμούς (Nakkeeran et al., 1970). Το στέλεχος *Bacillus subtilis* είναι ένας μικροοργανισμός που παράγει σπόρια τα οποία είναι ανθεκτικά σε ακραίες τιμές θερμοκρασίας και pH, σε παρασιτοκτόνα και λιπάσματα. Το πρώτο σκεύασμα με συστατικό το στέλεχος *Bacillus subtilis* παρασκευάστηκε το 1985 στις Ηνωμένες Πολιτείες

(Nakkeeran et al., 1970). Τα στελέχη *B. subtilis* A-13, GB03, GB07 κυκλοφόρησαν στην αγορά με τις ονομασίες, Quantum, Kodiak και Epic αντίστοιχα, με προορισμό την αντιμετώπιση παθογόνων του εδάφους (Nakkeeran et al., 1970). Υπολογίζεται ότι στο 60-75 % των καλλιεργειών βαμβακιού, σόγιας και κηπευτικών στις Ηνωμένες Πολιτείες, χορηγούνται σκευάσματα του στελέχους *B. subtilis*, τα οποία λειτουργούν αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των παθογόνων *Fusarium* και *Rhizoctonia* (Nakkeeran et al., 1970).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει στραφεί το ενδιαφέρον στα σκευάσματα ενεργών μικροοργανισμών, εξαιτίας των εξαιρετικών ικανοτήτων τους να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, μέσω της διαλυτοποίησης φωσφόρου, της παραγωγής φυτοορμονών, της προστασίας απέναντι σε βιοτικό (παθογόνοι μικροοργανισμοί) και αβιοτικό στρες και μέσω της βελτίωσης της αρχιτεκτονικής της ρίζας, η οποία συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από το έδαφος. Η κατανόηση των μηχανισμών δράσης των σκευασμάτων ενεργών μικροοργανισμών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών και την αντιμετώπιση των αβιοτικών καταπονήσεων που προκαλούνται από την κλιματική αλλαγή, με την εφαρμογή γεωργικών πρακτικών φιλικών προς το περιβάλλον (Tallapragada and Seshagiri, 2017).

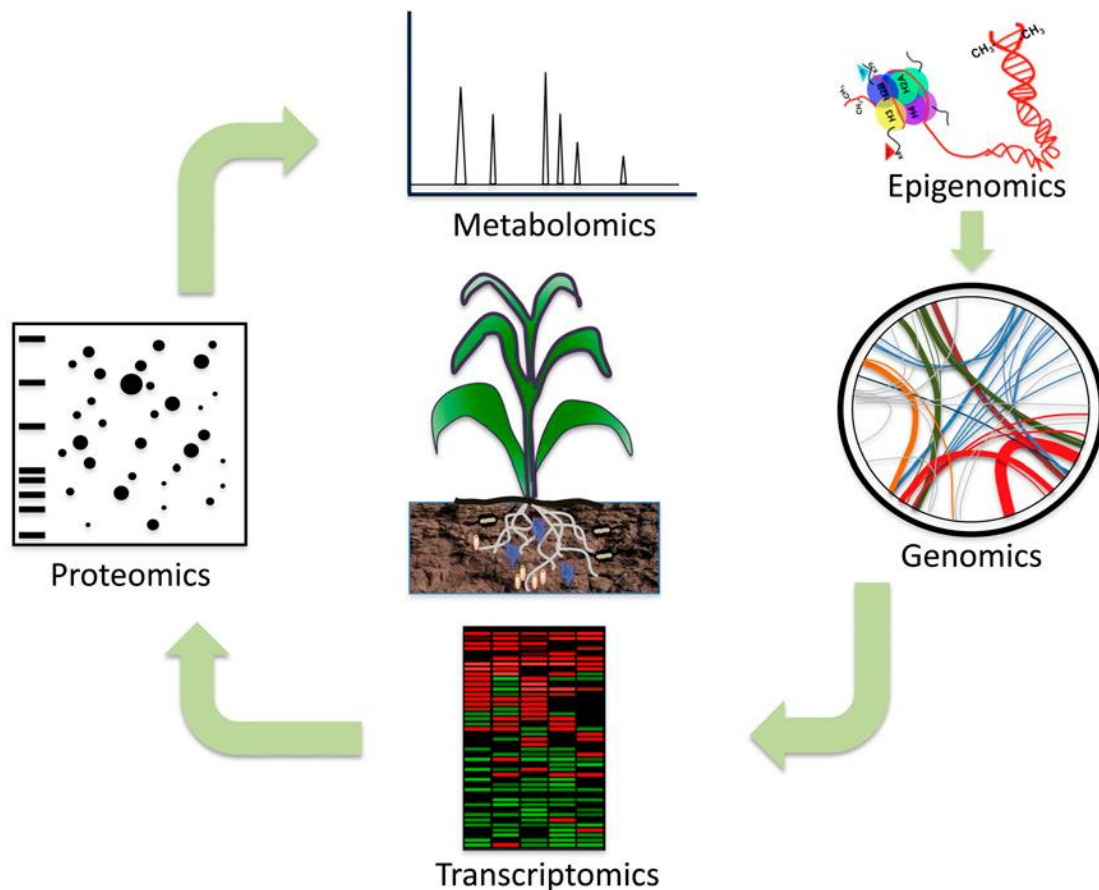
1.4 Γονιδιώματα ενδοφύτων

Το γονιδίωμα των ενδοφύτων παρουσιάζει ορισμένες ομοιότητες με αυτό των φυτοπαθογόνων, ωστόσο, οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί και η έκφραση του γονιδιώματός τους διαφέρουν, γεγονός το οποίο ερμηνεύει τον διαφορετικό συντονισμό των δραστηριοτήτων και τρόπο κυτταρικής επικοινωνίας που παρουσιάζουν οι δύο λειτουργικές κατηγορίες βακτηρίων. Η σύγκριση των λειτουργιών και των γονιδιωμάτων των συμβιωτικών και παθογόνων μικροοργανισμών, με τη χρήση βιοχημικών και ομικών τεχνολογιών, μπορεί να αποκαλύψει τις διαφορές στον τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο με το φυτό ξενιστή, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη νέων τεχνικών αειφόρου γεωπονίας (Kaul et al., 2016; Leveau, 2007; Lòpez-Fernàndez et al., 2015).

1.4.1 Γονιδιωματική ανάλυση

Η ανάλυση του γονιδιώματος των ενδοφυτικών μικροοργανισμών έχει ανοίξει το δρόμο για την ταυτοποίηση, απομόνωση και χαρακτηρισμό γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη συμβιωτική τους σχέση με τα φυτά ξενιστές. Γονίδια τα οποία συναντώνται συχνά στα γονιδιώματα των ενδοφυτικών PGPB είναι υπεύθυνα για την αζωτοδέσμευση, για την παραγωγή φυτοορμονών (IAA, γιβερρελλινών, κ.α.), για τη συσσώρευση σιδήρου, φωσφόρου και άλλων ορυκτών, για την αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και για μηχανισμούς προσκόλλησης σε επιφάνειες του ξενιστή. Η μελέτη των γονιδίων αυτών μπορεί να αποκαλύψει τις στρατηγικές που ακολουθούνται κατά την αποίκιση της ενδόσφαιρας των φυτών από τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς και να ερμηνεύσει τη συμβολή των ενδοφύτων στον κύκλο των θρεπτικών ουσιών στη ριζόσφαιρα (Firincieli et al., 2015; Fouts et al., 2008; Martínez-García et al., 2015). Επιπροσθέτως, η αλληλούχιση των γονιδιωμάτων των ενδοφυτικών μικροοργανισμών έχει οδηγήσει στην αποκάλυψη γονιδίων που σχετίζονται με μεταβολικές δραστηριότητες των βακτηριακών στελεχών, όπως και γονιδίων που εμπλέκονται στην προτίμηση του ξενιστή τους. Τέτοια γονίδια είναι αυτά που ευθύνονται για την παραγωγή αντιβιοτικών, όπως και για την αντοχή σε αντιβιοτικά, για την προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών, για τη λειτουργία των εκκριτικών συστημάτων και για

άλλες μεταβολικές διεργασίες. Η ανάλυση του γονιδιώματος του ενδόφυτου *Pantoea ananatis*, το οποίο έχει απομονωθεί από την ενδόσφαιρα του φυτού *Oryza sativa* L., κοντά στον ποταμό Γουαδαλκιβίρ στην Ισπανία, αποκάλυψε την ύπαρξη γονιδίων συνθάσης και υδρολάσης της λακτόνης της N-ακυλομοσερίνης (N-acylhomoserine lactone, AHL), ένα σηματοδοτικό μόριο που εμπλέκεται στο μηχανισμό διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας, όπως και την ύπαρξη των γονιδίων *yidQ*, *yidP* και *yidR*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση των κυττάρων σε διάφορες επιφάνειες και συμβάλλουν στην αποίκιση του ξενιστή (Megías et al., 2016). Επίσης απομονώθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στα εκκριτικά συστήματα τύπου I, IV, V και VI, όπως και γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή IAA και σιδηροφόρων και για αντοχή στο φουμαρικό οξύ (Megías et al., 2016). Η ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους *Enterobacter* sp. 638 σε συνδυασμό με την εφαρμογή συγκριτικής γονιδιωματικής ανάλυσης αποκάλυψαν την ύπαρξη γονιδίων τα οποία συμβάλλουν στην αντιμετώπιση παραγόντων αβιοτικών καταπονήσεων, στην πρόσληψη των θρεπτικών ουσιών που εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών, στη βιοσύνθεση τριχιδίων (*pili*), μαστιγίων, κυτταρίνης και αιμοσυγκολλητίνης, η οποία συμβάλλει στην προσκόλληση του βακτηρίου σε επιφάνειες του ξενιστή (Taghavi et al., 2010). Το *Enterobacter* sp. 638 φέρει επίσης γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή σιδηροφόρων και IAA, όπως και για την παραγωγή των αντιμικροβιακών παραγόντων, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και 2-φαινυλοαιθανόλη (Taghavi et al., 2010). Η αλληλούχηση του γονιδιώματος τους στελέχους *Enterobacter* sp. SST3, το οποίο απομονώθηκε από το εσωτερικό του βλαστού φυτού ζαχαροκάλαμου στη Τζαμάικα, έδειξε ότι το στέλεχος αυτό φέρει ένα γονίδιο συνθάσης της λακτόνης της N-ακυλομοσερίνης (AHL), καθώς και ένα γονίδιο ορθόλογο του *iaaH*, το οποίο πιθανότατα συμβάλλει στη παραγωγή IAA και κατά συνέπεια, στη προώθηση της ανάπτυξης του ζαχαροκάλαμου (Gan et al., 2012). Γονιδιωματική ανάλυση του στελέχους *Kosakonia radicincitans*, απομονωμένο από τη ριζόσφαιρα του φυτού *Ilex paraguariensis*, υπέδειξε την παρουσία γονιδίων υπεύθυνων για αζωτοδέσμευση, για διαλυτοποίηση φωσφόρου (*phoC*), όπως και για παραγωγή σιδηροφόρων και την παραγωγή IAA (γονίδιο *ipdC*) (Bergottini et al., 2015). Το διαθέσιμα γονιδιώματα ενδοφυτικών μικροοργανισμών λειτουργούν ως πρότυπα για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των μικροοργανισμών μεταξύ τους αλλά και με τα φυτά. Επιπλέον γονιδιωματική ανάλυση του κάθε στελέχους ξεχωριστά συμβάλλει στη μεταγονιδιωματική, μεταγραφωμική και πρωτεομική μελέτη των ενδοφυτικών μικροοργανισμών. Σημαντική είναι και η μελέτη του γονιδιώματος του φυτού ξενιστή, το οποίο επηρεάζεται από την αποίκισή του από ενδόφυτα (Guo et al., 2015).



Εικόνα 7. Η χρήση ομικών τεχνολογιών για τη μελέτη του δυναμικού των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας, με σκοπό την αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών (Pena and Loyola-Vargas, 2014).

1.4.2 Πολυγονιδιωματική ανάλυση

Η συγκριτική πολυγονιδιωματική ανάλυση συμβάλλει στην κατανόηση των μεταβολικών και γενετικών διαφορών μεταξύ παρόμοιων μικροοργανισμών, οι οποίοι αναπτύσσουν διαφορετικό είδος αλληλοεπιδράσεων με τον ξενιστή τους. Συγκριτικές πολυγονιδιωματικές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει ότι διαφορές στη σύσταση των μεταβολικών, εκκριτικών και πρωτεϊνών-μεταφορέων και των πρωτεϊνών προσκόλλησης συνδέονται άμεσα με την επιλογή διαφορετικών ενδαιτημάτων από τους μικροοργανισμούς. Η σύγκριση των γονιδιωμάτων του ενδοφύτου *Klebsiella pneumoniae* Kp342 και του ανθρώπινου παθογόνου *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές, οι οποίες ερμηνεύουν της διαφορετικές λειτουργίες των δύο αυτών στελεχών (Fouts et al., 2008). Διαφορές παρατηρήθηκαν στο ποσοστό και το είδος των μεταγραφικών παραγόντων και των σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Το στέλεχος Kp342 βρέθηκε να φέρει τουλάχιστον δύο άντι-άντι-σίγμα παράγοντες, οι οποίοι απουσιάζουν από το παθογόνο MGH78578. Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν την έκφραση ενός εναλλακτικού παράγοντα σίγμα, ως απάντηση σε συγκεκριμένα σήματα καταπόνησης. Συστήματα φωσφοτρανσφερασών, τα οποία συμβάλλουν στη ρύθμιση της πρόσληψης και στην ενεργητική μεταφορά υδατανθράκων είναι παρόντα στο γονιδίωμα του Kp342, ενώ απουσιάζουν από το MGH78578, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την πιθανή συνεισφορά του Kp342 σε μηχανισμούς μετακίνησης θρεπτικών συστατικών στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Επιπροσθέτως, το Kp342 παρουσιάζει υψηλότερο ποσοστό γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες κροσσών, οι οποίες

συμμετέχουν στην προσκόλληση των βακτηρίων σε επιφάνειες του ξενιστή (Fouts et al., 2008). Η εφαρμογή συγκριτικής γονιδιωματικής μεταξύ των αλληλουχιών στελεχών *Enterobacter ludwigii*, *Pantoea vagans* και *Erwinia* sp. και στελεχών αναφοράς για το κάθε γένος ξεχωριστά, τα οποία περιλαμβάνουν ανθρώπινα παθογόνα, φυτοπαθογόνα, ενδόφυτα και επιφυτικά στελέχη έδειξε ότι, από τα γονιδιώματα των παθογόνων μικροοργανισμών απουσιάζουν γονίδια υπεύθυνα για την έκφραση ενζύμων αζωτοδέσμευσης και για την έκφραση του σιδηροφόρων εντεροβακτίνης, ερμηνεύοντας έτσι τον διαφορετικό τρόπο λειτουργίας των διαφορετικών ειδών βακτηρίων (López-Fernández et al., 2015). Το ανθρώπινο παθογόνο στέλεχος *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* που χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος αναφοράς για τα βακτήρια του γένους *Enterobacter* στην παραπάνω μελέτη, παρουσίασε υψηλότερο ποσοστό γονιδίων υπεύθυνων για τη δημιουργία μαστιγίων συγκριτικά με τα ενδοφυτικά στελέχη, ένα χαρακτηριστικό που πιθανόν να προσδίδει στο στέλεχος πλεονέκτημα σε διεργασίες επιμόλυνσης (López-Fernández et al., 2015).

1.4.3 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Οι μεταγονιδιωματικές αναλύσεις προσφέρουν πληροφορίες για το σύνολο των αλληλουχιών των μικροοργανισμών που αποικίζουν διαφορετικά οικολογικά ενδιαίτηματα. Κατά τη διεξαγωγή των αναλύσεων απομονώνεται DNA από το σύνολο του βακτηριακού πληθυσμού ενός μικροπεριβάλλοντος και ακολουθεί ανάλυση του γονιδιακού περιεχομένου του. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η απευθείας πρόσβαση στο γονιδίωμα και στις μεταβολικές διεργασίες βακτηριακών στελεχών που είναι δύσκολο να αναπτυχθούν σε εργαστηρικό περιβάλλον, παρακάμπτοντας το χρονοβόρο βήμα της απομόνωσης και μελέτης αποικιών του κάθε είδους ξεχωριστά (Dinsdale et al., 2008). Μεταγονιδιωματικές αναλύσεις του μικροβιακού πληθυσμού ενδοφύτων που έχουν απομονωθεί από ρίζες φυτών *Oryza sativa* στις Φιλιππίνες, αποκάλυψαν πολυάριθμες λειτουργίες που σχετίζονται με την προσαρμογή των ενδοφύτων στο μικροπεριβάλλον της ενδόσφαιρας (Sessitsch et al., 2012). Απομονώθηκαν γονίδια υπεύθυνα για τρία από τα μονοπάτια παραγωγής IAA, για το μονοπάτι της τρυπταμίνης και για τα μονοπάτια IPA και IAM, όπως και γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή σιδηροφόρων, υποδεικνύοντας τη συμβολή των μικροοργανισμών στην προαγωγή της ανάπτυξης του φυτού και στην προστασία του από παθογόνα (Sessitsch et al., 2012). Η παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα αποδόμησης αλογονοποιημένων αρωματικών ενώσεων, οι οποίες αποτελούν συστατικά βακτηριοκτόνων που χορηγούνται στις καλλιέργειες, προσδίδει στα βακτήρια αυτά ένα πλεονέκτημα επιβίωσης. Επιπλέον, βρέθηκε υψηλό ποσοστό γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία συμμετέχουν σε διεργασίες νιτροποίησης, αζωτοδέσμευσης και απονιτριποίησης, υποδεικνύοντας τη συμβολή των ενδοφύτων στον κύκλο του αζώτου (N) (Sessitsch et al., 2012).

1.4.4 Μεταγραφωματική και Μεταμεταγραφωματική ανάλυση

Η μεταγραφωματική αποτελεί την ανάλυση του μεταγραφώματος, δηλαδή την ανάλυση του συνόλου της γονιδιακής έκφρασης και εξετάζει την έκφραση όλων των mRNAs σε έναν οργανισμό. Η μεταμεταγραφωματική, από την άλλη πλευρά, περιλαμβάνει τη συγκριτική ανάλυση των μεταγραφωμάτων του συνόλου των μικροοργανισμών που αλληλοεπιδρούν σε μία μικροβιακή κοινότητα και συμβάλλει στην κατανόηση της συνολικής κυτταρικής απόκρισης των μικροοργανισμών σε εναλλασσόμενα ενδιαίτηματα. Η ταυτόχρονη ανάλυση της έκφρασης του μεταγραφώματος του φυτού ξενιστή θα προσέφερε βαθύτερη γνώση όσον

αφορά στους μηχανισμούς που συμβάλλουν στη συμβιωτική σχέση μεταξύ μικροοργανισμού και ξενιστή. Η ανάλυση του μεταγραφωμάτων του επιφυτικού μικροοργανισμού *Azospirillum brasilense* και του ξενιστή του *Triticum aestivum* (σιτάρι), με την εφαρμογή της μεθόδου αλληλούχισης RNA (RNAseq) αποκάλυψε αλλαγές σε επίπεδο έκφρασης κατά τη διάρκεια της συμβίωσης, και από τις δύο πλευρές (Camilios-Neto et al., 2014). Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης γονιδίων βακτηριακής προσκόλλησης, γονιδίων που σχετίζονται με την προσαρμογής του μικροοργανισμού στο επιφυτικό περιβάλλον, καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται στην αζωτοδέσμευση από το *A. brasilense*. Επίσης, παρατηρήθηκε η έκφραση του γονιδίου *sbrA*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκφραση μιας 40 kDa όξινης πρωτεΐνης η παραγωγή της οποίας επάγεται από την παρουσία ριζικών εκκρίσεων (Van Bastelaere et al., 1993) και είναι απαραίτητη για το χημειοτακτισμό προς ορισμένα σάκχαρα (D-γαλακτόζη, L-αραβινόζη, D-φρουκτόζη) και για την πρόσληψη της D-γαλακτόζης (Van Bastelaere et al., 1999). Η έκφραση του υπεροξειδίου της δισμουτάσης (*sodB*) από το *A. brasilense* υποδηλώνει την ενεργοποίηση των συστημάτων προστασίας απέναντι στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την άμυνα του φυτού ξενιστή. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση ενός συμπλέγματος γονιδίων της νιτρογενάσης (οπερόνιο του *nifHDK*) που κωδικοποιούν την αναγωγή της δινιτρογενάσης και δύο υπομονάδες της νιτρογενάσης (Golden et al., 1991), γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι το *A. brasilense* είναι πιθανόν να αζωτοδεσμεύει (Camilios-Neto et al., 2014). Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση των γονιδίων στο *Triticum aestivum* μετά τον εμβολιασμό του με *A. brasilense* περιλαμβάνουν την έκφραση δύο πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και με την προαγωγή της ανάπτυξης της ρίζας, την αύξηση της έκφρασης της συνθετάσης της γλουταμίνης, ενός ενζύμου που συνδέεται με το μεταβολισμό του αζώτου, και της έκφρασης της νιτρογενάσης, και υποδηλώνουν ότι το *A. brasilense* συμβάλλει στη θρέψη του φυτού με άζωτο. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε η μείωση της έκφρασης της οξειδάσης του ACC (ACC oxidase, ACO), η οποία οδηγεί σε μείωση της παραγωγής αιθυλενίου στις ρίζες του φυτού (Broekaert et al., 2006; Camilios-Neto et al., 2014). μεταγραφωματική ανάλυση σε φυτά σόγιας στη Βραζιλία αποκάλυψε την ύπαρξη πολυάριθμων τμημάτων RNA τα οποία δε σχετίζονταν με το γονιδίωμα του φυτού (Molina et al., 2012). Συγκριτικές αναλύσεις των αλληλουχιών αποκάλυψαν την ύπαρξη ποικίλων παθογόνων, συμβιωτικών και ελεύθερα διαβιούντων μικροοργανισμών σε διαφορετικά δείγματα του φυτού σόγιας, τα οποία περιλάμβαναν μύκητες των κλάσεων των Βασιδιομυκήτων, Ασκομυκήτων, Γλομερομυκήτων και Χυτριομυκήτων, βακτήρια των φύλων: Ακτινοβακτήρια, Πρωτεοβακτήρια (α-, β-, γ-Πρωτεοβακτήρια), Firmicutes και Βακτηριοειδή, καθώς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Molina et al., 2012).

1.4.5 Πρωτεωμική και Μεταπρωτεωμική ανάλυση

Η πρωτεωμική ανάλυση περιλαμβάνει τη μελέτη των πρωτεϊνών που εκφράζονται από έναν οργανισμό (Wilkins et al., 1996), ενώ η μεταπρωτεωμική ανάλυση πραγματεύεται τη μελέτη της λειτουργικής έκφρασης του μεταγονιδιώματος και τη διασαφήνιση των μεταβολικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε μία μικροβιακή κοινότητα τη στιγμή της δειγματοληψίας. Το βασικό εργαλείο της πρωτεωμικής ανάλυσης είναι η φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry, MS) (Pandey and Mann, 2000; Yates et al., 1993). Η μεταπρωτεωμική εκμεταλλεύεται τη φασματομετρία μάζας υψηλής απόδοσης, για τον εκτενή χαρακτηρισμό του συνόλου των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε μία μικροβιακή

κοινότητα. Η συλλογή των πρωτεϊνών από το μικροπεριβάλλον του ενδιαφέροντος μπορεί να διεξαχθεί μέσω άμεσης ή έμμεσης λύσης (Maron et al., 2007). Κατά την άμεση λύση, το σύνολο του πρωτεϊνικού περιεχομένου μίας μικροβιακής κοινότητας απομονώνεται απευθείας από τη φυτική ενδόσφαιρα και αναλύεται, δίνοντας πληροφορίες για τα μεταβολικά προϊόντα των ενδοφύτων σε φυσικές συνθήκες ή συνθήκες στρες, τη δεδομένη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας (Ogunseitian, 1996, 1993). Ωστόσο, η μέθοδος άμεσης λύσης παρουσιάζει ορισμένες τεχνικές δυσκολίες στο χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών του εκχυλίσματος, οι οποίες οφείλονται σε πιθανή επιμόλυνση των δειγμάτων (Maron et al., 2007). Η μέθοδος της έμμεσης λύσης περιλαμβάνει την ανάλυση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός δείγματος ενδοφύτων το οποίο έχει απομονωθεί στο παρελθόν (Ehlers and Cloete, 1999; Maron et al., 2003). Η συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση 2-D ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδου (Yadava et al., 2015), η οποία όμως παρουσιάζει χαμηλή αξιοπιστία κατά την ανάλυση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε χαμηλό ποσοστό (Gygi et al., 2000) ή πρωτεϊνών που παρουσιάζουν υψηλή βασικότητα, υψηλή οξύτητα ή υψηλή υδροφοβικότητα (Lee, 2001). Η μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του στελέχους *Glucanacetobacter diazotrophicus* κατά την αλληλεπίδρασή του με φυτά ζαχροκάλαμου *in vitro* αποκάλυψε τη διαφοροποίηση της έκφρασης 77 πρωτεϊνών, ορισμένες από τις οποίες σχετίζονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των αμινοξέων, των νουκλεοτιδίων, καθώς και με τη μεταγραφική ρύθμιση (Lery et al., 2010). Παρατηρήθηκε επίσης, η διαφοροποίηση της έκφρασης πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την απόκριση του μικροοργανισμού σε συνθήκες στρες, όπως η σαπερονίνη GroEL, η σαπερόνη DnaK και ο παράγοντας επιμήκυνσης Ts. Οι σαπερόνες είναι βοηθητικές πρωτεΐνες αναδίπλωσης πρωτεϊνών και συμβάλλουν στη διατήρηση της λειτουργικής δομής των πρωτεϊνών σε συνθήκες στρες (Lery et al., 2010).

1.4.6 Μεταπρωτεογονιδιωματική

Η Μεταπρωτεογονιδιωματική συνδέει τη γονιδιωματική με την πρωτεομική ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων και επιτρέπει την ταυτοποίηση μεγαλύτερου αριθμού πρωτεϊνών, από ότι η πρωτεομική από μόνη της. Στη Μεταπρωτεογονιδιωματική συνδυάζεται η μεταγονιδιωματική και η μεταπρωτεομική μελέτη του ίδιου δείγματος. Η χρήση της μεταπρωτεογονιδιωματικής προσέγγισης στη μελέτη των ενδοφυτικών μικροοργανισμών της φυλλόσφαιρας και της ριζόσφαιρας φυτών ρυζιού αποκάλυψε ότι παρά την παρουσία γονιδίων *nifH* και στα δύο μικροπεριβάλλοντα, η έκφραση των γονιδίων παρατηρήθηκε μόνο στην περιοχή της ριζόσφαιρας (Knief et al., 2012). Η μεταπρωτεογονιδιωματική ανάλυση του περιεχομένου ενός θρεπτικού μέσου με μοναδική πηγή άνθρακα το μεταξυλόλιο (m-xylene), το οποίο είχε παραμείνει στο εργαστήριο για αρκετά χρόνια, αποκάλυψε την ύπαρξη ενός νέου κλάδου ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναερόβια αποικοδόμηση του μεταξυλολίου (Bozinovski et al., 2014).

Σκοπός της Μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της ποικιλομορφίας των βακτηρίων που αποικίζουν τα ριζικά φυμάτια φυτών μαυρομάτικου φασολιού (*Vigna unguiculata*), τα οποία έχουν συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, καθώς και η μελέτη χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την ικανότητάς τους να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, ώστε να επιλεχθούν εκείνα που φέρουν τα κατάλληλα χαρακτηριστικά για να δοκιμαστούν στον αγρό ως βιολιπάσματα. Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των στελεχών με την εφαρμογή MSLA, για την οποία χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα γονίδια που απαιτούνται για τη διατήρηση της βασικής κυτταρικής λειτουργίας (συστατικά γονίδια) (*gyrB*, *rpoB*, *atpD* και *infB*). Τα γονίδια *atpD* και *infB* απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη, ενώ τα γονίδια *gyrB* και *rpoB* απομονώθηκαν σε προηγούμενες μελέτες από τον κ. Χ. Φωτιάδη. Τα εξεταζόμενα στελέχη μελετήθηκαν για την ικανότητά τους για: (i) διαλυτοποίηση φωσφόρου, (ii) αζωτοδέσμευση, (iii) παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA) και (iv) σιδηροφόρων, (v) ομαδική κινητικότητα, καθώς και για (vi) την αντοχή τους σε αντιβιοτικά. Εκτιμάται ότι, τα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη (PGPB) επάγουν την ανάπτυξη των φυτών με τα οποία αναπτύσσουν συνεργιστικές σχέσεις, κυρίως μέσω των παραπάνω μηχανισμών.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βιολογικό Υλικό

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί από φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού (*Vigna unguiculata* L.) στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από τον κ. Χ. Φωτιάδη και Α. Ταμπακάκη. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η κωδική ονομασία των στελεχών, η ταξινόμησή τους κατά Gram, καθώς και το συγγενέστερο βακτηριακό είδος στο οποίο ανήκουν, με βάση φυλογενετική ανάλυση που είχε πραγματοποιηθεί από τον κ. Χ. Φωτιάδη.

Πίνακας 1. Βακτηριακά στελέχη από φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού.

Κωδική ονομασία	Είδος	Ταξινόμηση κατά Gram
C1.2	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Gram-αρνητικό
C1.5	<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram-αρνητικό
C3.1	<i>Enterobacter mori</i>	Gram-αρνητικό
D2.4	<i>Lelliottia amnigena</i>	Gram-αρνητικό

2.2 Καλλιέργεια και διατήρηση βακτηρίων

Τα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν σε αυτή τη μελέτη αναγεννήθηκαν από τους -80° C με γραμμική επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό LB. Έπειτα από επώαση στους 30° C για 24 ώρες επιλέχθηκαν μονές αποικίες και μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB. Ακολούθησε επώαση στους 30° C υπό ανάδευση στα 180 rpm/min, για 24 ώρες. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε πριν από κάθε βιοδοκιμή.

Για τη διατήρηση των νέων βακτηριακών καλλιεργειών, 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε κατάλληλο δοκιμαστικό σωλήνα χωρητικότητας 2 ml και στη συνέχεια προστέθηκαν 500 ml γλυκερόλης. Το μείγμα ανακινήθηκε σχολαστικά ώστε να ομογενοποιηθεί. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το μείγμα βακτηριακής καλλιέργειας και γλυκερόλης μεταφέρθηκαν για μακροχρόνια αποθήκευση στους -80° C.

2.3 Μέτρηση ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών με φασματοφωτομετρία

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης μίας βακτηριακής καλλιέργειας αυξάνεται ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων και κατά συνέπεια και η μάζα τους. Τα βακτηριακά κύτταρα μίας καλλιέργειας, η οποία έχει αναπτυχθεί σε υγρό θρεπτικό μέσο, έχουν την ικανότητα να σκεδάζουν το διερχόμενο φως. Μία γρήγορη και εύκολη μέθοδος για την εκτίμηση της κυτταρικής μάζας είναι η παρατήρηση της θολερότητας της υγρής καλλιέργειας. Η κυτταρική μάζα είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων, επομένως, η θολερότητα μίας βακτηριακής καλλιέργειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων σε αυτήν (Madigan et al., 2015).

Η θολερότητα ενός δείγματος μετρείται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, μία ακτίνα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προεπιλεγμένου μήκους κύματος (λ) διαπερνά το δείγμα της βακτηριακής καλλιέργειας και προσπίπτει σε ένα φωτοκύτταρο, το οποίο ανιχνεύει τη μη σκεδαζόμενη ακτινοβολία και αποδίδει μετρήσεις σε μονάδα μέτρησης οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD). Οι τιμές μήκους κύματος που χρησιμοποιούνται συχνά για μετρήσεις της πυκνότητας ενός βακτηριακού δείγματος περιλαμβάνουν τα 480 nm (μπλε), τα 540 nm (πράσινο), τα 600 nm (πορτοκαλί) και τα 660

nm (κόκκινη). Ο όρος απορρόφηση (Absorbance, A) χρησιμοποιείται συχνά ως μονάδα μέτρησης, ωστόσο, το φασματοφωτόμετρο αξιολογεί τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Madigan et al., 2015).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (Concentration, C) των κυττάρων ή μίας χημικής ουσίας σε ένα δείγμα, θα πρέπει προηγουμένως να προετοιμαστεί μία πρότυπη καμπύλη, η οποία θα συνδέει τον αριθμό των κυττάρων ή την ποσότητα της χημικής ουσίας που περιέχεται στο δείγμα με τη θολερότητα του δείγματος. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει μία μαθηματική εξίσωση, η οποία χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων ή της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας που αντιστοιχούν στις τιμές οπτικής πυκνότητας που προέκυψαν από τις μετρήσεις φασματοφωτομετρίας (Madigan et al., 2015).

Στην παρούσα διατριβή, η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων των βακτηριακών καλλιεργειών μετρήθηκε με τη χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μήκους κύματος 600 nm (OD₆₀₀).

2.4 Βιοδοκιμή ομαδικής κίνησης βακτηρίων- Swarming Motility

Η ομαδική κίνηση των βακτηρίων εξετάστηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB διαφορετικών συγκεντρώσεων άγαρ-άγαρ* (0,5% w/v και 1,5% w/v). Τα υπό μελέτη στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 30 ° C για 24 ώρες, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. 5 μl βακτηριακής καλλιέργειας κάθε στελέχους εμβολιάστηκαν στο κέντρο ενός swarming τρυβλίου. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30°C για 120 ώρες. Η *Pseudomonas fluorescence* B5 (*P. fluorescence* B5) χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος αναφοράς. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν την ικανότητα να μετακινούνται σε στερεές επιφάνειες, εξαιτίας των μαστιγίων που διαθέτουν (Muriel et al., 2015; Scales et al., 2014).

2.5 Βιοδοκιμή αντοχής βακτηρίων σε συνθήκες αλατότητας

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα ανάπτυξής τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl σε υγρό θρεπτικό μέσο LB. Το στέλεχος *Escherichia coli* DH5- α χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Αρχικά, τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 30 ° C για 24 ώρες, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. 5 μl βακτηριακής καλλιέργειας κάθε στελέχους εμβολιάστηκαν σε δέκα διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με υγρό θρεπτικό μέσο LB διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% και 10%: 1-10%). Τα δείγματα επώαστηκαν για 72 ώρες στους 30°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Η ποσοτικοποίηση της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις φασματοφωτομετρίας στα 600 nm σε συνάρτηση με το χρόνο, κάθε έξι (6) ώρες για διάστημα 72 ωρών.

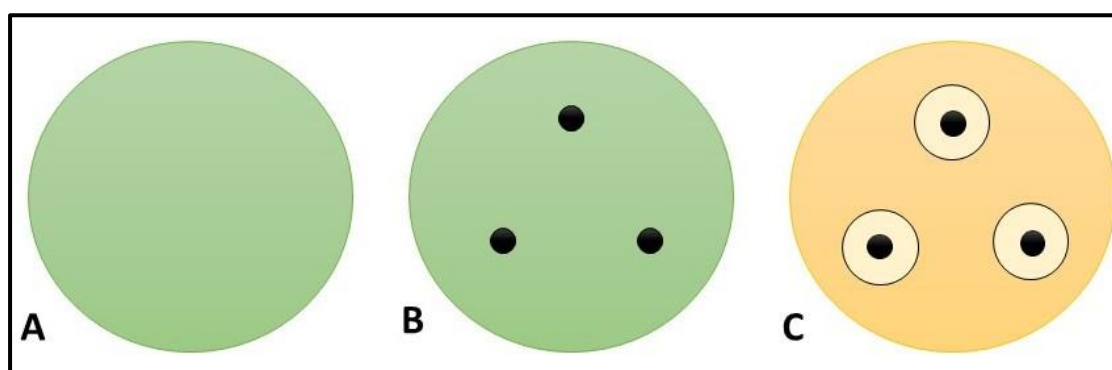
2.6 Βιοδοκιμή διαλυτοποίησης φωσφόρου

Η ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου από τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη εξετάστηκε σε στερεό και υγρό θρεπτικό μέσο NBRIIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium). Εφαρμόστηκε η μέθοδος του Μπλε της Βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue, BPB) και στις δύο περιπτώσεις. Η BPB χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης αλλαγής pH, παρουσιάζοντας τις παρακάτω ιδιότητες: σε όξινο pH < 3,0 έχει κίτρινο χρώμα το οποίο

σταδιακά γίνεται πράσινο σε ουδέτερο pH = 7,0 και καταλήγει σε μπλε σε αλκαλικό pH > 7,0. Τα βακτηριακά στελέχη με ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου εκκρίνουν οργανικά οξέα, συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του pH του θρεπτικού υποστρώματος και εν συνεχεία στην αλλαγή του χρώματός του, από πράσινο σε κίτρινο. Η πηγή άνθρακα του θρεπτικού μέσου αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει την ικανότητα των στελεχών να διαλυτοποιούν φωσφόρο (Nautiyal, 2006; Song et al., 2008). Εξαιτίας αυτού, εξετάστηκε η επιρροή τεσσάρων διαφορετικών πηγών άνθρακα στην ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου.

2.6.1 Ποιοτική μέθοδος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Η ικανότητα διαλυτοποίησης των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών σε στερεό θρεπτικό NBRI υποδεικνύεται αφενός με την παρουσία διαυγών ζωνών στο θρεπτικό υλικό γύρω από τις ανεπτυγμένες βακτηριακές αποικίες και αφετέρου, με την αλλαγή χρώματος του μέσου από πράσινο σε κίτρινο (Εικόνα 8). Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές πηγές άνθρακα: γλυκόζη (GLU), αραβινόζη (ARA), φρουκτόζη (FRU), γλυκερόλη (GLY) και το φωσφορικό ασβέστιο $[Ca_3(PO_4)_2]$ χρησιμοποιήθηκε ως πηγή φωσφόρου. Το στέλεχος *Pseudomonas putida* KT2240 (*P. putida*) χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Προστέθηκε επίσης, η χρωστική Bromophenol Blue (BPB) σε τελική συγκέντρωση 0,025 g/lit.



Εικόνα 8. Σχηματική παρουσίαση αναμενόμενων αποτελεσμάτων βιοδοκιμής ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου σε στερεό NBRI-BPB: (A) τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα NBRI-BPB, (B) απουσία διαλυτοποίησης φωσφόρου σε βακτηριακό στέλεχος ανεπτυγμένο σε NBRI-BPB, (C) παρουσία διαλυτοποίησης φωσφόρου με δημιουργία διαυγούς ζώνης και αλλαγή χρώματος του υποστρώματος από πράσινο σε κίτρινο.

Διαδικασία

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, στους 30° C υπό ανάδευση στα 180 rpm/min για 24 ώρες. Μετρήθηκε η ανάπτυξη των καλλιεργειών στα 600nm. Τα βακτηριακά εμβόλια παρασκευάστηκαν με αραιώση των βακτηριακών καλλιεργειών μέχρι την επιθυμητή οπτική πυκνότητα $OD_{600} = 0,2$ (περίπου 2×10^8 cfu/ml). Ποσότητες των 5 μl, 10μl και 20 μl από κάθε ξεχωριστή βακτηριακή καλλιέργεια εμβολιάστηκαν στην επιφάνεια NBRI-BPB τρυβλίων. Οι σταγόνες αφέθηκαν να στεγνώσουν για 20 λεπτά σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow). Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 30° C για 12 ημέρες.

Η διάμετρος των αποικιών και η διάμετρος της διαυγούς ζώνης διαλυτοποίησης μετρήθηκε 12 ημέρες μετά την επώαση. Ο δείκτης διαλυτοποίησης φωσφόρου (Phosphate

Solubilisation Index, PSI) υπολογίζεται με την παρακάτω εξίσωση (Prenomo et al., 1996) και αποτελεί το πηλίκο της συνολικής διαμέτρου (αποικία και διαυγής ζώνη διαλυτοποίησης) προς τη διάμετρο της αποικίας:

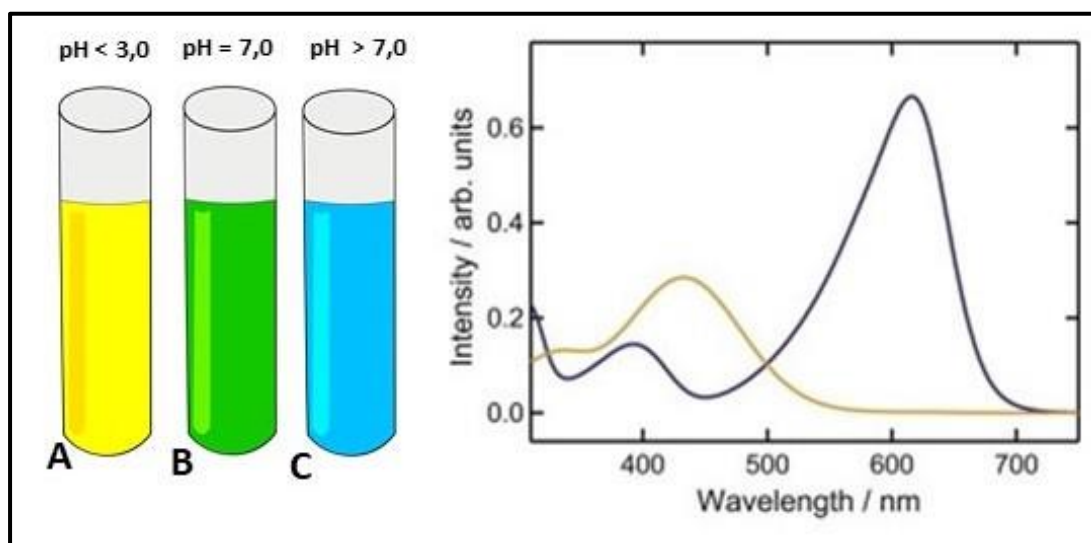
$$\text{Phosphate solubilization index, PSI} = \frac{\text{Colony diameter} + \text{halozone diameter}}{\text{Colony diameter}}$$

Στελέχη με $\text{PSI} > 2$ θεωρούνται θετικά ως προς την ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου.

2.6.2 Ποσοτική μέθοδος σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Η βιοδοκιμή ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP έγινε με χρωματομετρική μέθοδο (Fiske and Subbarow, 1925; Nautiyal, 2006). Η ανίχνευση των χρωματικών αλλαγών του θρεπτικού μέσου εξαιτίας της παραγωγής οργανικών οξέων από τα στελέχη με ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

Το φωσφορικό ασβέστιο $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ χρησιμοποιήθηκε ως πηγή φωσφόρου και η γλυκόζη (GLU) ως πηγή άνθρακα. Η χρωστική BPB προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 0,025 g/lit. Οι χρωματικές αλλαγές της BPB σε υδατικό διάλυμα, σε συνάρτηση με τις αλλαγές στις τιμές pH παρουσιάζονται στην Εικόνα 9. Η αλλαγή του χρώματος του NBRIP, λόγω της παρουσίας BPB, από πράσινο σε κίτρινο υποδεικνύει μείωση του pH και επομένως ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου από το μικροοργανισμό.



Εικόνα 9. Χρωματική αλλαγή της χρωστικής BPB σύμφωνα με τις αλλαγές του pH ενός υδατικού διαλύματος (αριστερά): (A) κίτρινο χρώμα, ενδεικτικό θετικού αποτελέσματος ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου, $\text{pH} < 3$, (B) πράσινο χρώμα, ενδεικτικό αρνητικού αποτελέσματος ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου, $\text{pH} = 7,0$, (C) μπλε χρώμα, ενδεικτικό αλκαλικού $\text{pH} > 7$. Φάσμα απορρόφησης για την κίτρινη και τη μπλε μορφή της BPB (δεξιά). Η μέγιστη απορρόφηση για το κίτρινο χρώμα είναι στα 450 nm, ενώ για το μπλε είναι στα 590 nm.

Καθώς το κίτρινο χρώμα αποτελεί ένδειξη θετικού αποτελέσματος, οι μετρήσεις φασματοφωτομετρίας για την ποσοτικοποίηση της αλλαγής χρώματος του υγρού θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκαν στα 450 nm, όπου και είναι το μέγιστο της απορρόφησης για το κίτρινο χρώμα. Οι μετρήσεις αυτές παρέχουν μια ποσοτική εκτίμηση της ισχύος της διαλυτοποίησης του φωσφορικού ασβεστίου $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ από το κάθε στέλεχος.

Επιπρόσθετα, επιβεβαίωση της οξίνισης του θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις του pH κατά την τρίτη (3^η) ημέρα επώασης των μικροοργανισμών.

Διαδικασία

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 24 ώρες στους 30° C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Το στέλεχος *P. putida* χρησιμοποιήθηκε ως θετικό στέλεχος αναφοράς. 5 μl βακτηριακής καλλιέργειας από κάθε στέλεχος εμβολιάστηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου NBRI-BPB και ακολούθησε επώαση στους 30° C υπό ανάδευση στα 180 rpm/min, για 72 ώρες.

Η ποσοτικοποίηση της αλλαγής χρώματος του θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις φασματοφωτομετρίας στα 450 nm στις 24, 48 και 72 ώρες. Χρησιμοποιήθηκε βακτηριακό εναιώρημα το οποίο παρασκευάστηκε με την παρακάτω διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την απομάκρυνση των βακτηριακών κυττάρων από την καλλιέργεια:

- i. 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε σωλήνα errendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 5000 rpm/min για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου (25° C).
- ii. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα errendorf και χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις φασματοφωτομετρίας.

Μετά το πέρας των 72 ωρών πραγματοποιήθηκε μέτρηση pH του θρεπτικού μέσου.

2.7 Βιοδοκιμή ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε με δύο μεθοδολογίες. Η πρώτη μεθοδολογία περιλαμβάνει τη γραμμική επίστρωση και ανάπτυξη των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Η δεύτερη μεθοδολογία περιλαμβάνει τη μέθοδο της διάχυσης των εμποτισμένων δισκίων (Bauer et al., 1966).

Τα αντιβιοτικά παρασκευάστηκαν ως πυκνά διαλύματα στις επιθυμητές συγκεντρώσεις και στους κατάλληλους διαλύτες για το καθένα (Πίνακας 2) και διατηρήθηκαν στους -20° C ή 4° C, ανάλογα με το είδος του αντιβιοτικού.

2.7.1 Μέθοδος γραμμικής επίστρωσης

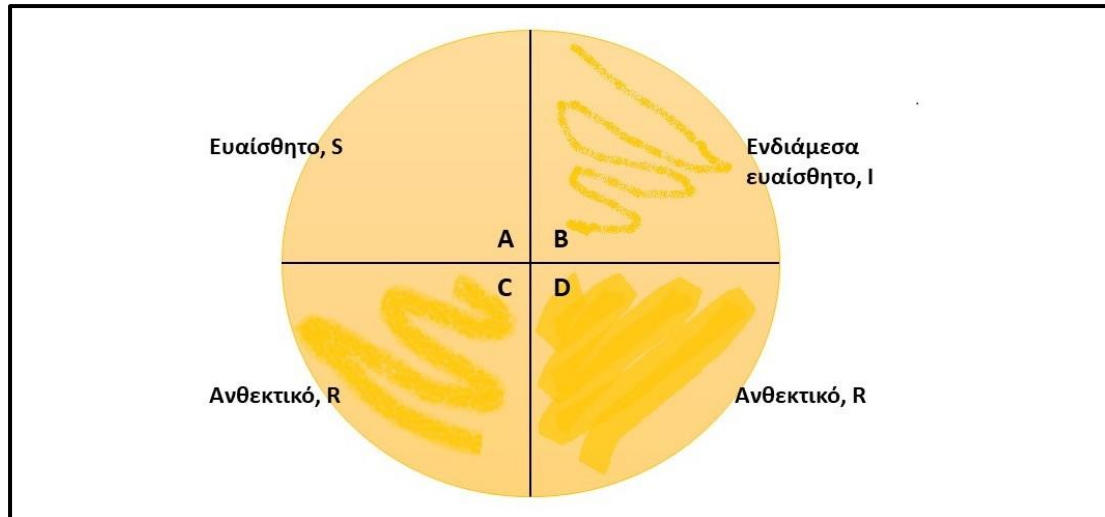
Σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο, η ανθεκτικότητα των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών εξετάστηκε σε διαφορετικά αντιβιοτικά και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με τη μέθοδο της γραμμικής επίστρωσης. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, οι συγκεντρώσεις των πυκνών διαλυμάτων, ο διαλύτης του κάθε αντιβιοτικού και οι τελικές συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν.

Πίνακας 2. Λίστα αντιβιοτικών και Εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ευαισθησίας των μικροοργανισμών.

Αντιβιοτικό	Διαλύτες	Stock solution (mg/ml)	Τελική συγκέντρωση (μg/ml)
Amp (ampicillin)	ddH ₂ O	100	15, 50, 100
Km (kanamycin)	ddH ₂ O	30	15, 30, 60
Str (streptomycin)	ddH ₂ O	100	15, 20
Spc (spectinomycin)	ddH ₂ O	100	15, 50, 100
Nal (nalidixic acid)	ddH ₂ O	15	15
Tc (tetracyclin)	Αιθανόλη	12	15, 7,5
Chl (chloramphenicol)	Αιθανόλη	34	15, 7,5
Clr (chlorithromycin)	ddH ₂ O	50	15, 20
Rif (rifampicin)	ddH ₂ O	50	30
Gen (gentamicin)	ddH ₂ O	40	20, 40

Διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάστηκε το στερεό θρεπτικό μέσο LB, το οποίο μετά από αποστείρωση στο αυτόκαυστο τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 55° C, κατάλληλη θερμοκρασία για την προσθήκη των αντιβιοτικών. Υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση στη δράση των αντιβιοτικών. Το κάθε αντιβιοτικό προστέθηκε στην κατάλληλη τελική συγκέντρωση και στη συνέχεια ακολούθησε επίστρωση τρυβλίων Petri με το μείγμα LB/Agar-αντιβιοτικό. Βακτηριακές καλλιέργειες που είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί σε υγρό LB για 24 ώρες, επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό LB παρουσία αντιβιοτικού και τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30° C για 24 ώρες. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε με καταγραφή της ικανότητας ανάπτυξης κάθε στελέχους σε διάφορα αντιβιοτικά. Η απουσία ανάπτυξης αποτελεί ένδειξη ευαισθησίας (Susceptibility, S) στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, η μέτρια ανάπτυξη αποτελεί ένδειξη ενδιάμεσης ευαισθησίας (Intermediate, I), ενώ η πλήρης ανάπτυξη του μικροοργανισμού αποτελεί ένδειξη ανθεκτικότητας (Resistance, R). Σχηματική παρουσίαση αποτελεσμάτων θετικής, αρνητικής και ενδιάμεσης ανάπτυξης στελεχών παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10. Σχηματική παρουσίαση αναμενόμενων αποτελεσμάτων βιοδοκιμής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τη μέθοδο γραμμικής επίστρωσης σε στερεό LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού: (A) απουσία ανάπτυξης του μικροοργανισμού-ενδεικτική ευαισθησίας (S) στο αντιβιοτικό, (B) μέτρια ανάπτυξη-ενδεικτική ενδιάμεσης ευαισθησίας (I) στο αντιβιοτικό, (C, D) πλήρης ανάπτυξη του μικροοργανισμού-ενδεικτική ανθεκτικότητα (R) στο αντιβιοτικό.

2.7.2 Μέθοδος Kirby-Bauer διάχυσης εμποτισμένων δισκίων αντιβιοτικών

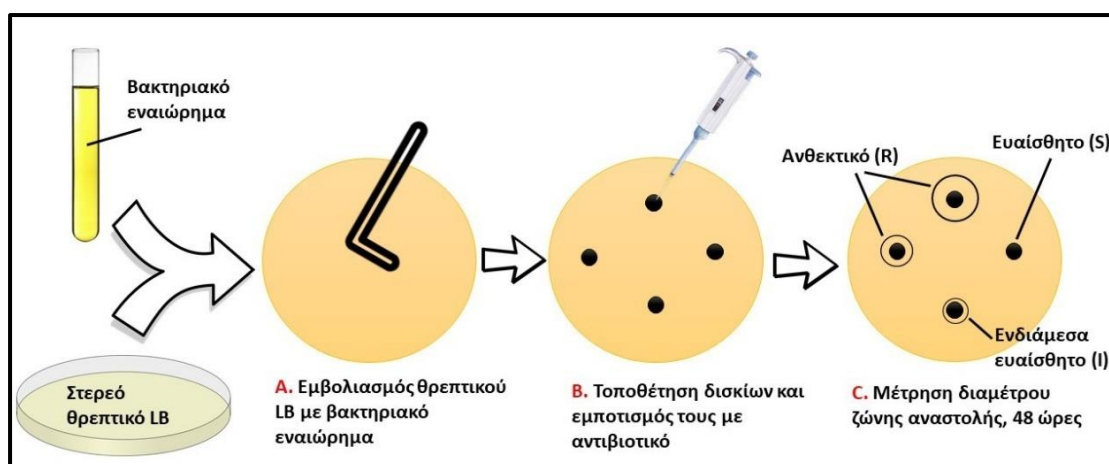
Η ανθεκτικότητα των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών εξετάστηκε με τη χρήση χάρτινων δισκίων εμποτισμένων με επιθυμητές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών σύμφωνα με τη μέθοδο Kirby-Bauer διάχυσης εμποτισμένων δισκίων αντιβιοτικών (Bauer et al., 1966). Τα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν αναγράφονται στον πίνακα 3, ο οποίος παρουσιάζει: (i) τη συγκέντρωση των πυκνών διαλυμάτων των αντιβιοτικών, (ii) την τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο δισκίο και (iii) το διαλύτη του κάθε αντιβιοτικού.

Πίνακας 3. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο Kirby-Bauer διάχυσης εμποτισμένων δισκίων με αντιβιοτικά, οι συγκεντρώσεις των πυκνών διαλυμάτων, οι διαλύτες των αντιβιοτικών και οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντιβιοτικό	Διαλύτης	Πυκνό διάλυμα mg/ml	Τελική συγκέντρωση μg/ml
Amp (ampicillin)	ddH ₂ O	5	50
Km (kanamycin)	ddH ₂ O	10	50
Str (streptomycin)	ddH ₂ O	3	30
Spc (spectinomycin)	ddH ₂ O	10	100
Nal (nalidixic acid)	ddH ₂ O	1.5, 3	15, 30
Tc (tetracyclin)	Αιθανόλη	3	30
Chl (chloramphenicol)	Αιθανόλη	1	10
Clr (clarithromycin)	ddH ₂ O	1.5	15
Neo (neomycin)	ddH ₂ O	5	50
Gen (gentamycin)	ddH ₂ O	5	50
PenG (penicillin G)	ddH ₂ O	1	10
Cxm (cefuroxime)	ddH ₂ O	3	30

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 24 ώρες στους 30° C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Προετοιμάστηκε το βακτηριακό εναιώρημα

για τον εμβολιασμό των τρυβλίων LB σύμφωνα με το πρότυπο 0.5 MacFarland, το οποίο αντιστοιχεί σε $1,5 \times 10^8$ cfu/ml και σε απορρόφηση στα 625 nm ίση με 0,08 – 0,13 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012; McFarland, 1907). 100 μl βακτηριακής καλλιέργειας επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν για 3-5 λεπτά μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής σε θερμοκρασία δωματίου (25° C). Χάρτινα μη εμποτισμένα δισκία διαμέτρου 9 mm τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια των ενοφθαλμισμένων τρυβλίων με τη χρήση αποστειρωμένων λαβίδων και με την άσκηση ήπιας πίεσης, ώστε να έρθουν σε πλήρη επαφή με την επιφάνεια του θρεπτικού μέσου. Η πίεση αυτή ωφελεί στη διασφάλιση της σταθερότητας θέσης τους, καθώς και στη μεταφορά υγρασίας στο δισκίο η οποία βοηθά μετέπειτα στη διάχυση του αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο. Κάθε δισκίο εμποτίστηκε με 20 μl διαφορετικών αντιβιοτικών διαφόρων συγκεντρώσεων, με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας μεταβλητού όγκου. Τα τρυβλία επώστηκαν στους 30° C για 48 ώρες, οπότε και μετρήθηκε η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από κάθε εμποτισμένο δισκίο. Σύμφωνα με τις μετρήσεις το κάθε στέλεχος χαρακτηρίστηκε ως: ανθεκτικό (Resistant, R), ενδιάμεσα ευαίσθητο (Intermediate, I) και ευαίσθητο (Susceptible, S). Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται συνοπτικά στην Εικόνα 11.



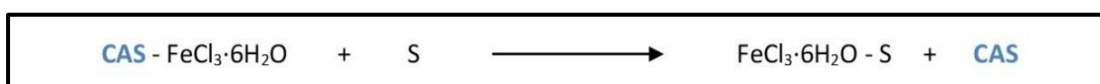
Εικόνα 11. Περιγραφή της τεχνικής διάχυσης εμποτισμένων δισκίων κατά Kirby-Bauer: (A) 100 μl βακτηριακού εναιωρήματος πυκνότητας 0,5 MacFarland εμβολιάζεται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB με τη χρήση γυάλινης ράβδου, (B) τοποθέτηση χάρτινων δισκίων και εμποτισμός τους με κατάλληλο αντιβιοτικό και επώαση στους 30° C για 48 ώρες, (C) μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης παρεμπόδισης και χαρακτηρισμός του μικροοργανισμού ως ευαίσθητο (Susceptible, S), μέτρια ευαίσθητο (Intermediate, I) και ανθεκτικό (Resistant, R).

2.8 Παραγωγή σιδηροφόρων

Για τη βιοδοκιμή ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων εφαρμόστηκε η τεχνική O-CAS (Overlay Chrome Azurol S) (Pérez-Miranda et al., 2007), η οποία αποτελεί τροποποιημένη εκδοχή της κλασικής μεθόδου CAS (Schwyn and Neilands, 1987). Η εφαρμογή της τεχνικής O-CAS περιλαμβάνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών με μορφή κηλίδων σε στερεό θρεπτικό μέσο, κατάλληλο για τον κάθε οργανισμό, για 24 ώρες και ακολουθεί επίστρωση του τρυβλίου με μείγμα CAS στην επιφάνεια των ανεπτυγμένων αποικιών. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής παρατηρήθηκε ανάπτυξη των βακτηριακών καλλιεργειών στο επίστρωμα CAS, γεγονός το οποίο οδηγεί σε σφάλματα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην εφαρμογή μίας τροποποιημένης μορφής της τεχνικής O-CAS, η οποία

περιλαμβάνει την επίστρωση του μείγματος CAS σε στερεό θρεπτικό μέσο και τον επακόλουθο εμβολιασμό του τρυβλίου με τον επιθυμητό μικροοργανισμό. Η τροποποιημένη αυτή εκδοχή ενέχει κίνδυνο αναστολής της ανάπτυξης των αποικιών των μικροοργανισμών για δύο κυρίως λόγους: (i) το μείγμα CAS δεν περιέχει θρεπτικά συστατικά ικανά να προωθήσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών και (ii) το μείγμα CAS περιέχει τη βακτηριοκτόνο ουσία CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) η οποία παρεμποδίζει την ανάπτυξη Gram θετικών βακτηρίων, μυκήτων και ορισμένων Gram αρνητικών βακτηρίων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 5 βακτηριακά στελέχη αναφοράς. Ως θετικά στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: *P. fluorescens* X, *P. fluorescens* B5, *P. fluorescens* 2-75, *P. putida* KT2240 και ως αρνητικό στέλεχος αναφοράς το *E. coli*.

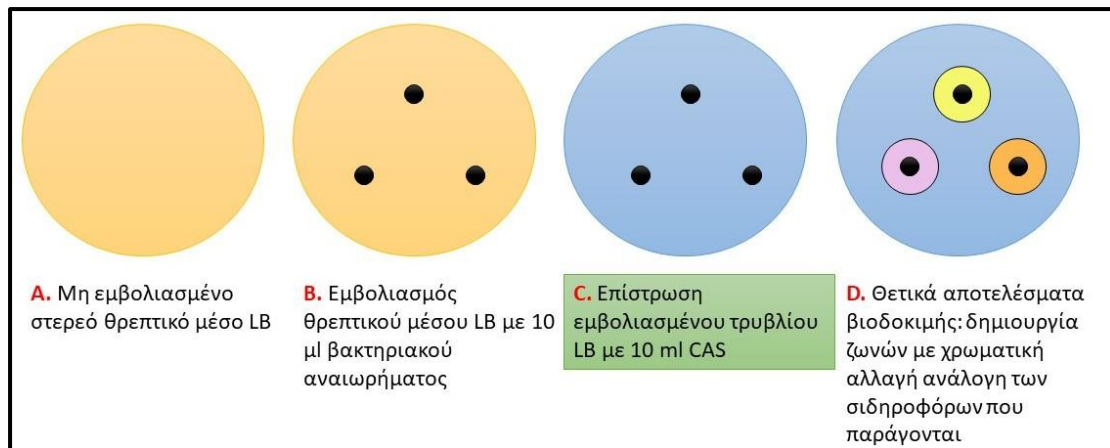
Η χρήση του μείγματος CAS για την ανίχνευση παραγωγής σιδηροφόρων από τους μικροοργανισμούς στηρίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ του συμπλόκου Chrome Azurol S - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και των σιδηροφόρων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς, για την απόκτηση σιδήρου ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Τα παραγόμενα σιδηροφόρα έχουν τη δυνατότητα να προσδένουν το σίδηρο ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) με μεγαλύτερη ισχύ και να τον απομακρύνουν από το σύμπλοκο Chrome Azurol S- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Η σχέση αυτή παρουσιάζεται σχηματικά με τον παρακάτω χημική εξίσωση, όπου S (siderophore) είναι το σιδηροφόρο:



Η απελευθέρωση της χρωστικής Chrome Azurol S από το σύμπλοκο με το σίδηρο οδηγεί σε αλλαγή χρώματος του υποστρώματος. Η χρωστική CAS έχει μπλε χρώμα σε pH 6,8. Η δημιουργία διαυγών ζωνών διαφορετικού χρώματος γύρω από τις ανεπτυγμένες βακτηριακές καλλιέργειες αποτελεί ενδεικτικό της ικανότητας του μικροοργανισμού να παράγει σιδηροφόρα και εξαρτάται από το είδος των σιδηροφόρων που απελευθερώνονται. Σιδηροφόρα κατεχολικού τύπου οδηγούν σε αλλαγή χρώματος προς το μωβ, σιδηροφόρα υδροξαμικού τύπου σε αποχρώσεις του πορτοκαλί και σιδηροφόρα καρβοξυλικού τύπου σε αποχρώσεις του κίτρινου (Εικ. 12 και 13).

2.8.1 Τεχνική O-CAS

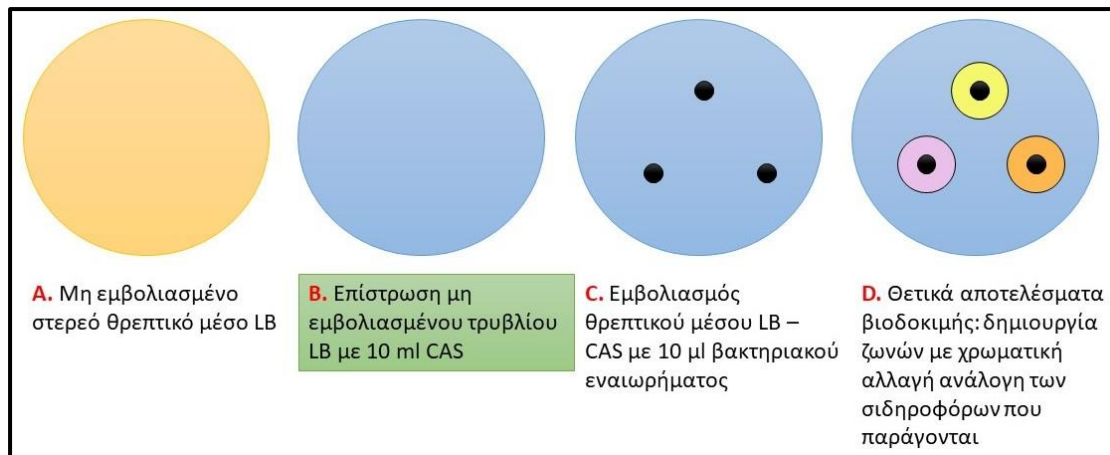
Οι υπό μελέτη μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 24 ώρες, στους 30 °C υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Προετοιμάστηκε βακτηριακό εναιώρημα με $\text{OD}_{600} = 0,5$ για τον εμβολιασμό των τρυβλίων LB. 10 ml βακτηριακού εναιωρήματος από κάθε βακτηριακό στέλεχος ενοφθαλμίστηκε στην επιφάνεια του στερεού LB. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες στους 30° C. Εφόσον αναπτύχθηκαν οι βακτηριακές αποικίες ακολούθησε επίστρωση των τρυβλίων με 10 ml CAS. Ακολούθησε επώαση στους 30° C για 11 ημέρες. Το στέλεχος *P. fluorescens* X χρησιμοποιήθηκε ως θετικό στέλεχος αναφοράς. Στην Εικόνα 12 παρουσιάζεται σχηματικά η παραπάνω διαδικασία.



Εικόνα 12. Σχηματική παρουσίαση της τεχνικής O-CAS κατά Perez-Miranda et al. 2007: (A) μη εμβολιασμένο τρυβλίο LB, (B) εμβολιασμός τρυβλίου LB με τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη και επώαση στους 30° C για 24 ώρες, (C) επίστρωση τρυβλίου με 10 ml CAS και επώαση στους 30° C για 11 ημέρες (διαφοροποίηση από τροποποιημένη εκδοχή τεχνικής), (D) θετικά αποτελέσματα βιοδοκιμής με δημιουργία διαυγών ζωνών διαλυτοποίησης διαφορετικών χρωμάτων γύρω από ανεπτυγμένες καλλιέργειες, μωβ χρώμα-σιδηροφόρα κατεχολικού τύπου, πορτοκαλί χρώμα-σιδηροφόρα υδροξαμικού τύπου, κίτρινο χρώμα-σιδηροφόρα καρβοξυλικού τύπου.

2.8.2 Τροποποιημένη τεχνική O-CAS

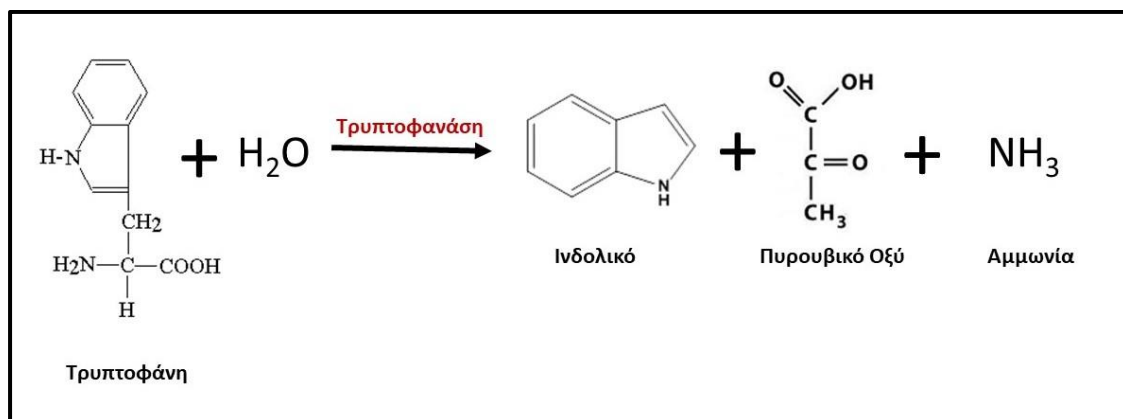
Οι υπό μελέτη μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 24 ώρες, στους 30 °C υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Προετοιμάστηκε βακτηριακό εναιώρημα με $OD_{600} = 0,5$ για τον εμβολιασμό των τρυβλίων. Σε μη εμβολιασμένα τρυβλία LB επιστρώθηκαν 10ml μείγματος CAS και αφέθηκαν να στερεοποιηθούν. 10 μl βακτηριακού εναιωρήματος εναποτέθηκαν με μορφή κηλίδων στην επιφάνεια του μείγματος CAS. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων για 72 ώρες στους 30° C. Ως θετικά στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: *P. fluorescens* X, *P. fluorescens* B5, *P. fluorescens* 2-75, *P. putida* KT2240 και ως αρνητικό στέλεχος αναφοράς το *E. coli*. Τις πρώτες 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των διαμέτρων των διαυγών ζωνών. Σύμφωνα με τους Schwyn και Neilands το μέγεθος της διαμέτρου των διαυγών ζωνών είναι ανάλογο του δυναμικού της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων από τον κάθε μικροοργανισμό (Schwyn and Neilands, 1987). Απουσία διαυγούς ζώνης αντιστοιχεί σε αδυναμία παραγωγής σιδηροφόρων (επίπεδο 1). Διαυγής ζώνη με διάμετρο από 0 cm έως και 1 cm χαρακτηρίζουν ένα μικροοργανισμό ικανό να παράγει σιδηροφόρα και κατατάσσεται στο επίπεδο 2. Στο επίπεδο 3 κατατάσσονται μικροοργανισμοί με διάμετρο διαυγούς ζώνης μεγαλύτερη του 1 cm. Στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται σχηματικά η παραπάνω διαδικασία.



Εικόνα 13. Σχηματική παρουσίαση της τροποποιημένης εκδοχής της τεχνικής O-CAS: (A) μη εμβολιασμένο τρυβλίο LB, (B) επίστρωση τρυβλίου με 10 ml CAS (διαφοροποίηση από τεχνική O-CAS), (C) εμβολιασμός τρυβλίου με τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη και επώαση στους 30° C για 72 ώρες, (D) θετικά αποτελέσματα βιοδοκιμής με δημιουργία ζωνών διαλυτοποίησης διαφορετικών χρωμάτων γύρω από ανεπτυγμένες καλλιέργειες, μωβ χρώμα-σιδηροφόρα κατεχολικού τύπου, πορτοκαλί χρώμα-σιδηροφόρα υδροξαμικού τύπου, κίτρινο χρώμα-σιδηροφόρα καρβοξυλικού τύπου.

2.9 Παραγωγή Ινδολοξικού οξέος (IAA)

Το ινδολοξικό οξύ (Indole Acetic Acid, IAA) αποτελεί προϊόν της αντίδρασης απαμίνωσης της τρυπτοφάνης (L-Tryptophan, L-Trp), η οποία καταλύεται από το ένζυμο τρυπτοφανάση και οδηγεί στην παραγωγή IAA, πυρουβικού οξέος, αμμωνίας και ενέργειας. Η χημική εξίσωση της αντίδρασης αυτής παρατίθεται στην Εικόνα 14. Το πυρουβικό οξύ μεταβολίζεται, σε αντίθεση με το ινδολοξικό οξύ το οποίο αδυνατεί να διασπαστεί και συσσωρεύεται στο θρεπτικό μέσο. Η συσσώρευση του IAA αποτελεί τη βάση βιοδοκιμών για την ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών τα οποία παράγουν τρυπτοφανάση.



Εικόνα 14. Απαμίνωση Τρυπτοφάνης

Η βιοδοκιμή για την ικανότητα παραγωγής IAA πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή δύο διαφορετικών χρωματομετρικών τεχνικών, οι οποίες βασίζονται στη χρήση του αντιδραστήριου Salkowski. Το αντιδραστήριο Salkowski χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ινδολικών ενώσεων σε υδατικά διαλύματα. Η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται PC (Pilet and Chollet, 1970). Στην τεχνική PC χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο R1: 12 g/L FeCl₃ σε διάλυμα 7,9 M H₂SO₄. Η δεύτερη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται S2/1 (Tang and Bonner, 1948). Σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιήθηκε το

αντιδραστήριο R2: 4,5 g/L σε διάλυμα 10,8 M H₂SO₄. Το IAA έχει την ικανότητα να αντιδρά με αντιδραστήρια Salkowski παράγοντας ένα ροζ ή κόκκινο χρωμοφόρο, το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση στα 530 nm. Η ένταση του παραγόμενου κόκκινου χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του IAA στο διάλυμα.

Οι δύο διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα βιοδοκιμή παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία. Η PC τεχνική επιτρέπει την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων IAA σε εύρος από 0,3 µg/ml έως και 20 µg/ml. Αντίθετα, η τεχνική S2/1 παρουσιάζει χαμηλότερη ευαισθησία από την PC τεχνική και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεντρώσεων από 5 µg/ml έως και πάνω από 200 µg/ml. Η συγκέντρωση του IAA εξετάστηκε απουσία και παρουσία εξωγενούς L-Trp (Τρυπτοφάνη) στο θρεπτικό μέσο, η οποία αποτελεί πρόδρομο μόριο του IAA. Μετά την ολοκλήρωση της βιοδοκιμής, αξιολογήθηκε η ακρίβεια του κάθε αντιδραστήριου για τον προσδιορισμό του παραγόμενου IAA από το κάθε στέλεχος.

Οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν είναι οι εξής: *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1, *Lelliottia* sp. D2.4. Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα αντιδραστήρια Salkowski R1 και R2 (βλ. Παράρτημα) και στη συνέχεια προετοιμάστηκαν πρότυπες καμπύλες για κάθε αντιδραστήριο, για τις παρακάτω συγκεντρώσεις IAA: 0,5, 10, 20, 50, 100 µg/ml. Οι πρότυπες καμπύλες χρησιμοποιήθηκαν για τη μετατροπή των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων στα 530 nm, στις ισοδύναμες συγκεντρώσεις IAA (µg/ml).

Διαδικασία

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε 10 ml υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία 500 µg/ml εξωγενούς Trp (+Trp) και απουσία Trp (-Trp) στους 30° C για 8 ημέρες, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min στο σκοτάδι. Μετρήσεις φασματοφωτομετρίας πραγματοποιήθηκαν τη 2^η, 4^η, 6^η και 8^η ημέρα. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο των βακτηριακών καλλιέργειών μετά την εφαρμογή της παρακάτω διαδικασίας: 1,5 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα Eppendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 5,500 g για 10 λεπτά. 1 ml από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν τα αντιδραστήρια R1 και R2 αντίστοιχα.

2.9.1 Τεχνική PC

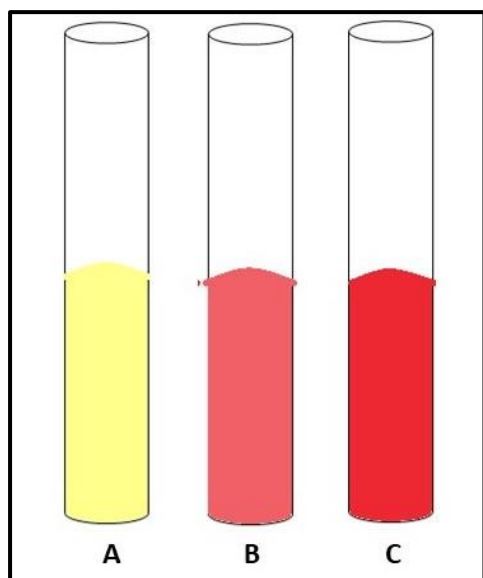
Κατά την εφαρμογή της PC τεχνικής προστέθηκε 1 ml R1 σε 1 ml υπερκείμενου κάθε καλλιέργειας και το διάλυμα αφέθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου 25° C. Ακολούθησαν μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο στα 530 nm.

2.9.2 Τεχνική S2/1

Κατά την εφαρμογή της S2/1 τεχνικής προστέθηκαν 2 ml R2 σε 1 ml υπερκείμενου κάθε βακτηριακής καλλιέργειας και το διάλυμα αφέθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου 25° C. Ακολούθησαν μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο στα 530 nm.

Παρουσία IAA παράγεται χρωμοφόρο ροζ ή κόκκινου χρώματος, ενώ απουσία IAA το διάλυμα έχει κίτρινο χρώμα, το οποίο είναι το χρώμα του υγρού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, LB.

Σχηματική παρουσίαση θετικού και αρνητικού αποτελέσματος για τη βιοδοκιμή παραγωγής IAA παρουσιάζεται στην Εικόνα 15.



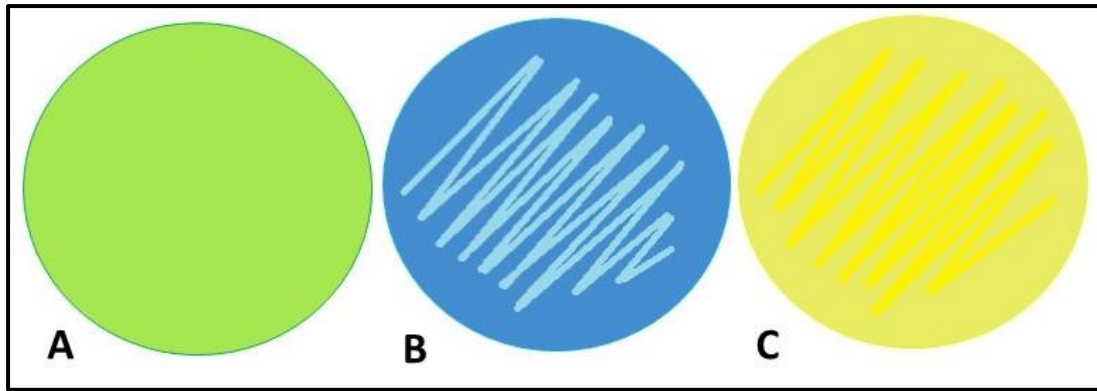
Εικόνα 15. Σχηματική παρουσίαση αναμενόμενων αποτελεσμάτων βιοδοκιμής ικανότητας παραγωγής IAA: (A) κίτρινο χρώμα υγρού θρεπτικού LB, ενδεικτικό αρνητικού αποτελέσματος, (B) ροζ χρώμα-θετικό αποτέλεσμα-μέτρια συγκέντρωση IAA, (C) κόκκινο χρώμα-θετικό αποτέλεσμα-υψηλή συγκέντρωση IAA.

2.10 Βιοδοκιμή αζώτου

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να αφομοιώνουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και να το ανάγουν σε αμμωνία (διαζότροφοι). Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στερεά θρεπτικά μέσα: NFb (pH 6,5) (Deboreiner et al., 1976) και LGI (pH 6,0-6,2) (Lipman, 1904), τα οποία δε διαθέτουν πηγή αζώτου. Στα παραπάνω θρεπτικά υλικά προστέθηκε η χρωστική του Μπλε της Βρωμοθυμόλης (Bromothymol Blue, BTB), η οποία προσδίδει ανοιχτό πράσινο χρώμα στο μέσο σε pH 6,0-6,2 και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης αλλαγής pH. Οι μικροοργανισμοί με ικανότητα αφομοίωσης αζώτου παράγουν αμμωνία, η οποία προκαλεί αλκαλοποίηση του θρεπτικού μέσου, με αποτέλεσμα η BTB να γίνεται μπλε. Σε αντίθετη περίπτωση, όταν ο μικροοργανισμός αδυνατεί να αφομοιώσει άζωτο, παράγει οργανικά οξέα τα οποία προκαλούν οξίνιση του θρεπτικού μέσου, με αποτέλεσμα η BTB να γίνεται κίτρινη. Το *E. coli* χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό στέλεχος αναφοράς.

Διαδικασία

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB, για 24 ώρες στους 30° C. Ακολούθησε επίστρωση της κάθε βακτηριακής καλλιέργειας σε τρυβλία NFb/BTB και LGI/BTB. Τα εμβολιασμένα τρυβλία επώαστηκαν στους 30° C για 48 ώρες. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε το χρώμα του θρεπτικού μέσου, ώστε να διερευνηθεί η ικανότητα των μικροοργανισμών να αφομοιώνουν άζωτο.



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση αναμενόμενων αποτελεσμάτων για τη βιοδοκιμή παραγωγής αζώτου σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα NFb/BTB και LGI/BTB: (A) απουσία ανάπτυξης βακτηριακού στελέχους σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα NFb ή LGI, πράσινο χρώμα pH 6,0-6,4, (B) παρουσία ανάπτυξης βακτηριακού στελέχους με ικανότητα αφομοίωσης αζώτου και παραγωγή αμμωνίας, (C) παρουσία ανάπτυξης βακτηριακού στελέχους με αδυναμία αφομοίωσης αζώτου και παραγωγή οργανικών οξέων.

2.11 Απομόνωση Ολικού Γονιδιωματικού DNA για Gram⁻ (αρνητικά) βακτήρια

Η απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού DNA από τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού kit για καθαρισμό γενομικού DNA της Sigma (GenElute™ 96 Bacterial Genomic DNA Purification Kit). Τα βακτηριακά κύτταρα περιβάλλονται από δύο βασικές δομές: (i) ένα συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα (ii) μία κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση γονιδιωματικού DNA είναι αρνητικά κατά Gram και χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο που προτείνεται από την προμηθεύτρια εταιρεία Sigma, το οποίο παρατίθεται παρακάτω:

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, για 24 ώρες στους 30° C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min.

- i. 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα erpendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12.000 – 16.000 g, για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και απορρίφθηκε.
- ii. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε πλήρως σε 180 μl διαλύματος λύσης T (B6678)
- iii. Προστέθηκαν 20 μl πρωτεΐνάσης K (20 mg/ml) και το δείγμα τοποθετήθηκε στους 55° C για 30 λεπτά.
- iv. Προστέθηκαν 200 μl διαλύματος λύσης C (B8803). Το δείγμα ανακινήθηκε με τη χρήση συσκευής vortex για 15 δευτερόλεπτα και τοποθετήθηκε στους 55° C για 10 λεπτά, ώστε να ομογενοποιηθεί (δείγμα A).
- v. Στήλη δέσμευσης DNA τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα erpendorf χωρητικότητας 2 ml. 500 μl διαλύματος εξισορρόπησης κολώνας (C2112) προστέθηκε στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 1 λεπτό. Το διάλυμα το οποίο διαπέρασε τη στήλη (διήθημα) απομακρύνθηκε.

- vi. 200 ml αιθανόλης (95-100 %) προστέθηκαν στο δείγμα A και ακολούθησε ανακίνηση σε συσκευή vortex για 5-10 δευτερόλεπτα, για να ομογενοποιηθεί το διάλυμα (δείγμα B).
- vii. Το δείγμα B τοποθετήθηκε στη στήλη του βήματος v και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 6500 g για 1 λεπτό. Το erpendorf με το διήθημα απομακρύνθηκε και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf.
- viii. 500 ml διαλύματος έκπλυσης (W0263) προστέθηκαν στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 6.500 g για 1 λεπτό. Το διήθημα απομακρύνθηκε.
- ix. 500 ml συγκεντρωμένου διαλύματος (B6553) τοποθετήθηκαν στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12.000-16.000 g για 3 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί οποιοδήποτε ίχνος αιθανόλης πριν την έκλυση του DNA. Το Erpendorf με το διήθημα απομακρύνθηκε. Η στήλη επαναφυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων αιθανόλης.
- x. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα Erpendorf προστέθηκαν 100 ml ddH₂O και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 6500 g για 1 λεπτό και το διήθημα αποτελεί το προϊόν της απομόνωσης γονιδιωματικού DNA, έκλουσμα 1 και φυλάχθηκε στους - 20° C.
- xi. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα Erpendorf και η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε (βήμα x). Το διήθημα, έκλουσμα 2 φυλάχθηκε στους - 20° C.

2.12 Ανάλυση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ανάλυση DNA σε πηκτή αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει το διαχωρισμό των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων βάσει του μεγέθους και της διαμόρφωσής τους. Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία τεχνική κατά την οποία χρησιμοποιείται η διαφορά ηλεκτρικών φορτίων για το διαχωρισμό μορίων σε ένα μείγμα. Ο διαχωρισμός των γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος του μεγέθους και του φορτίου τους, με τα μικρότερα τμήματα να κινούνται πιο γρήγορα και τα μεγαλύτερα πιο αργά κατά μήκος της πηκτής αγαρόζης. Τα μόρια του DNA φέρουν αρνητικό φορτίο και έτσι όταν τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Η πηκτή αγαρόζης αποτελεί ένα πορώδες σύμπλεγμα, η σύσταση του οποίου καθορίζει το εύρος των μεγεθών τα οποία μπορούν να διαχωριστούν. Μία πηκτή χαμηλής πυκνότητας αγαρόζης, με σχετικά μεγάλους πόρους, ευνοεί το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA εύρους 1-30 kb. Αντίθετα, μία πηκτή υψηλής πυκνότητας αγαρόζης, η οποία διαθέτει μικρότερους πόρους ευνοεί το διαχωρισμό μικρότερων μορίων DNA εύρους 1-300 bp. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε μία πηκτή αγαρόζης σύμφωνα με τη σύστασή της παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Τα διαχωρισμένα τμήματα του DNA καθίστανται ορατά παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide, EtBr) στο πήκτωμα. Το EtBr είναι μία τοξική χημική ουσία με ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων στη διπλή έλικα του DNA. Η σύσταση της πηκτής αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 % και παρασκευάστηκε με την παρακάτω διαδικασία:

- i. 2,5 g αγαρόζης προστέθηκαν σε 250 ml 1 x TBE σε κωνική φιάλη Erlenmeyer και το μείγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές.

- ii. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει μέχρι τη θερμοκρασία των 55° C, οπότε και προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml.
- iii. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε εκμαγείο και αφέθηκε να στερεοποιηθεί (10-15 min). Το εκμαγείο προετοιμάστηκε κλείνοντας τις ανοιχτές πλευρές του με χαρτοταινία και προσαρμόζοντας την κατάλληλη χτένα, ώστε να δημιουργηθούν βοθρία (θέσεις υποδοχής των δειγμάτων) στην πηκτή αγαρόζης.
- iv. Αφού το πήκτωμα στερεοποιήθηκε, αφαιρέθηκε η χτένα και το πήκτωμα μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη δεξαμενή προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 1 x TBE, ποσότητας ικανής να καλύπτει μέχρι και 1-2 mm από την επιφάνεια της πηκτής αγαρόζης.
- v. Τα δείγματα DNA προς ηλεκτροφόρηση αναμείχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (1/10 του όγκου του δείγματος) και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στις θέσεις υποδοχής με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου. Οι θέσεις υποδοχής έχουν χωρητικότητα 30 μl, έτσι η ποσότητα του δείγματος μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δε θα πρέπει να υπερβαίνει τον όγκο αυτό.
- vi. Εφαρμόστηκε ηλεκτρική τάση ανάλογη της απόστασης των ηλεκτροδίων της συσκευής ηλεκτροφόρησης και του μεγέθους των μορίων DNA, η οποία δεν υπερβαίνει τα 60 V/cm.
- vii. Η ηλεκτροφόρηση τερματίστηκε όταν επιτεύχθηκε ο επιθυμητός διαχωρισμός των μορίων DNA του δείγματος.
- viii. Ακολούθησε παρατήρηση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.13 Απομόνωση ζώνης DNA από πηκτή αγαρόζης

Η ανάκτηση του τμήματος DNA από πηκτή αγαρόζης γίνεται με τη χρήση του GenElute Gel Extraction Kit της Sigma με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- i. Το τμήμα αγαρόζης με την επιθυμητή ζώνη DNA απομονώθηκε με τη χρήση καθαρού νυστεριού.
- ii. Το τμήμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα Eppendorf χωρητικότητας 1,5 ml και στη συνέχεια ζυγίστηκε.
- iii. Προστέθηκαν 3 όγκοι διαλύματος διαλυτοποίησης (Gel Solubilization Solution) (π.χ. για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης προστέθηκαν 300 μl διαλύματος διαλυτοποίησης) και το μείγμα επώαστηκε στους 50° C για 10 λεπτά. Η ανακίνηση σε συσκευή vortex για 2-3 λεπτά κατά τη διάρκεια της επώασης μπορεί να βοηθήσει στη διάλυση της αγαρόζης.
- iv. Παράλληλα προετοιμάστηκε η στήλη. 500 μl διαλύματος εξισορρόπησης (Column Preparation Solution) προστέθηκαν στη στήλη και αφέθηκαν να διαπεράσουν τη μεμβράνη της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα εξισορρόπησης βελτιστοποιεί την ικανότητα της μεμβράνης να προσδένει DNA.
- v. Στο μείγμα διαλυμένης αγαρόζης προστίθεται 1 όγκος 100 % ισοπροπανόλης (π.χ. 100 μl ισοπροπανόλης για 100 mg πηκτής αγαρόζης).
- vi. Το μείγμα μεταφέρθηκε στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 1 λεπτό. Το DNA προσδέθηκε στη στήλη και το Eppendorf που περιέχει το διήθημα απομακρύνθηκε.

- vii. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλήφθηκε για ακόμη 1 λεπτό, όταν ο όγκος της διαλυμένης αγαρόζης ήταν μεγαλύτερος από τη χωρητικότητα της στήλης.
- viii. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με την προσθήκη 700 μl διαλύματος έκπλυσης και φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 λεπτό. Το διήθημα απομακρύνθηκε και η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε για ακόμη 1 λεπτό για απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης.
- ix. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα Eppendorf για την έκλουση του DNA. 30 μl ddH₂O προστέθηκαν στη στήλη και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και το διήθημα, έκλουσμα 1 αποθηκεύτηκε στους - 20° C.
- x. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα Eppendorf οπότε και προστέθηκαν 20 μl ddH₂O τα οποία αφέθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 1 λεπτό και το διήθημα, έκλουσμα 2 αποθηκεύτηκε στους - 20° C.

2.14 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης καθώς και της καθαρότητας ενός δείγματος DNA πραγματοποιείται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικροποσοτήτων, υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) (NanoDrop™ ND-1000 spectrophotometer-Thermo Fisher). Μετριέται η απορρόφηση του δείγματος στα 230 nm, στα 260 nm και στα 280 nm. Το σύστημα είναι συνδεδεμένο με έναν υπολογιστή, ο οποίος φέρει τα κατάλληλα λογισμικά για την πραγματοποίηση των μετρήσεων καθώς επίσης χρησιμεύει και στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων συγκέντρωσης του δείγματος DNA σε ng/μl και καθαρότητας δείγματος (λόγοι: $A_{260/280}$ και $A_{260/230}$). Ο επιθυμητός λόγος 260/280 είναι περίπου 1,8. Τιμές χαμηλότερες του 1,8 είναι ενδεικτικές παρουσίας προσμίξεων (π.χ. πρωτεϊνών, φαινόλης κ.α.), τα οποία απορροφούν στα 280 nm και μειώνουν το λόγο 260/280. Ένας επιθυμητός λόγος 260/230 κυμαίνεται στα 2,0-2,2. Χαμηλότερες τιμές υποδεικνύουν την ύπαρξη προσμίξεων πρωτεϊνών, αλάτων, ουρίας, φαινόλης, υδατανθράκων τα οποία απορροφούν στα 230 nm μειώνοντας το λόγο 260/230.

Διαδικασία

Πριν την έναρξη των μετρήσεων επιλέχθηκε το αντίστοιχο λογισμικό της συσκευής για φωτομέτρηση DNA δειγμάτων. Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε 1 μl ddH₂O, το οποίο αποτελεί και το διαλύτη των δειγμάτων DNA. Στη συνέχεια, ποσότητα 1 μl από το κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε και υπολογίστηκε η ποσότητα του DNA σε ng/μl και οι λόγοι $A_{260/280}$ και $A_{260/230}$, οι οποίοι είναι ενδεικτικοί της καθαρότητας του δείγματος.

2.15 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (DNA sequencing)

Η PCR αποτελεί μία γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδο *in vitro*, η οποία εφευρέθηκε το 1983 από τον Kary Mullis και περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια, τα οποία πραγματοποιούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Κυριαζής et al., 2014): (i) Αποδιάταξη (Denaturation), η οποία περιλαμβάνει την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA, σε θερμοκρασία 94-98° C, (ii) Υβριδισμός εκκινητών (Annealing), οπότε οι εκκινητές

υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο, σε θερμοκρασία 55-65° C, (iii) Επιμήκυνση (Extension), στην οποία η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'–3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές, σε θερμοκρασία 72° C. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται ο υβριδισμός των εκκινητών εξαρτάται από τη θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών (Melting temperature, T_m), η οποία είναι ανάλογη του μεγέθους της αλληλουχίας, της σύστασης των βάσεων (GC) της αλληλουχίας και της απόλυτης σειράς των βάσεων στη μελετώμενη αλληλουχία. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή. Τα τρία αυτά στάδια συντελούν έναν «κύκλο» PCR και επαναλαμβάνονται 30-50 φορές. Στο τέλος κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα την εκθετική της αύξηση (Κυριαζής et al., 2014).

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε PCR και στη συνέχεια αλληλούχιση των συστατικών γονιδίων (housekeeping genes): *atpD* και *infB* με εκκινητές (primers) που παρατίθενται στον Πίνακα 4. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή (Brady et al., 2008), τροποποιήθηκαν με την προσθήκη των αλληλουχιών των εκκινητών T7 ή SP6 στο 5' άκρο τους, έτσι ώστε να διευκολυνθεί η απευθείας αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Χρησιμοποιήθηκαν γονιδιωματικά DNA των βακτηριακών στελεχών *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1 και *Lelliottia* sp. D2.4, τα οποία απομονώθηκαν με τη χρήση GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma). Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Phusion Polymerase (Thermo Scientific™), οι συνθήκες της αντίδρασης PCR παρατίθενται στον Πίνακα 5 και τα συστατικά στις αντίστοιχες ποσότητες και τελικές συγκεντρώσεις στον Πίνακα 6. Τα προϊόντα ενίσχυσης (amplicons), από κάθε δείγμα, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη και οι ζώνες κατάλληλου μεγέθους σε κάθε περίπτωση απομονώθηκαν με τη χρήση του GenElute Gel Extraction Kit (Sigma). Όλα τα δείγματα αλληλουχήθηκαν απευθείας με τη χρήση των T7 και SP6 πρότυπων εκκινητών, στο 5' άκρο των αντίστοιχων εκκινητών *atpD* 01/02 και *infB* 01/02. Όλα τα προϊόντα ενίσχυσης αλληλουχήθηκαν από τη CEMIA (cemia.eu).

Πίνακας 4. Αλληλουχίες των ζευγών των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR των γονιδίων *atpD* και *infB*, το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης σε bp και η θερμοκρασία αποδιάταξής τους (T_m) με τη χρήση Phusion Polymerase. Το υπογραμμισμένο τμήμα αποτελεί την αλληλουχία των T7 και SP6 τμημάτων των εκκινητών.

Όνομα Εκκινητών	Ακολουθία 5'-3'	Μέγεθος PCR προϊόντος	Θερμοκρασία T_m	Παρατηρήσεις
atpD 01-F-T7	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> RTAATYGGMGCSGTRGTNGAYGT-3'	~ 657 bp	Lowest T_m for Phusion 63° C	Primers for Enterobacteriaceae Modified from (Brady et al., 2008)
atpD 02-R-SP6	5'- <u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> TCATCCGCMGGWACRTAWAYNGCCTG-3'	~ 657 bp		
infB 01-F-T7	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> ATYATGGGHCAYGTHGAYCA-3'	~ 615 bp	Lowest T_m for Phusion 55° C	Primers for Enterobacteriaceae Modified from (Brady et al., 2008)
infB 02-SP6	5'- <u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> RACKGAGTARTAACGCAGATCCA-3'	~ 615 bp		

Πίνακας 5. Συνθήκες που εφαρμόστηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR για τα γονίδια *atpD* και *infB*.

Βήματα	Θερμοκρασία	Χρονικό διάστημα	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	98° C	0:30 min	30 κύκλοι
Αποδιάταξη	98° C	0:30 min	
Υβριδισμός εκκινητών για <i>atpD/infB</i>	63° C/55° C	0:40 min	
Επιμήκυνση	72° C	0:40 min	
Τελική επιμήκυνση	72° C	8 min	
Συντήρηση	4° C		

Πίνακας 6. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR. *Εξαιτίας της διαφοράς της καθαρότητας των γονιδιωματικών DNA των διαφορετικών στελεχών, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες (template) DNA από κάθε στέλεχος και η περίσσεια συμπληρώθηκε με την κατάλληλη ποσότητα ddH_2O .

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μ l	Τελικές συγκεντρώσεις
5x Phusion HF Buffer	5 μ l	1x
25 mM dNTPs	0,2 μ l	200 μ M
10 mM Forward primer	1,25 μ l	0,5 μ M
10 mM Reverse primer	1,25 μ l	0,5 μ M
Phusion DNA Poly	0,25 μ l	1,0 units/50 μ l PCR
Template DNA	*	100 ng/ μ l
ddH_2O	Έως τα 25 μ l	

Τα συστατικά γονίδια (housekeeping genes) είναι γονίδια τα οποία απαιτούνται για τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού υπό φυσιολογικές αλλά και παθολογικές συνθήκες. Ορισμένα από αυτά τα γονίδια εκφράζονται με συνεχή ρυθμό και έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως σημείο αναφοράς σε πειράματα μελέτης του ρυθμού έκφρασης άλλων γονιδίων.

Η αλληλούχιση του γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση φυλογενετικής συγγένειας μεταξύ βακτηρίων στελεχών (Patel, 2001). Η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος γενετικός δείκτης για τη φυλογενετική ανάλυση και την ταξινόμηση των στελεχών για τρεις κυρίως λόγους

(Janda and Abbott, 2007): (i) η αλληλουχία του *rrs* γονιδίου είναι παρούσα σε όλα τα βακτήρια και συχνά συναντάται υπό τη μορφή σπερονίων, (ii) η λειτουργία του *rrs* έχει συντηρηθεί σε ένα είδος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, (iii) το *rrs* έχει μέγεθος 1.500 bp επιτρέποντας την εφαρμογή αναλύσεων βιοπληροφορικής. Η αλληλούχιση επιπλέον γονιδίων συμβάλλει στην περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση του εξεταζόμενου στελέχους. Το γονίδιο *atpD* είναι ένα γονίδιο υψίστης σημασίας για την επιβίωση ενός μικροοργανισμού, καθώς κωδικοποιεί την έκφραση της β-υπομονάδας του παράγοντα F1 της συνθάσης του ATP, η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) από μόρια ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) υπό την παρουσία πρωτονιοκινητικής δύναμης. Αποτελεί, επομένως, κατάλληλο φυλογενετικό δείκτη για την ταξινόμηση των στελεχών, εξαιτίας της γενετικής σταθερότητας και της ευρείας κατανομής που παρουσιάζει (Ludwig et al., 1993; Ludwig and Schleifer, 1999). Το γονίδιο *infB* κωδικοποιεί την έκφραση του παράγοντα έναρξης μετάφρασης IF2 (translation initiation factor 2) (Laalami et al., 1991). Η έναρξη της μετάφρασης του mRNA στους προκαρυωτικούς οργανισμούς προωθείται από τρεις παράγοντες έναρξης, IF1, IF2 και IF3 (Steffensen et al., 1997). Ο IF2 είναι ο μεγαλύτερος σε μέγεθος (97,3 kDa στο στέλεχος *E. coli*) και κατά τη διάρκεια της έναρξης της μεταγραφής αλληλοεπιδρά με τρεις παράγοντες, την GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη), το fMet-tRNA^{Met} και τα ριβοσώματα. Ο IF2 συμβάλλει στην έναρξη της πρόσδεσης του στο fMet-tRNA^{Met} στο 70S ριβόσωμα, μέσω της υδρόλυσης του GTP σε GDP (Steffensen et al., 1997). Σύγκριση των γονιδιωματικών αλληλουχιών του γονιδίου έχει χρησιμοποιηθεί για τη φυλογενετική ανάλυση στελεχών της οικογένειας Enterobacteriaceae (Hedegaard et al., 1999) και Pasteurellaceae (Christensen et al., 2004) και των γενών *Haemophilus* (Hedegaard et al., 2001) και *Actinobacillus* (Nørskov-Lauritsen et al., 2004). Σε προηγούμενες μελέτες, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των γονιδίων κυτταρικής επιμέλειας *rpoB* και *gyrB*. Το γονίδιο *rpoB* κωδικοποιεί την έκφραση της β-υπομονάδας της RNA πολυμεράσης (Yura and Ishihama, 1979), ενώ το γονίδιο *gyrB* κωδικοποιεί την έκφραση της β-υπομονάδας της DNA γυράσης (τοποϊσομεράση τύπου II) (Fukushima et al., 2002). Η φυλογενετική ανάλυση προέκυψε από τη σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των τεσσάρων συστατικών γονιδίων (*rpoB*, *gyrB*, *atpD*, *infB*).

2.16 Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

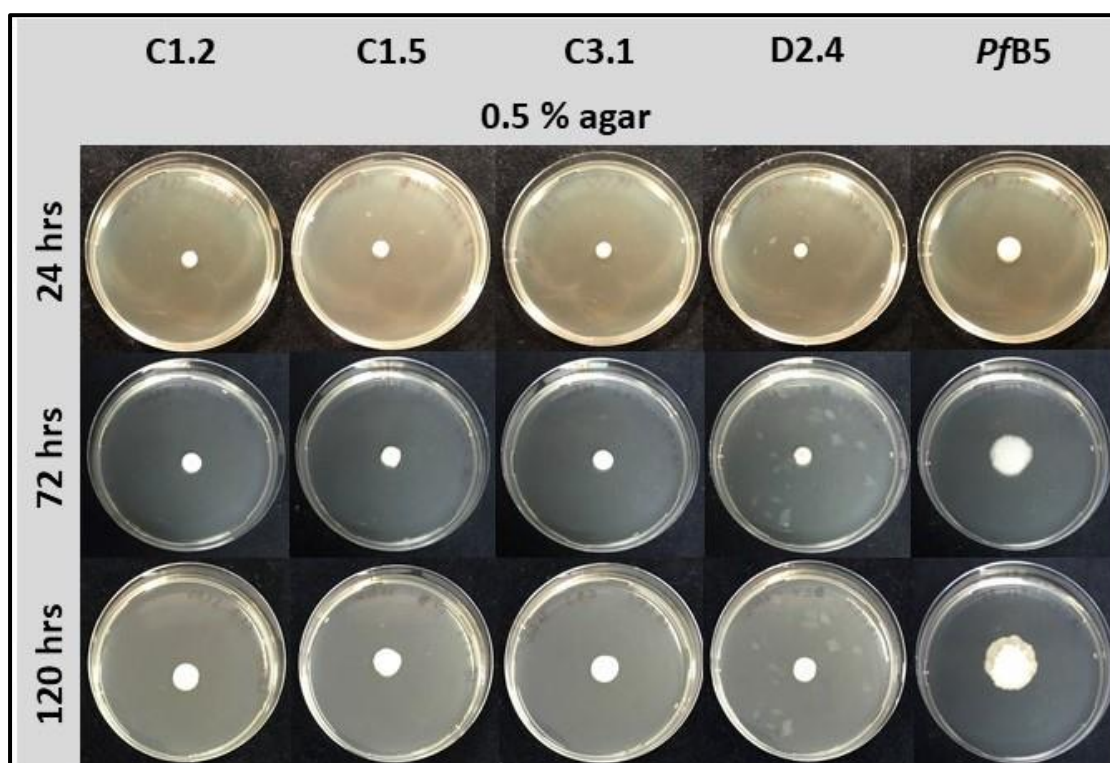
Η αναζήτηση της ταυτότητας των υπό μελέτη ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες ακολουθίες της βάσης δεδομένων GenBank χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με τη χρήση του αλγόριθμου CLUSTALW (Thompson et al., 1994) του προγράμματος MEGA6 (Tamura et al., 2013). Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τις μεθόδους Neighbor Joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) και Maximum Likelihood (ML) (Felsenstein, 1981) του προγράμματος MEGA 6. Για την ανάλυση με τη μέθοδο ML, πραγματοποιήθηκε η κατάλληλη περικοπή (trimmed) των αλληλουχιών των γονιδίων, οι οποίες στη συνέχεια συνδέθηκαν σειριακά (concatenated). Η αξιοπιστία των δενδρογραμμάτων εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.

Η φυλογενετική συγγένεια των υπό μελέτη στελεχών εξετάστηκε με τη μέθοδο Ανάλυσης πολυτοπικής αλληλούχησης, (Multilocus Sequence Analysis, MLSA) βάσει τεσσάρων γονιδίων: *rpoB*, *gyrB*, *atpD*, *infB*. Στην τεχνική MLSA, τα στελέχη ταυτοποιούνται σύμφωνα με τις διαφορές αλληλουχίας σε έναν αριθμό προσεκτικά επιλεγμένων γενετικών τόπων. Οι κωδικές DNA αλληλουχίες διαφορετικών γονιδίων (housekeeping genes) ενισχύονται με PCR και κατόπιν πραγματοποιείται αλληλούχηση. Οι αλληλουχίες των υπό μελέτη γονιδίων των εξεταζομένων στελεχών ενοποιούνται, δημιουργώντας μία σύνθετη αλληλουχία (concatenated sequence) αποτελούμενη από τις αλληλουχίες των επιμέρους γονιδίων και στη συνέχεια, η σύνθετη αυτή αλληλουχία συγκρίνεται με αντίστοιχες αλληλουχίες από πρότυπα βακτηριακά στελέχη, ώστε να ταυτοποιηθεί γενετικά ο μικροοργανισμός.

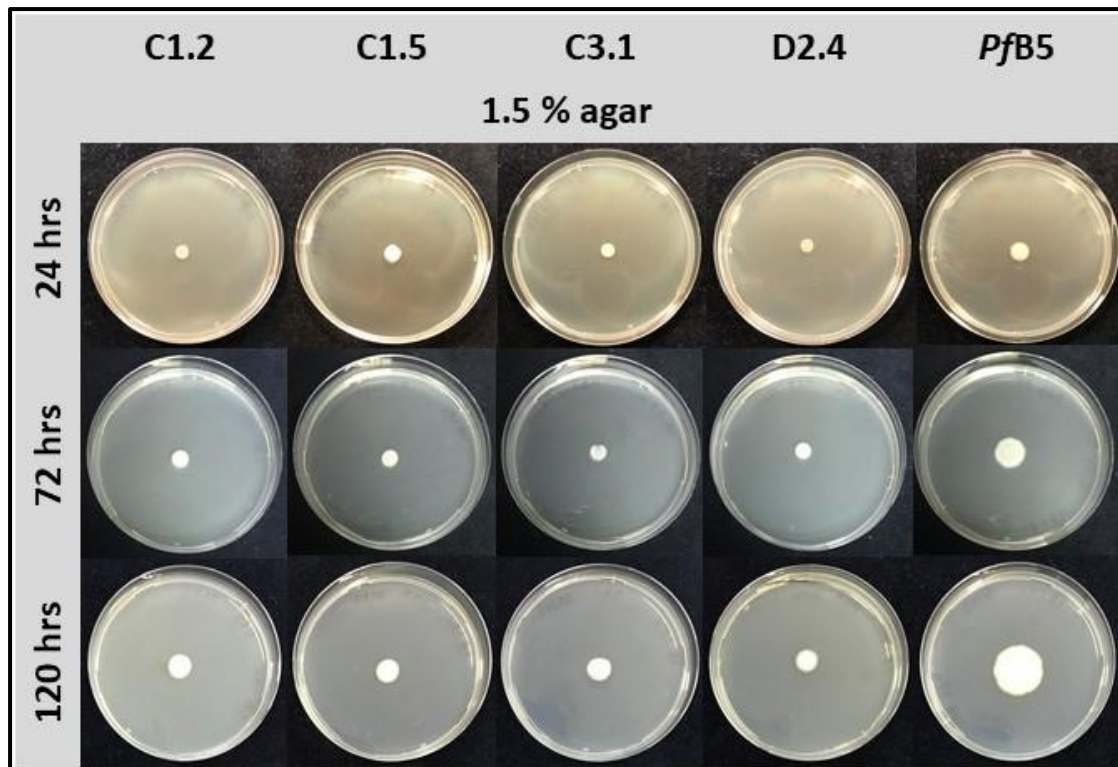
3. Αποτελέσματα

3.1 Διερεύνηση της ομαδικής κίνησης των υπό μελέτη στελεχών

Τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους για ομαδική κίνηση σε επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις άγαρ: 0,5 % και 1,5 %, σε χρονικά διαστήματα 24, 72 και 120 ωρών μετά τον εμβολιασμό. Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν και δημιούργησαν αποικία στο κέντρο των τρυβλίων LB 0,5 % άγαρ και LB 1,5 % άγαρ. Τις πρώτες 24 ώρες δεν παρουσίασαν κανένα χαρακτηριστικό ενδεικτικό ομαδικής κίνησης σε καμία από τις δύο συγκεντρώσεις άγαρ. Χαμηλή κινητικότητα επέδειξαν μετά τις 72 και 120 ώρες στα τρυβλία με LB 0,5 % άγαρ. Το στέλεχος αναφοράς *P. fluorescens* B5 (Pfb5) παρουσίασε ομαδική κινητικότητα από τις 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό και έπειτα και στις δύο εξεταζόμενες συγκεντρώσεις άγαρ (0,5%, 1,5%).



Εικόνα 17. Ομαδική κινητικότητα σε LB 0,5 % άγαρ των βακτηριακών στελεχών *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1, *Lelliottia* sp. D2.4 και *P. fluorescens* B5, σε χρονικά διαστήματα 24, 72 και 120 ώρες μετά τον εμβολιασμό, 24 ώρες: τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη δεν παρουσίασαν αύξηση της διαμέτρου της αποικίας τους, το στέλεχος αναφοράς παρουσίασε μικρή αύξηση διαμέτρου, 72 ώρες: τα υπό μελέτη στελέχη επέδειξαν ελάχιστη αύξηση διαμέτρου, ενώ το στέλεχος αναφοράς παρουσίασε συγκριτικά μεγαλύτερη αύξηση, 120 ώρες: παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ανάπτυξη των αποικιών των υπό μελέτη στελεχών, το στέλεχος Pfb5 επέδειξε εμφανώς μεγαλύτερη ανάπτυξη.

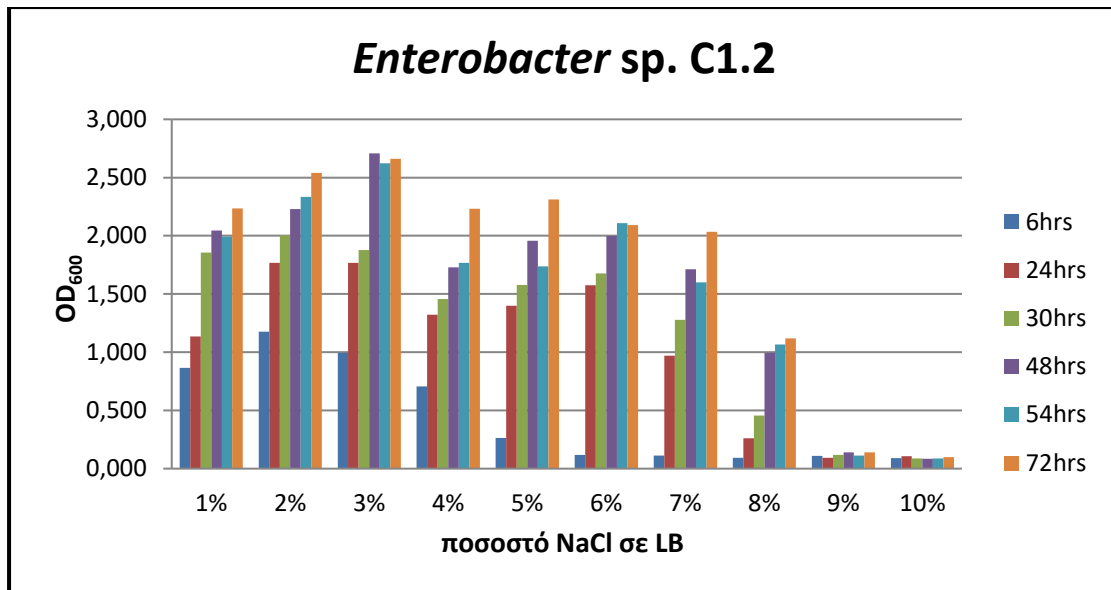


Εικόνα 18. Ομαδική κινητικότητα σε LB 1,5 % άγαρ των βακτηριακών στελεχών *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1, *Lelliottia* sp. D2.4 και *P. fluorescens* B5, σε χρονικά διαστήματα 24, 72 και 120 ώρες μετά τον εμβολιασμό, 24 ώρες: τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη καθώς και το στέλεχος αναφοράς δεν παρουσίασαν αύξηση της διαμέτρου της αποικίας τους, 72 ώρες: τα στελέχη αναφοράς δεν παρουσίασαν ανάπτυξη των αποικιών τους, το PfB5 παρουσίασε αύξηση της διαμέτρου της αποικίας του, 120 ώρες: ελάχιστη αύξηση παρατηρήθηκε στις αποικίες των υπό μελέτη στελεχών, το PfB5 παρουσίασε συγκριτικά μεγαλύτερη ανάπτυξη.

3.2 Διερεύνηση αντοχής βακτηριακών στελεχών σε συνθήκες αλατότητας

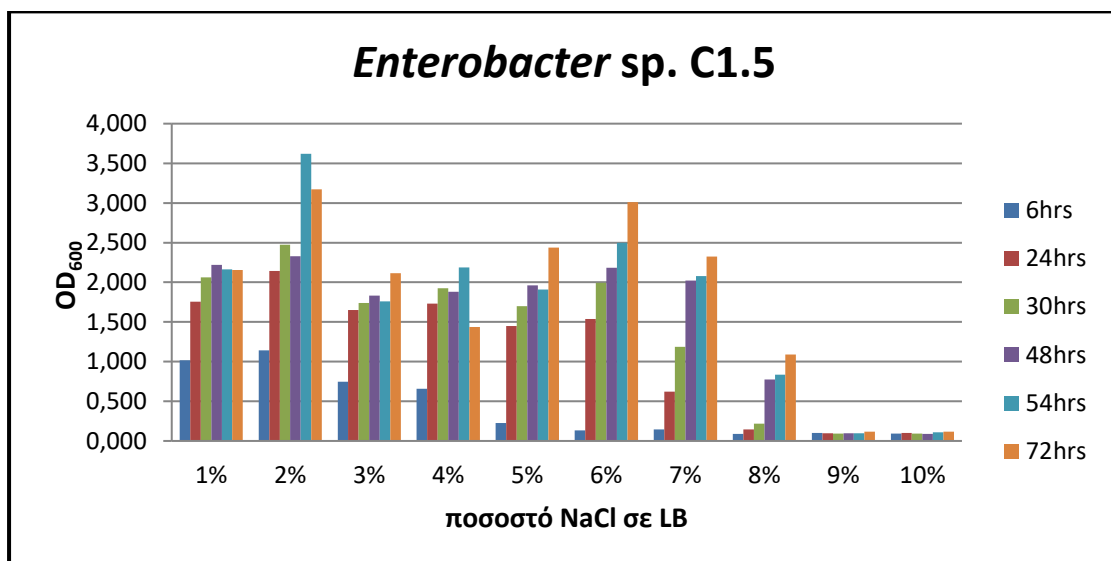
Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν ως προς την αντοχή τους σε συνθήκες αλατότητας, σε υγρό θρεπτικό μέσο LB διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (1%-10%). Η ανάπτυξη των βακτηριακών καλλιεργειών παρατηρήθηκε με φασματοφωτομετρία ανά διαστήματα 6 ωρών μέχρι τις 72 ώρες. Συνολικά τα στελέχη επέδειξαν υψηλότερη αντοχή σε συνθήκες αλατότητας συγκριτικά με το στέλεχος αναφοράς *E. coli*, το οποίο ήταν και το αναμενόμενο.

Συγκεκριμένα, παρατηρούμε στο διάγραμμα της Εικόνας 19 ότι το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.2 παρουσίασε ικανότητα ανάπτυξης σε συγκεντρώσεις 1% - 8% NaCl. Μέγιστο ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 3% στις 48 ώρες, ενώ σε συγκεντρώσεις 9% και 10% δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη.



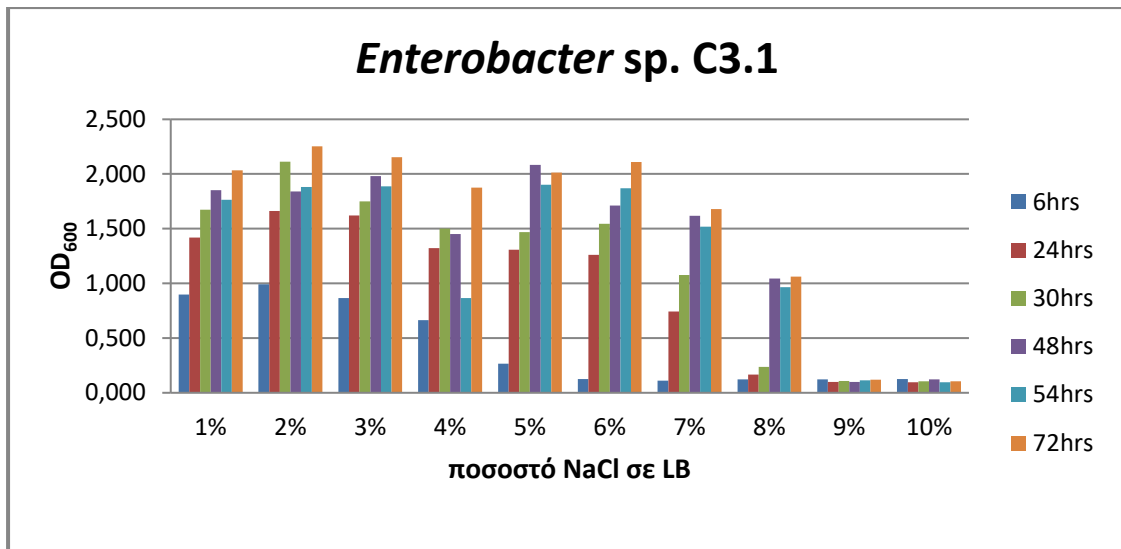
Εικόνα 19. Διαγραμματική παρουσίαση αλλαγών στις τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (6, 24, 30, 48, 54, 72 ώρες) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (1%-10%) για το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.2.

Το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.5, ομοίως με το *Enterobacter* sp. C1.2, παρουσίασε ικανότητα ανάπτυξης σε συγκεντρώσεις 1%-8% και απουσία ανάπτυξης σε 9% και 10%. Μέγιστο ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 2%.



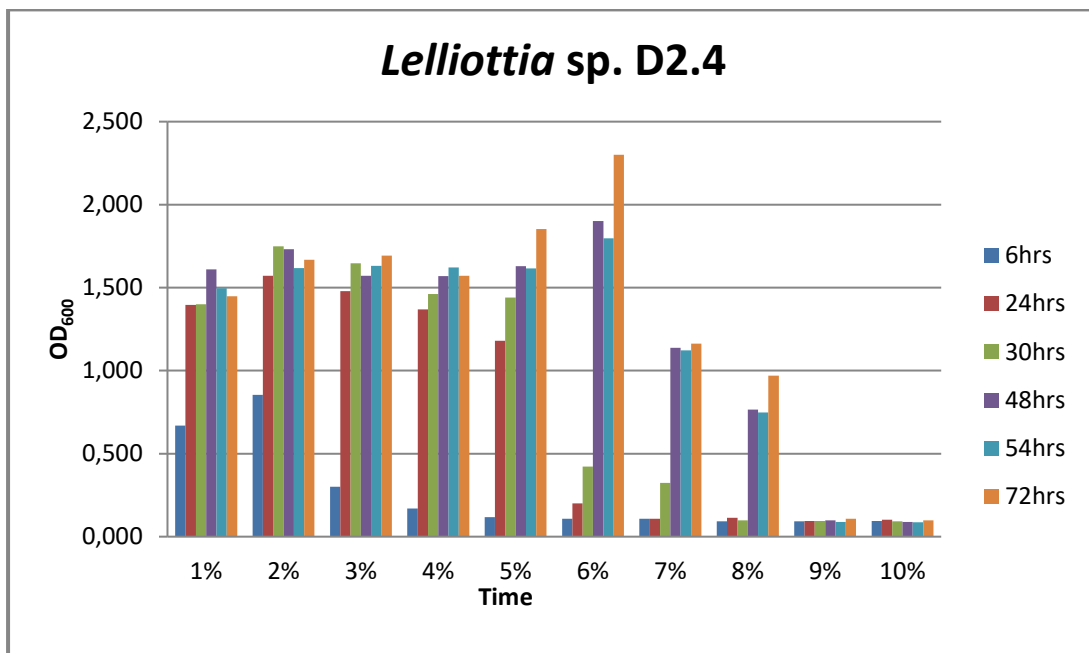
Εικόνα 20. Διαγραμματική παρουσίαση αλλαγών στις τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (6, 24, 30, 48, 54, 72 ώρες) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (1%-10%) για το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.5.

Το στέλεχος *Enterobacter* sp. C3.1, ομοίως με τα *Enterobacter* sp. C1.2 και *Enterobacter* sp. C1.5 παρουσίασε αντοχής σε συγκεντρώσεις 1% - 8% και απουσία ανάπτυξης σε συγκεντρώσεις 9% και 10%. Μέγιστο ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 2%.



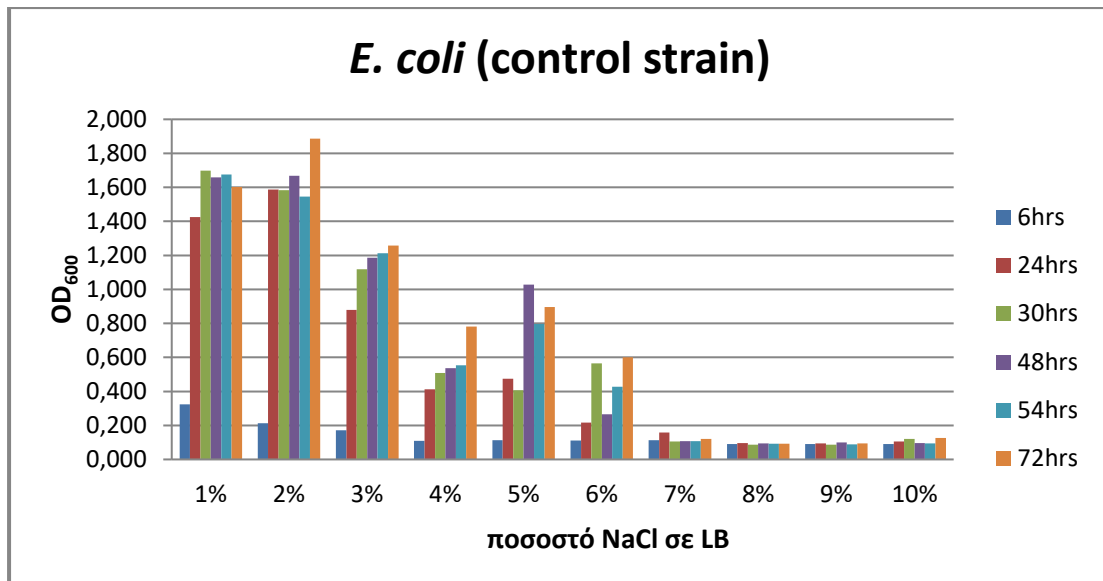
Εικόνα 21. Διαγραμματική παρουσίαση αλλαγών στις τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (6, 24, 30, 48, 54, 72 ώρες) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (1%-10%) για το στέλεχος *Enterobacter* sp. C3.1.

Το στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4 παρουσίασε αντοχή σε συνθήκες αλατότητας συγκεντρώσεων 1% - 8%. Μέγιστο ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 6%. Απουσία ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις 9% και 10%.



Εικόνα 22. Διαγραμματική παρουσίαση αλλαγών στις τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (6, 24, 30, 48, 54, 72 ώρες) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (1%-10%) για το στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4.

Το στέλεχος αναφοράς *E.coli*, σε αντίθεση με τα υπό μελέτη στελέχη, παρουσίασε αντοχή και ικανότητα ανάπτυξης σε συγκεντρώσεις 1% - 6% NaCl. Μέγιστο ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 2%. Σε συγκεντρώσεις 7% - 10% επέδειξε αδυναμία ανάπτυξης.



Εικόνα 23. Διαγραμματική παρουσίαση αλλαγών στις τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600 nm σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (6, 24, 30, 48, 54, 72 ώρες) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (1%-10%) για το στέλεχος *E. coli*.

3.3 Διερεύνηση ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου

3.3.1. Ποιοτική Ανάλυση σε στερεό θρεπτικό υλικό NBRI-BPB-Agar

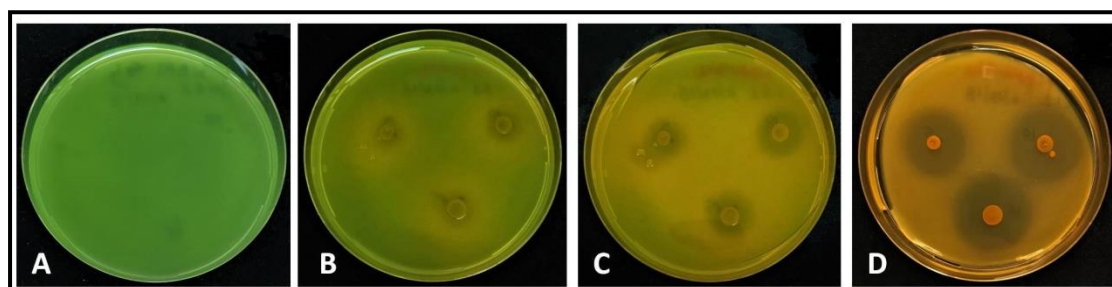
Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να διαλυτοποιούν φωσφόρο σε στερεό θρεπτικό υλικό NBRI/BPB, με τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών πηγών άνθρακα: Γλυκόζη (Glu), Γλυκερόλη (Gly), Αραβινόζη (Ara), Φρουκτόζη (Fru). Τα στελέχη αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 11 ημέρες σε στερεό και έπειτα παρατηρήθηκε η αλλαγή χρώματος στο θρεπτικό μέσο και η διάμετρος της διαυγούς ζώνης διαλυτοποίησης. Η αναμενόμενη αλλαγή χρώματος ενδεικτική της ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου είναι από πράσινο σε κίτρινο (Εικ. 24). Ο δείκτης διαλυτοποίησης φωσφόρου (PSI) για το κάθε στέλεχος υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση του Prenomo (Prenomo et al., 1996): $PSI = \text{διάμετρος αποικίας} + \text{διάμετρος διαυγούς ζώνης} / \text{διάμετρος αποικίας}$.

Συνολικά, τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη επέδειξαν υψηλότερη ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου συγκριτικά με το στέλεχος αναφοράς *P. putida* KT2240. Η πηγή άνθρακα επηρέασε σημαντικά την ικανότητα των στελεχών για διαλυτοποίηση φωσφόρου, η οποία αυξήθηκε με τη χρήση γλυκόζης (Εικ. 25). Με τη χρήση γλυκερόλης παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος στο υπόστρωμα από πράσινο σε κίτρινο (πιθανά λόγω παραγωγής οργανικών οξέων), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε δημιουργία διαυγούς ζώνης διαλυτοποίησης. Η χρήση αραβινόζης και φρουκτόζης οδήγησε σε αλλαγή χρώματος του υποστρώματος και σε δημιουργία διαυγών ζωνών μικρού μεγέθους (Εικ. 25).

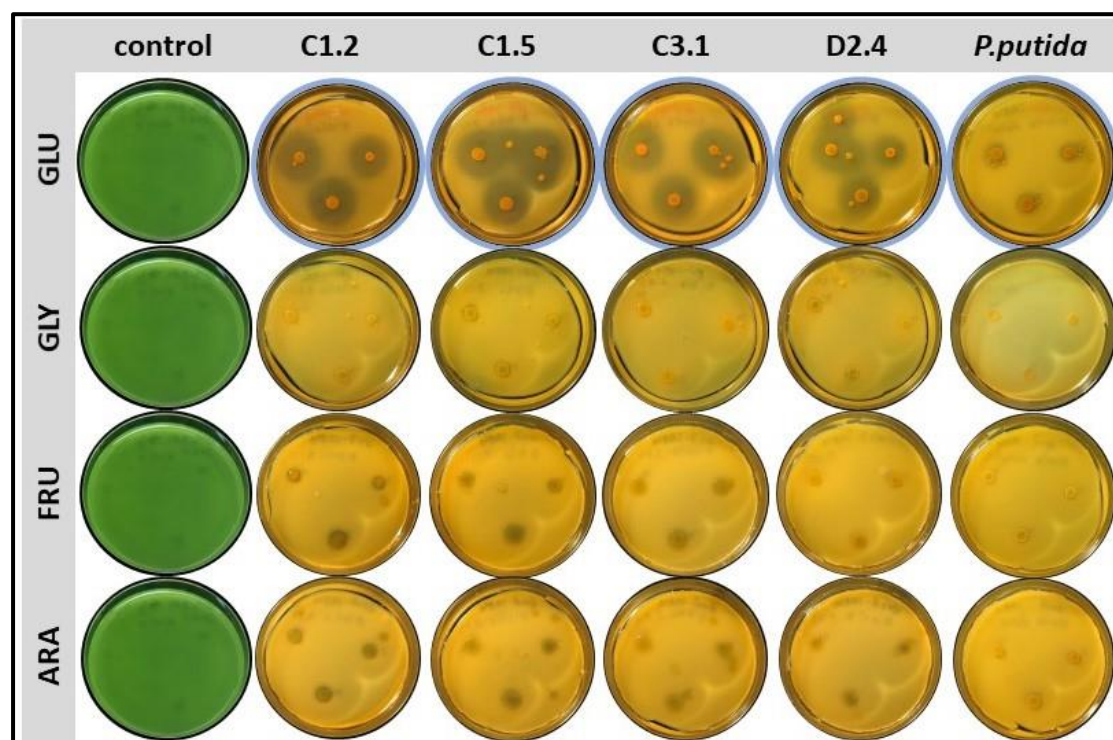
Βάσει των παραπάνω, ο δείκτης διαλυτοποίησης για κάθε στέλεχος ξεχωριστά υπολογίστηκε στα τρυβλία με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και οι τιμές PSI παρατίθενται στον πίνακα. Όλα τα στελέχη παρουσίασαν ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου με τιμές $PSI > 2$. Η κατάταξη των εξεταζόμενων στελεχών μαζί με το στέλεχος αναφοράς για την ικανότητα τους να διαλυτοποιούν φωσφόρο, σύμφωνα με τις τιμές PSI έχει ως εξής: *Enterobacter* sp. C3.1 > *Enterobacter* sp. C1.2 > *Enterobacter* sp. C1.5 > *Lelliottia* sp. D2.4 > *P. putida* KT2240.

Πίνακας 7. Παρουσίαση τιμών PSI για κάθε εξεταζόμενο βακτηριακό στέλεχος.

Βακτηριακό στέλεχος	PSI
<i>Enterobacter</i> sp. C1.2	5,14
<i>Enterobacter</i> sp. C1.5	4,8
<i>Enterobacter</i> sp. C3.1	5,3
<i>Lelliottia</i> sp. D2.4	4,28
<i>P. putida</i> KT2240	3,33



Εικόνα 24. Σταδιακή αλλαγή χρώματος και δημιουργία διαυγούς ζώνης διαλυτοποίησης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα NBRIP/BPB: (A) μη εμβολιασμένο υπόστρωμα (B) 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό (C) 96 ώρες μετά τον εμβολιασμό (D) 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

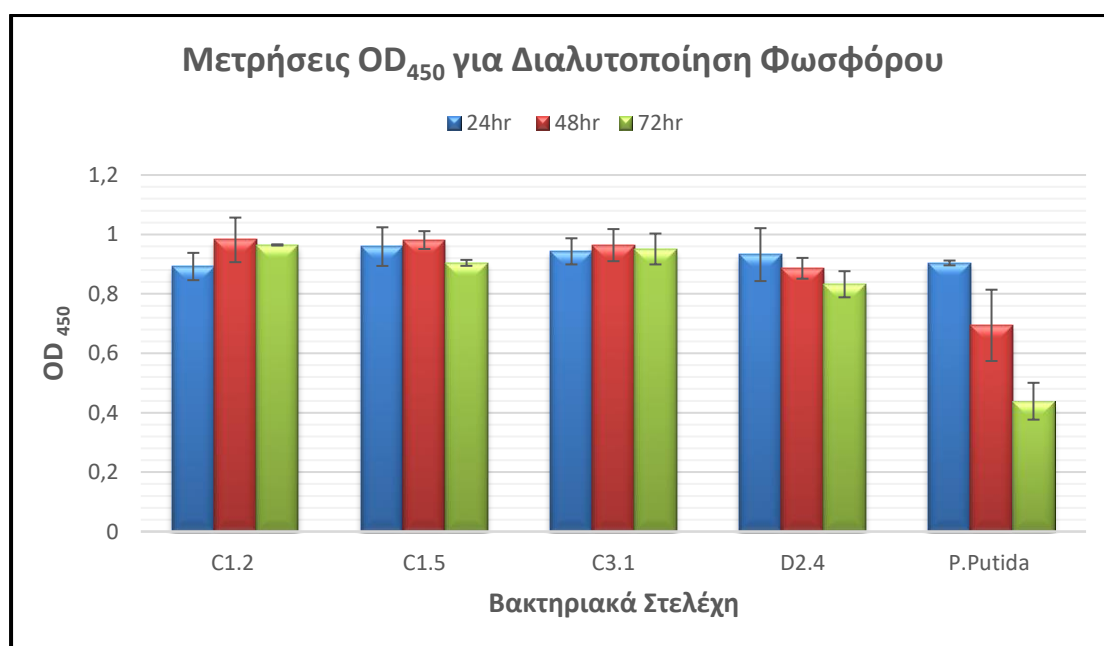


Εικόνα 25. Απεικόνιση ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου σε στερεό θρεπτικό μέσο NBRIP/BPB και σε διαφορετικές πηγές άνθρακα (GLU: γλυκόζη, GLY: γλυκερόλη, ARAB: αραβινόζη, FRU: φρουκτόζη) από τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη και από το στελέχους αναφοράς *P.putida* KT2240 τη 12^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό. Σε μπλε πλαίσιο απεικονίζονται τα βακτήρια με υψηλότερη ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου, σε υπόστρωμα με γλυκόζη σαν πηγή άνθρακα.

3.3.2 Ποσοτική ανάλυση σε υγρό θρεπτικό μέσο

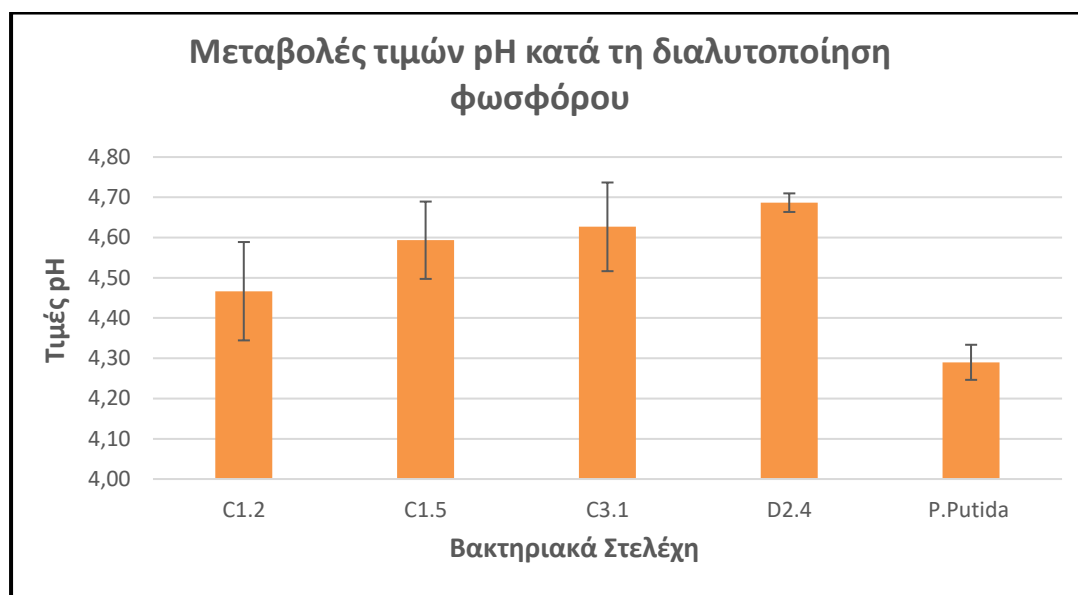
Πολλά βακτηριακά στελέχη δεν εμφανίζουν ζώνες διαλυτοποίησης σε στερεό θρεπτικό μέσο, ενώ εμφανίζουν ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου σε υγρά θρεπτικά μέσα. Επιπρόσθετα, όταν ένα στέλεχος εμφανίσει ικανότητα διαλυτοποίησης σε στερεό θρεπτικό μέσο είναι σκόπιμο να εξεταστεί η διατήρηση της ικανότητας αυτής και σε υγρό θρεπτικό υλικό. Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να διαλυτοποιούν φωσφόρο σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP/BPB. Η ποσοτικοποίηση της αλλαγής χρώματος του θρεπτικού μέσου από πράσινο σε κίτρινο, η οποία είναι ενδεικτική της ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις φασματοφωτομετρίας στα 450 nm σε χρονικά διαστήματα 24 ωρών για τρεις ημέρες (72 ώρες). Επίσης, στις 72 ώρες μετρήθηκε και η αλλαγή pH του θρεπτικού μέσου για κάθε στέλεχος. Η οξίνιση (μείωση) του pH είναι ενδεικτική ικανότητας διαλυτοποίησης, αν και μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες όπως παραγωγή και έκκριση στο μέσο καλλιέργειας οργανικών οξέων.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις φασματοφωτομετρίας η κατάταξη των στελεχών για την ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου έχει ως εξής: *Enterobacter* sp. C3.1 > *Enterobacter* sp. C1.5 > *Enterobacter* sp. C1.2 > *Lelliottia* sp. D2.4 > *P. putida* KT2240 (Εικ. 26), η οποία συμφωνεί σε μεγάλο βαθμό με τα συμπεράσματα από την ποιοτική μελέτη σε στερεό θρεπτικό μέσο NBRIP/BPB (*Enterobacter* sp. C3.1 > *Enterobacter* sp. C1.2 > *Enterobacter* sp. C1.5 > *Lelliottia* sp. D2.4 > *P. putida* KT2240). Επιπρόσθετα, η *P. putida* εμφάνισε ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου στα ίδια περίπου επίπεδα στις 24 ώρες με τα εξεταζόμενα στελέχη. Αντίθετα, η *P. putida* σχημάτισε πολύ μικρή ζώνη διαλυτοποίησης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει, όπως προαναφέρθηκε, ότι ορισμένα στελέχη εμφανίζουν διαφορετική ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου σε στερεά και υγρά θρεπτικά μέσα.



Εικόνα 26. Διαγραμματική παρουσίαση αλλαγών στις τιμών απορρόφησης στα 450 nm σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (24, 48, 72 ώρες), για τα στελέχη *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1, *Lelliottia* sp. D2.4, *P. putida* KT2240.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις pH, όλα τα εξεταζόμενα στελέχη προκάλεσαν οξίνιση του θρεπτικού μέσου. Η κατάταξη σύμφωνα με τη μεγαλύτερη μείωση pH από τα στελέχη έχει ως εξής: *P. putida* KT2240 > *Enterobacter* sp. C1.2 > *Enterobacter* sp. C1.5 > *Enterobacter* sp. C3.1 > *Lelliottia* sp. D2.4 (Εικ. 27).



Εικόνα 27. Διαγραμματική παρουσίαση των τιμών pH του θρεπτικού μέσου NBRI/BPB στις 72 ώρες επώασης για τα εξεταζόμενα στελέχη *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1, *Lelliottia* sp. D2.4 και *P. putida* KT2240.

3.4 Διερεύνηση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

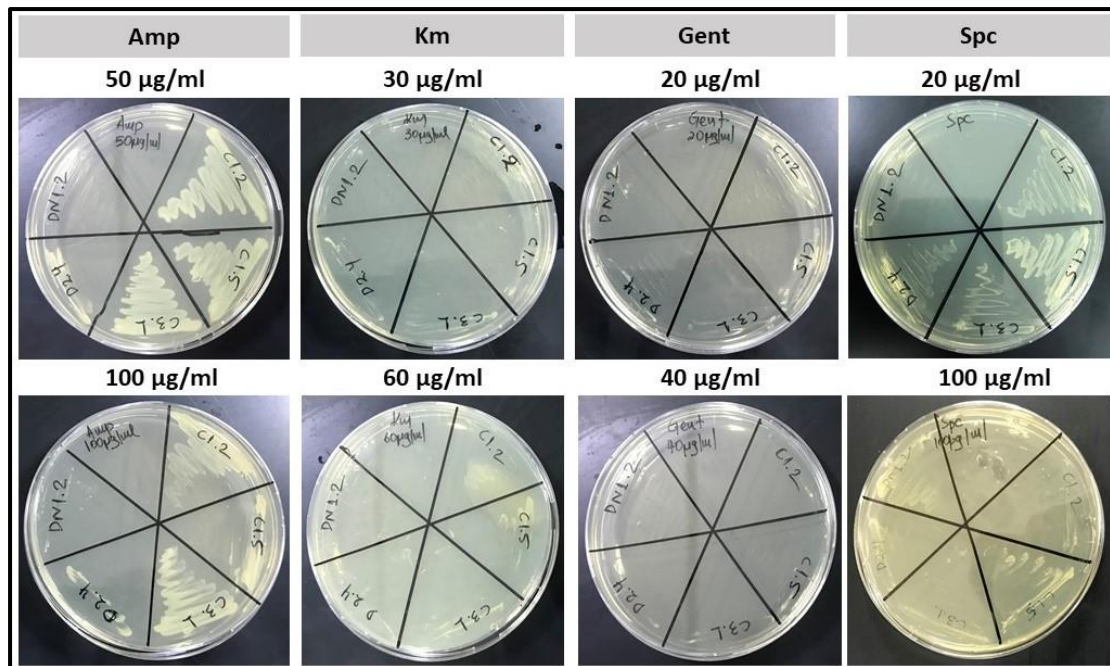
Η ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά εξετάστηκε με δύο μεθόδους: (i) μέθοδος της γραμμικής επίστρωσης, (ii) μέθοδος της διάχυσης εμποτισμένων δισκίων με αντιβιοτικά (Bauer et al., 1966).

3.4.1 Μέθοδος της γραμμικής επίστρωσης

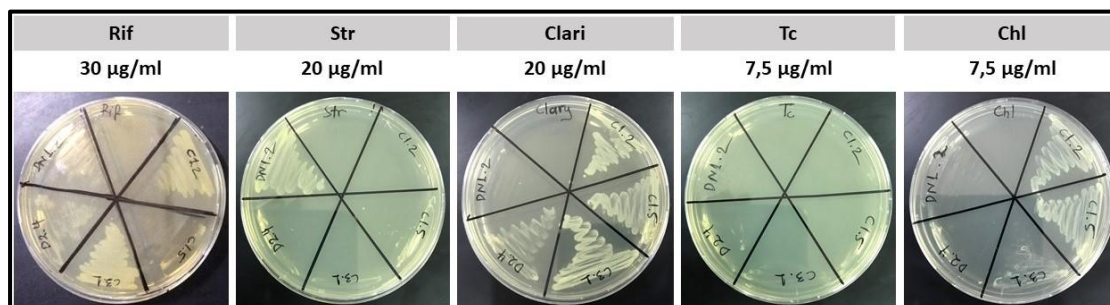
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου της γραμμικής επίστρωσης, για την ανθεκτικότητα των υπό μελέτη στελεχών σε αντιβιοτικά και παρακάτω παρουσιάζονται εικόνες των τρυβλίων, 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό τους.

Πίνακας 8. Παρουσίαση ανθεκτικότητας βακτηριακών στελεχών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών με την εφαρμογή της μεθόδου της γραμμικής επίστρωσης. **R:** Resistant - Ανθεκτικό, **I:** Intermediate - Μέτρια Ανθεκτικό, **S:** Sensitive - Ευαίσθητο

Αντιβιοτικά	Συγκέντρωση αντιβιοτικών μg/ml	Βακτηριακά στελέχη και ευαισθησία / ανθεκτικότητα			
		C1.2	C1.5	C3.1	D2.4
Amp(ampicillin)	50	R	R	R	I
	100	R	R	R	I
Km(kanamycin)	30	I	I	S	S
	60	S	I	S	S
Gent(gentamycin)	20	I	S	S	I
	40	S	S	S	S
Spc(spectinomycin)	20	I	R	I	I
	100	S	I	S	S
Rif (rifampicin)	30	R	S	R	I
Str(streptomycin)	20	S	S	S	S
Clr(chlarithromycin)	20	R	R	R	I
Tc (tetracyclin)	7,5	S	S	S	S
Chl(chloramphenicol)	7,5	R	R	I	S



Εικόνα 28. Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την διερεύνηση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τη μέθοδο της γραμμικής επίστρωσης, για τα βακτηριακά στελέχη: C1.2, C1.5, C3.1, D2.4, DN1.2, στα παρακάτω αντιβιοτικά στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις: Amp: 50 και 100 µg/ml, Km: 30 και 60 µg/ml, Gent: 20 και 40 µg/ml, Spc: 20 και 100 µg/ml. Ο χαρακτηρισμός των στελεχών σε ανθεκτικά (R), ενδιάμεσα ευαίσθητα (I) και ευαίσθητα (S) παρατίθεται στον πίνακα 4.



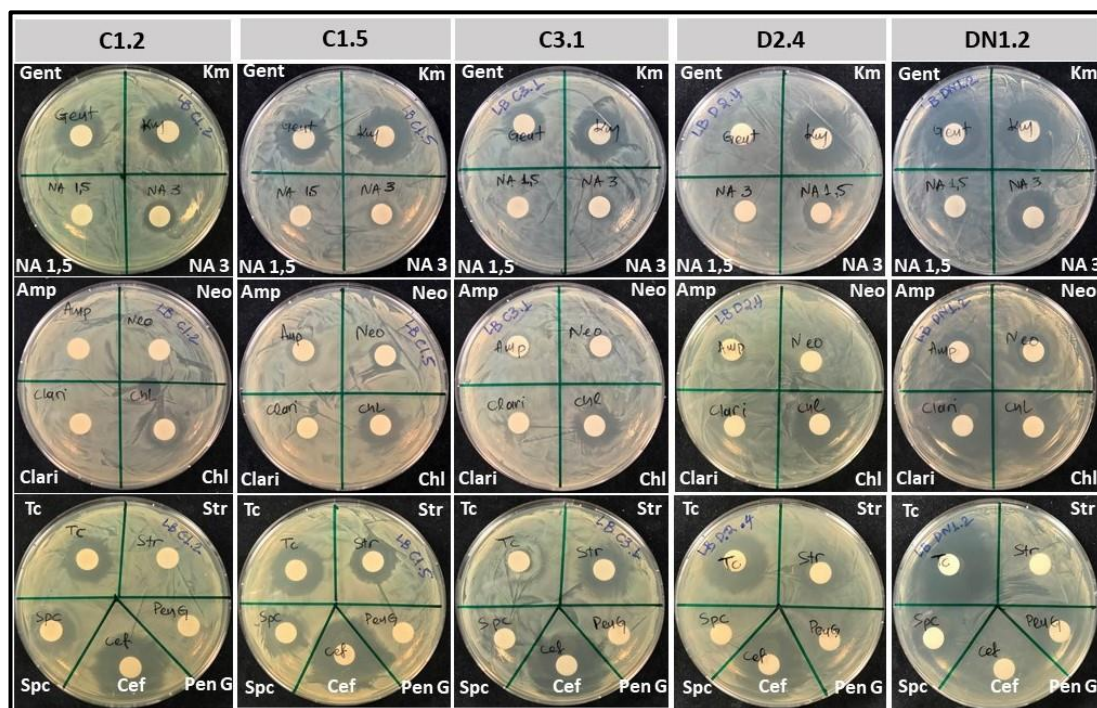
Εικόνα 28. Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την διερεύνηση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τη μέθοδο της γραμμικής επίστρωσης, για τα βακτηριακά στελέχη: C1.2, C1.5, C3.1, D2.4, DN1.2, στα παρακάτω αντιβιοτικά στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις: Rif 30µg/ml, Str 20 µg/ml, Clr 20 µg/ml, Tc 7,5 µg/ml, Chl 7,5 µg/ml. Ο χαρακτηρισμός των στελεχών σε ανθεκτικά (R), ενδιάμεσα ευαίσθητα (I) και ευαίσθητα (S) παρατίθεται στον πίνακα 4.

3.4.2 Μέθοδος διάχυσης εμποτισμένων δισκίων

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου διάχυσης εμποτισμένων δισκίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6 και ακολουθούν φωτογραφίες των τρυβλίων στις 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό.

Πίνακας 9. Παρουσίαση ανθεκτικότητας βακτηριακών στελεχών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών με την εφαρμογή της μεθόδου της διάχυσης εμποτισμένων δισκίων με αντιβιοτικά. **R:** Resistant - Ανθεκτικό, **I:** Intermediate - Μέτρια Ανθεκτικό, **S:** Sensitive – Ευαίσθητο.

Αντιβιοτικά	Συγκεντρώσεις σε µg/ml	Βακτηριακά Στελέχη / Διάμετρος ζωνών παρεμπόδισης / Ανθεκτικότητα							
		C1.2		C1.5		C3.1		D2.4	
		mm	R/I/S	mm	R/I/S	mm	R/I/S	mm	R/I/S
Amp(ampicillin)	5	0	R	4	R	0	R	5	R
Km(kanamycin)	10	15	S	14	S	15	S	17	S
Str(streptomycin)	3	0	R	11	I	12	I	10	I
Cef (cefuroxime)	3	21	S	24	S	24	S	21	S
Spc (spectinomycin)	10	11	I	11	I	0	R	0	R
Pen G (Penicillin G)	1	0	R	0	R	0	R	0	R
Tc (tetracyclin)	3	11	I	13	S	0	R	19	S
Clr (chloramphenicol)	1,5	0	R	0	R	0	R	0	R
Nal (nalidixic acid)	1,5	0	R	0	R	0	R	2	R
Gent (gentamycin)	3	4	R	2	R	2	R	7	R
Neo (neomycin)	5	11	I	14	S	8	R	0	R
Chl (chloramphenicol)	1	6	R	9	I	6	R	14	S



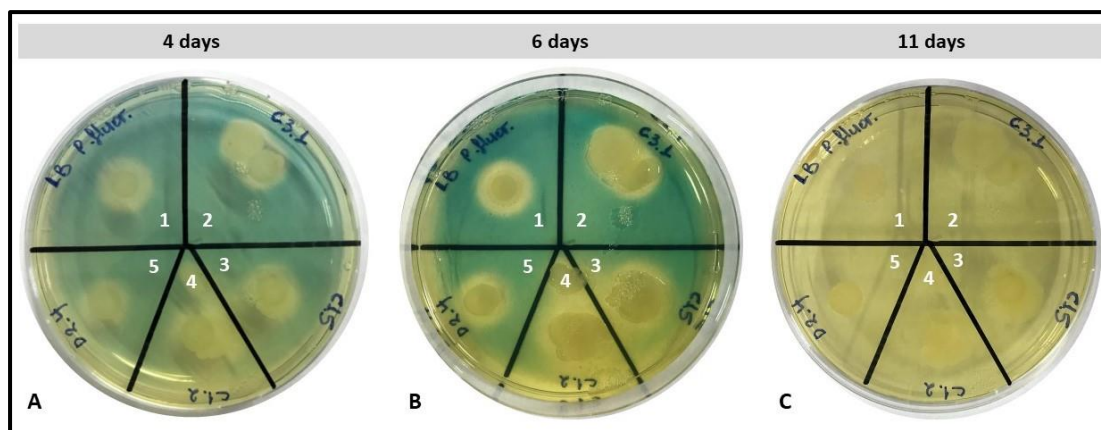
Εικόνα 29. Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την διερεύνηση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τη μέθοδο της διάχυσης εμποτισμένων δισκίων με αντιβιοτικά, για τα βακτηριακά στελέχη: C1.2, C1.5, C3.1, D2.4, DN1.2, στα παρακάτω αντιβιοτικά στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις: Gent 5 µg/ml, Km 10 µg/ml, Nal 1,5 µg/ml και 3 µg/ml, Amp 5 µg/ml, Neo 5 µg/ml, Clr 1,5 µg/ml, Chl 1 µg/ml, Tc 3 µg/ml, Str 3 µg/ml, Spc 10 µg/ml, Cef 3 µg/ml, Pen G 1 µg/ml. Ο χαρακτηρισμός των στελεχών σε ανθεκτικά (R), ενδιάμεσα ευαίσθητα (I) και ευαίσθητα (S) παρατίθεται στον πίνακα 6.

3.5 Διερεύνηση παραγωγής σιδηροφόρων

3.5.1 Τεχνική O-CAS

Αρχικά, για τη διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων εφαρμόστηκε η τεχνική O-CAS (Pérez-Miranda et al., 2007). Την 4^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό παρατηρήθηκε δημιουργία διαυγών ζωνών κίτρινου χρώματος περιμετρικά των αποικιών των μικροοργανισμών (Εικ. 30). Ευδιάκριτη ήταν η ζώνη γύρω από το στέλεχος αναφοράς *P. fluorescens* X. Ωστόσο, οι ζώνες γύρω από τις αποικίες των υπό μελέτη στελεχών είχαν ακαθόριστο σχήμα εξαιτίας της ανάπτυξης των αποικιών τους στο επίστρωμα CAS. Εξαιτίας αυτού, ήταν αδύνατος ο προσδιορισμός της διαμέτρου των ζωνών. Η αλλαγή χρώματος στο επίστρωμα CAS σταδιακά εξαπλώθηκε, καλύπτοντας όλη την επιφάνεια του στερεού υποστρώματος LB/CAS κατά την 11^η ημέρα (Εικ. 30).

Η αλλαγή χρώματος του CAS από μπλε σε κίτρινο είναι ενδεικτική απελευθέρωσης σιδηροφόρων καρβοξυλικού τύπου (Pérez-Miranda et al., 2007), τα οποία φαίνεται να παράγονται από όλους τους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, υπάρχει ενδεχόμενο σφάλματος καθώς ήταν αδύνατο να προσδιοριστεί το μέγεθος των διαυγών ζωνών κάθε στελέχους ξεχωριστά.



Εικόνα 30. Παρουσίαση αποτελεσμάτων της τεχνικής O-CAS για τα στελέχη 1 - *P. fluorescens* X, 2 - *Enterobacter* sp. C3.1, 3 - *Enterobacter* sp. C1.5, 4 - *Enterobacter* sp. C1.2, 5 - *Lelliottia* sp. D2.4 κατά την 4^η, 6^η και 11^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό: (A) 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό - δημιουργία διαυγών ζωνών κίτρινου χρώματος περιμετρικά των αποικιών, παρατηρείται ανάπτυξη αποικιών των υπό μελέτη στελεχών (C1.2, C1.5, C3.1, D2.4) στο επίστρωμα CAS (B) 6 ημέρες μετά τον εμβολιασμό - αύξηση του μεγέθους των διαυγών ζωνών (C) 11 ημέρες μετά τον εμβολιασμό - εξάπλωση της αλλαγής χρώματος σε όλη την επιφάνεια του στερεού LB/CAS.

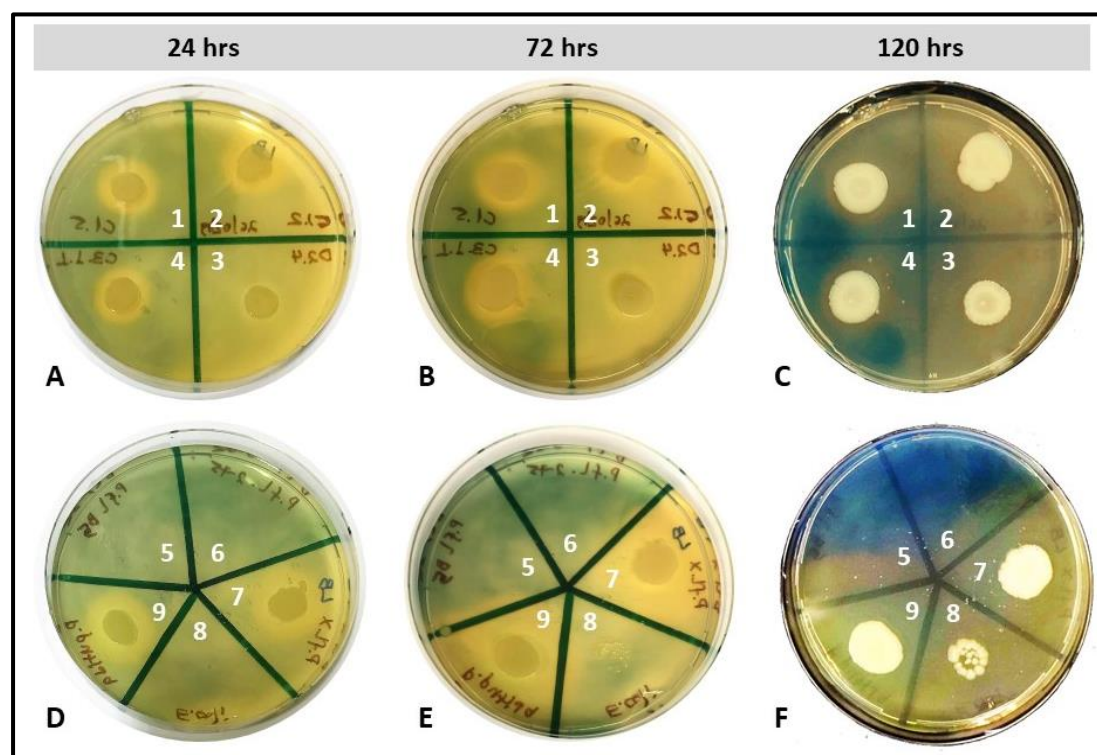
3.5.2 Τροποποιημένη τεχνική O-CAS

Η εφαρμογή της τροποποιημένης τεχνικής O-CAS επιβεβαίωσε την ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων από όλα τα υπό μελέτη στελέχη. Παρατηρήθηκε η δημιουργία διαυγών ζωνών κίτρινου χρώματος (σιδηροφόρα καρβοξυλικού τύπου) περιμετρικά των αποικιών των μικροοργανισμών τις πρώτες 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό, οπότε και πραγματοποιήθηκε μέτρηση της διαμέτρου των ζωνών (Πίνακας 10). Το μέγεθος των ζωνών αυξήθηκε σταδιακά και κάλυψε μεγάλο μέρος της επιφάνειας των τρυβλίων κατά τις 72 και 120 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Η παρουσία CTAB και η απουσία θρεπτικών ουσιών στο επίστρωμα CAS φαίνεται να επηρέασε την ανάπτυξη των στελεχών *P. fluorescens* B5, *P. fluorescens* 2-75, τα οποία δεν αναπτύχθηκαν, καθώς και την ανάπτυξη του *E. coli*, το οποίο παρουσίασε

μειωμένη ανάπτυξη μετά τις 72 ώρες από τον εμβολιασμό. Η κατάταξη των στελεχών με βάση τις μετρήσεις των διαμέτρων των διαυγών ζωνών περιμετρικά των αποικιών τους, 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό έχει ως εξής: *P. fluorescens* X = *P. putida* KT2240 > *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5 = *Enterobacter* sp. C3.1.

Πίνακας 10. Διάμετρος διαυγών ζωνών γύρω από τις αποικίες των μικροοργανισμών και κατάταξη των μικροοργανισμών σε επίπεδα ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων: επίπεδο 1 - απουσία παραγωγής σιδηροφόρων, επίπεδο 2 – μέτριο δυναμικό παραγωγής σιδηροφόρων, επίπεδο 3 – υψηλό δυναμικό παραγωγής σιδηροφόρων.

Βακτηριακό στέλεχος	Διάμετρος διαυγούς ζώνης σε cm	Επίπεδο ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων
<i>Enterobacter</i> sp. C1.2	0,7	2
<i>Enterobacter</i> sp. C1.5	0,8	2
<i>Enterobacter</i> sp. C3.1	0,8	2
<i>Lelliottia</i> sp. D2.4	0,1	2
<i>P. fluor</i> X	1,2	3
<i>P. fluor</i> B5	0	-
<i>P. fluor</i> 2-75	0	-
<i>P. putida</i> KT2240	1,2	3
<i>E. coli</i>	0	-



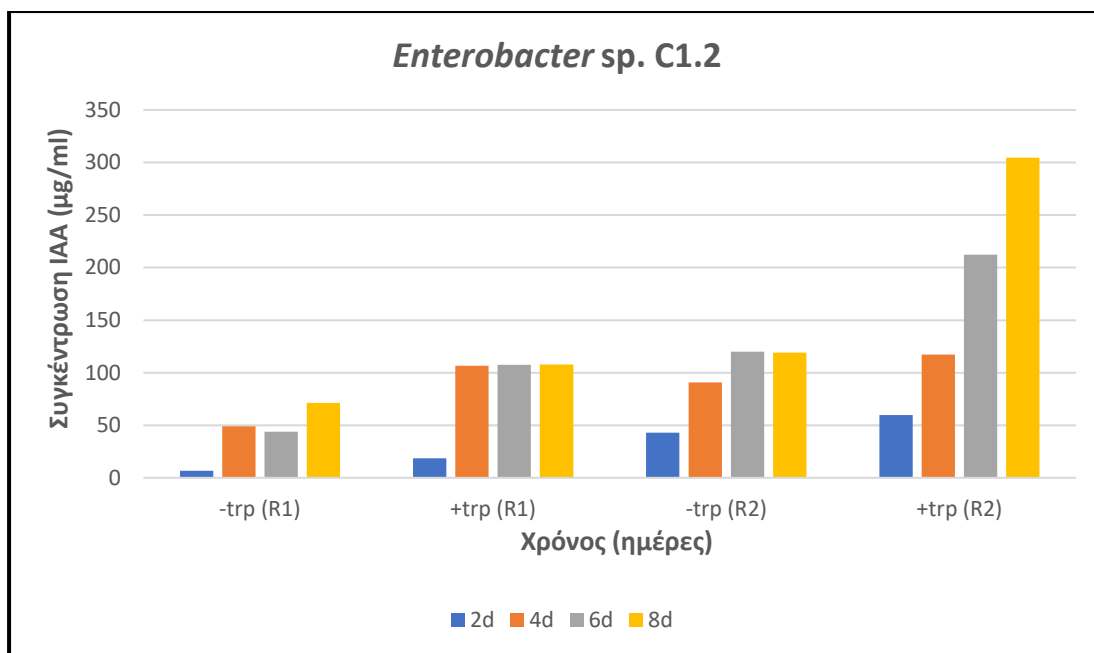
Εικόνα 31. Παρουσίαση αποτελεσμάτων της εφαρμογής της τροποποιημένης τεχνικής O-CAS για τα υπό μελέτη στελέχη 1 – *Enterobacter* sp. C1.2, 2 - *Enterobacter* sp. C1.5, 3 – *Lelliottia* sp. D2.4, 4 - *Enterobacter* sp. C3.1 και τα στελέχη αναφοράς 5 - *P. fluorescens* B5, 6 - *P. fluorescens* 2-75, 7 - *P. fluorescens* X, 8 - *E. coli*, 9 - *P. putida* KT2240, στις 24, 72 και 120 ώρες μετά τον εμβολιασμό. (A) 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό-θετικά αποτελέσματα παραγωγής σιδηροφόρων με δημιουργία διαυγών ζωνών κίτρινου χρώματος γύρω από όλες τις αποικίες του τρυβλίου, (D) 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό-θετικά αποτελέσματα για τα στελέχη στις θέσεις 7 και 9 και απουσία ανάπτυξης στα στελέχη των θέσεων 5,6 και 8, (B) 72 ώρες μετά τον εμβολιασμό-διεύρυνση διαυγών ζωνών για τα στελέχη στις θέσεις 1, 2, 3, 4, (E) 72 ώρες μετά τον εμβολιασμό-διεύρυνση διαυγών ζωνών για τα στελέχη στις

θέσεις 7 και 9, μικρή ανάπτυξη των αποικιών του στελέχους στη θέση 8 και απουσία ανάπτυξης στα στελέχη των θέσεων 5 και 6, (C) 120 ώρες μετά τον εμβολιασμό-αλλαγή χρώματος παρατηρείται σε μεγάλο μέρος της επιφάνειας του τρυβλίου, (F) 120 ώρες μετά τον εμβολιασμό-διεύρυνση των διαυγών ζωνών των στελεχών στις θέσεις 7 και 9, αύξηση του μεγέθους των αποικιών του στελέχους στη θέση 8, απουσία ανάπτυξης των στελεχών στις θέσεις 5 και 6.

3.6 Διερεύνηση παραγωγής Ινδολοξικού οξέος (IAA)

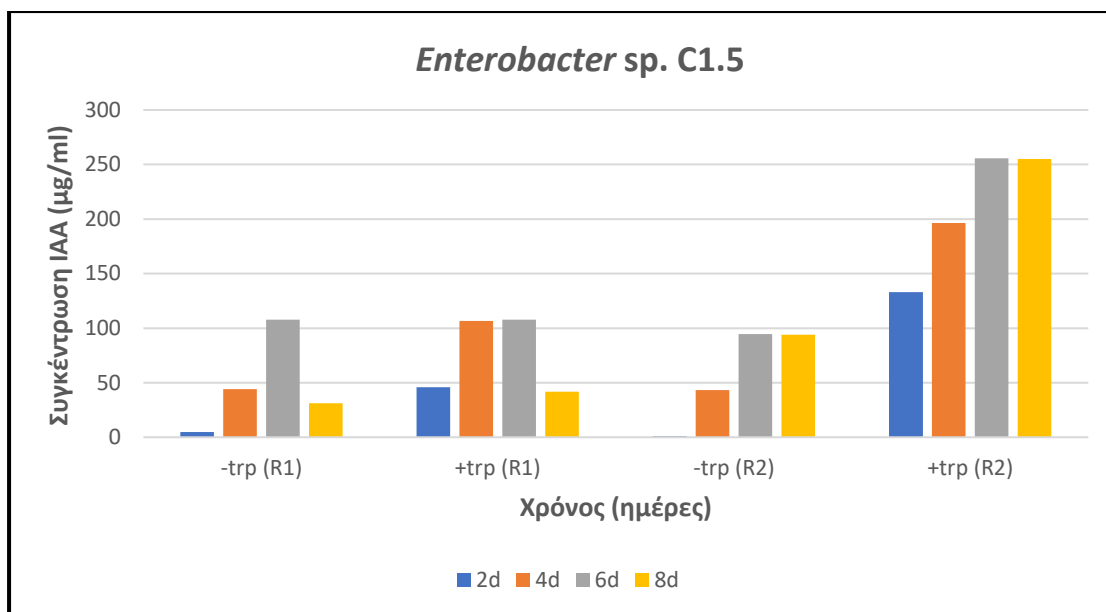
Η παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA) από τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς εξετάστηκε με την εφαρμογή των τεχνικών PC και S2/1, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση του αντιδραστηρίου Salkowski υπό μορφή R1 για την τεχνική PC και υπό μορφή R2 για την τεχνική S2/1 (Παράρτημα). Εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου, η επίδραση της παρουσίας L-Trp στην παραγωγή ινδολοξικού οξέος, καθώς και η ακρίβεια της κάθε τεχνικής στον προσδιορισμό του παραγόμενου IAA. Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό LB περιεκτικότητας 500 µg/ml L-Trp και σε υγρό LB απουσία εξωγενούς L-Trp. Για τις μετρήσεις φασματοφωτομετρίας χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο των βακτηριακών καλλιεργειών και πραγματοποιήθηκαν στα 530 nm σε χρονικά διαστήματα 2, 4, 6 και 8 ημερών. Οι τιμές απορρόφησης μετατράπηκαν στις ισοδύναμες συγκεντρώσεις IAA με τη χρήση των αντίστοιχων πρότυπων καμπυλών.

Συνολικά, παρατηρήθηκε αύξηση του παραγόμενου IAA σε συνάρτηση με το χρόνο καθώς και θετική επίδραση της L-Trp στην παραγωγή IAA. Συγκεκριμένα, όπως παρατηρείται στην εικόνα 32 το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.2 έχει την ικανότητα να παράγει IAA παρουσία και απουσία εξωγενούς L-Trp. Υψηλότερη συγκέντρωση IAA παράχθηκε παρουσία L-Trp. Κατά τη χρήση του αντιδραστηρίου R1, απουσία εξωγενούς L-Trp, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης IAA από 6 µg/ml μέχρι 71 µg/ml την 8^η ημέρα, ενώ παρουσία L-Trp παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση από 18,7 µg/ml τη 2^η ημέρα μέχρι 107,9 µg/ml την 4^η ημέρα, οπότε και παρουσιάστηκε φαινόμενο κορεσμού μέχρι την 8^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό. Από την άλλη πλευρά, με τη χρήση του αντιδραστηρίου R2 απουσία εξωγενούς L-Trp αυξήθηκε προοδευτικά η παραγόμενη ποσότητα IAA μέχρι τα 119 µg/ml την 6^η ημέρα επώασης, οπότε και έφτασε σε επίπεδα κορεσμού μέχρι και την 8^η ημέρα. Προοδευτική αύξηση της παραγόμενης ποσότητας IAA παρατηρήθηκε παρουσία L-Trp, η οποία έφτασε στη μέγιστη τιμή των 304 µg/ml την 8^η ημέρα. Συμπερασματικά, το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.2 παράγει υψηλές ποσότητες IAA παρουσία εξωγενούς L-Trp, ικανές να ανιχνευθούν με ακρίβεια από το αντιδραστήριο R2, το οποίο παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε υψηλές τιμές IAA.



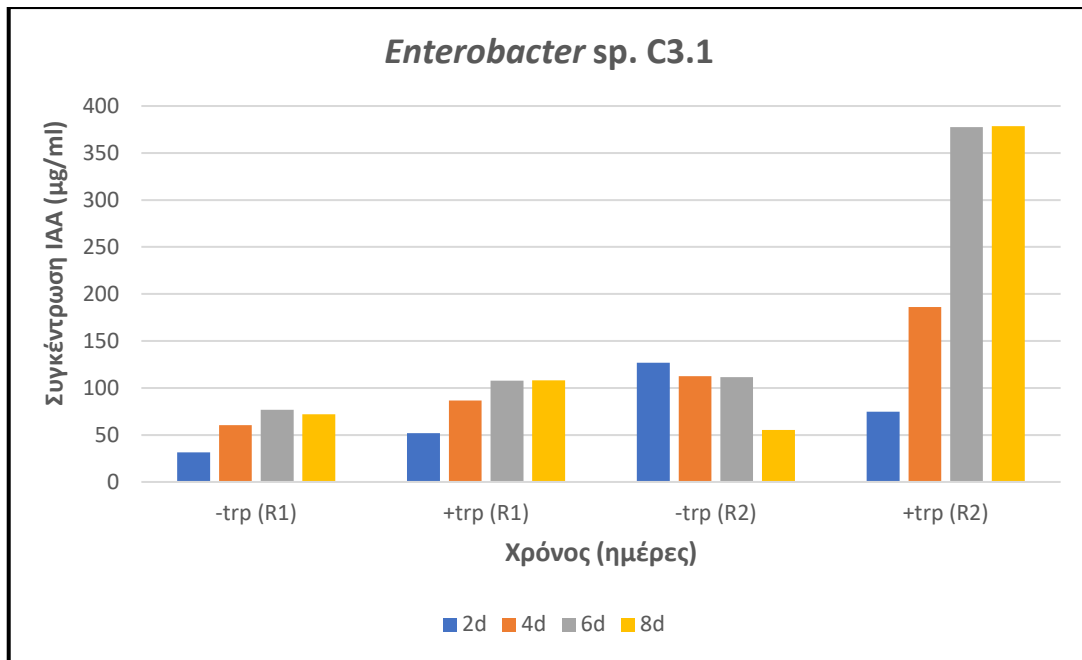
Εικόνα 32. Αποτελέσματα βιοδοκιμής για την παραγωγή IAA από το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.2, με τη χρήση των αντιδραστηρίων R1 και R2. Η παραγόμενη συγκέντρωση IAA παρουσία και απουσία εξωγενούς L-Trp, παρουσιάζεται σε συνάρτηση με το χρόνο (2, 4, 6, 8 ημέρες).

Τα αποτελέσματα για το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.5 παρουσιάζονται στην Εικόνα 33. Το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.5 παρουσίασε ικανότητα εγγενούς παραγωγής IAA, καθώς και ικανότητα παραγωγής IAA έπειτα από χορήγηση εξωγενούς L-Trp. Η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης IAA ανιχνεύθηκε από το αντιδραστήριο R2 την 6^η και 8^η ημέρα επώασης παρουσία L-Trp και ήταν 255 µg/ml. Η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης IAA που ανιχνεύθηκε απουσία L-Trp ήταν 94,6 µg/ml, κατά την 6^η ημέρα επώασης, οπότε και παρατηρήθηκε φαινόμενο κορεσμού μέχρι την 8^η ημέρα. Η μέγιστη τιμή που ανιχνεύθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου R1 ήταν 107 µg/ml και παρατηρήθηκε κατά την 6^η ημέρα σε θρεπτικό μέσο απουσία εξωγενούς L-Trp και κατά την 4^η ημέρα σε θρεπτικό παρουσία L-Trp, οπότε και παρατηρήθηκε κορεσμός. Η ικανότητα του αντιδραστηρίου R2 να ανιχνεύει υψηλότερες τιμές IAA, το καθιστά καταλληλότερο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του παραγόμενου IAA από το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.5.



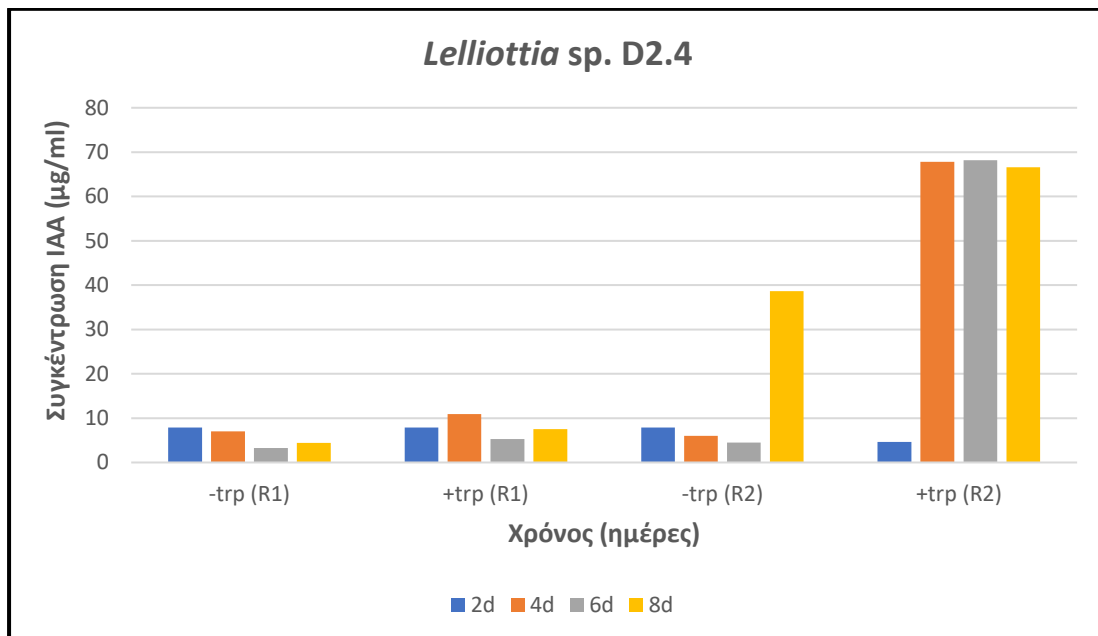
Εικόνα 33. Αποτελέσματα βιοδοκιμής για την παραγωγή IAA από το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.5 με τη με τη χρήση των αντιδραστηρίων R1 και R2. Η παραγόμενη συγκέντρωση IAA παρουσία και απουσία εξωγενούς L-Trp, παρουσιάζεται σε συνάρτηση με το χρόνο (2, 4, 6, 8 ημέρες).

Το στέλεχος *Enterobacter* sp. C3.1 διαθέτει την ικανότητα παραγωγής IAA, όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα της Εικόνας 34. Με τη χρήση του αντιδραστηρίου R1 παρατηρείται σταδιακή αύξηση της παραγωγής IAA απουσία εξωγενούς L-Trp μέχρι τα 76 µg/ml και παρουσία εξωγενούς L-Trp, μέχρι τα 107 µg/ml την 6^η ημέρα επώασης, οπότε και φτάνει σε κορεσμό. Με τη χρήση του αντιδραστηρίου R2 το μέγιστο της ποσότητας που ανιχνεύθηκε από την εγγενή παραγωγή IAA ήταν 111,5 µg/ml κατά τη 2^η ημέρα επώασης, οπότε και άρχισε η σταδιακή μείωση μέχρι τα 55,8 µg/ml την 8^η ημέρα. Παρουσία εξωγενούς L-Trp, έπειτα από χορήγηση του αντιδραστηρίου R2 παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση της παραγόμενης ποσότητας IAA μέχρι 378,4 µg/ml την 8^η ημέρα επώασης. Συμπερασματικά, εξαιτίας των υψηλών τιμών IAA που παρατηρούνται παρουσία L-Trp με τη χρήση του αντιδραστηρίου R2 και λόγω του κορεσμού που παρατηρείται από την 6^η ημέρα με τη χρήση του R1, το R2 κρίθηκε καταλληλότερο για τον προσδιορισμό της ποσότητας του παραγόμενου IAA από το στέλεχος *Enterobacter* sp. C3.1.



Εικόνα 34. Αποτελέσματα βιοδοκιμής για την παραγωγή IAA από το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter* sp. C3.1 με τη με τη χρήση των αντιδραστηρίων R1 και R2. Η παραγόμενη συγκέντρωση IAA παρουσία και απουσία εξωγενούς L-Trp, παρουσιάζεται σε συνάρτηση με το χρόνο (2, 4, 6, 8 ημέρες).

Τέλος, από την Εικόνα 35 παρατηρούμε ότι το στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4 παρήγαγε αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις IAA από τα υπόλοιπα εξεταζόμενα στελέχη. Με την εφαρμογή του αντιδραστηρίου R1 ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις 3,23-10,89 µg/ml, ενώ με τη χρήση του R2 οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν από 4,5-66,58 µg/ml. Η υψηλότερη ανιχνεύσιμη ποσότητα IAA παρατηρήθηκε παρουσία L-Trp με το αντιδραστήριο R2.

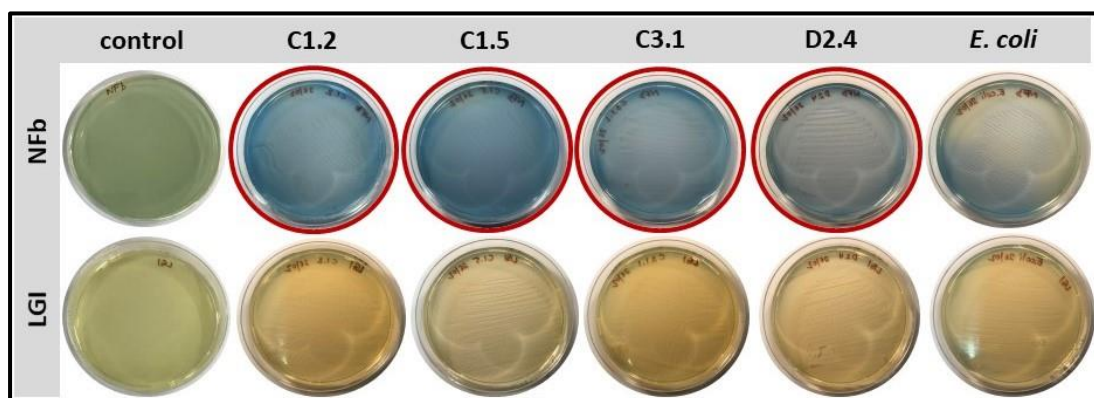


Εικόνα 35. Αποτελέσματα βιοδοκιμής για την παραγωγή IAA από το βακτηριακό στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4 με τη με τη χρήση των αντιδραστηρίων R1 και R2. Η παραγόμενη συγκέντρωση IAA παρουσία και απουσία εξωγενούς L-Trp, παρουσιάζεται σε συνάρτηση με το χρόνο (2, 4, 6, 8 ημέρες).

3.7 Διερεύνηση αφομοίωσης αζώτου

Η ικανότητα αφομοίωσης αζώτου από τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς διερευνήθηκε σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα NFb και LGI, τα οποία δεν περιέχουν πηγή αζώτου.

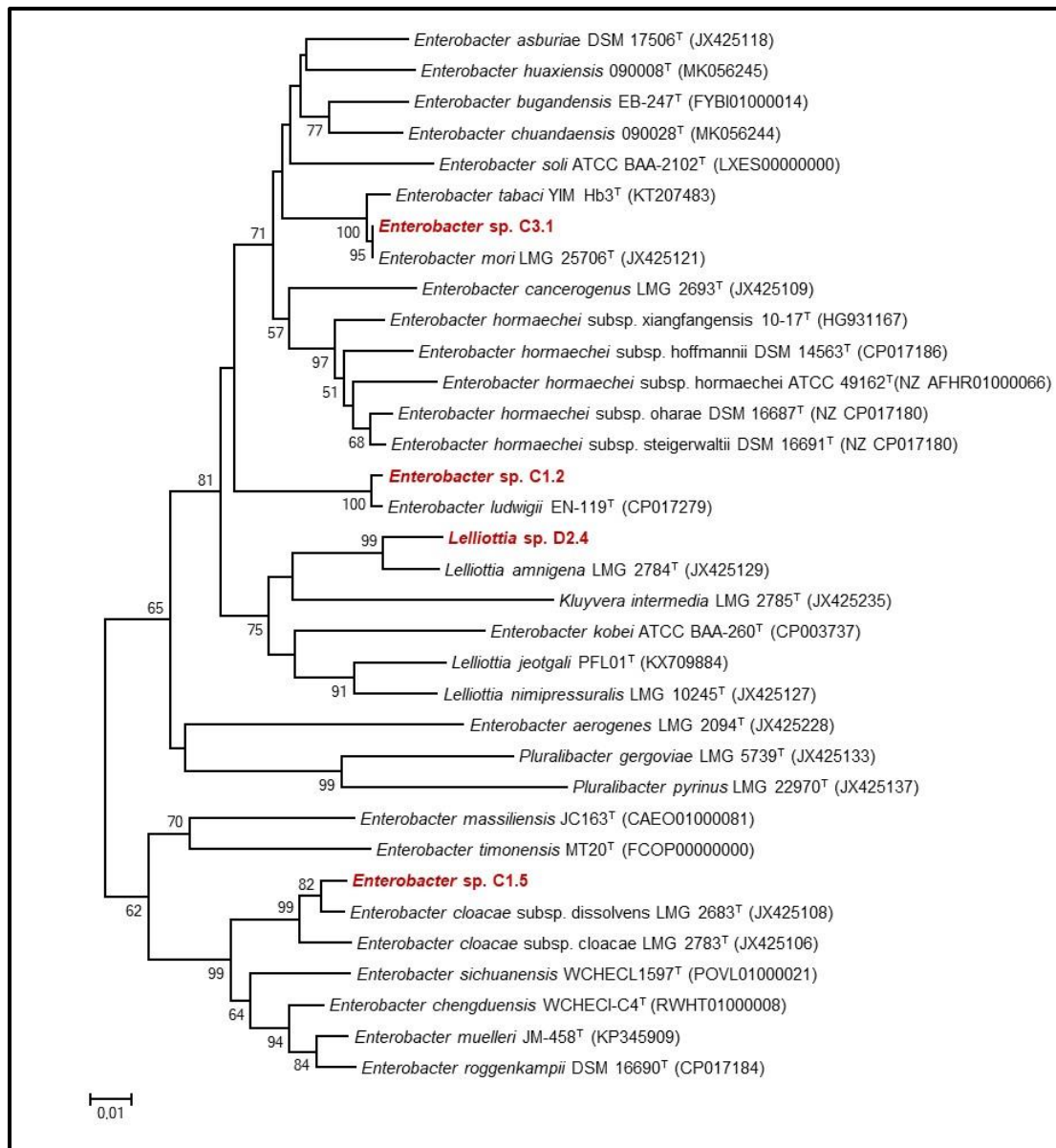
Μετά τις 48 ώρες από τον εμβολιασμό παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος στο θρεπτικό μέσο NFb. Αντιθέτως, καμία αλλαγή χρώματος δεν παρατηρήθηκε στο θρεπτικό μέσο LGI. Συνεπώς σε αυτή την περίπτωση, το θρεπτικό μέσο NFb κρίθηκε καταλληλότερο για την ταυτοποίηση των διαζότροφων στελεχών. Οι μικροοργανισμοί *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1 και *Lelliottia* sp. D2.4 προκάλεσαν αλλαγή χρώματος στο θρεπτικό υπόστρωμα NFb από πράσινο σε μπλε. Η αλλαγή αυτή υποδηλώνει ικανότητα αφομοίωσης αζώτου προς παραγωγή αμμωνίας, η οποία προκαλεί την αλκάλωση του μέσου. Το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* προκάλεσε οξίνιση του θρεπτικού NFb και αλλαγή χρώματος της BTB από ανοιχτό πράσινο σε κίτρινο. Οι παραπάνω παρατηρήσεις παρουσιάζονται στην Εικόνα 36.



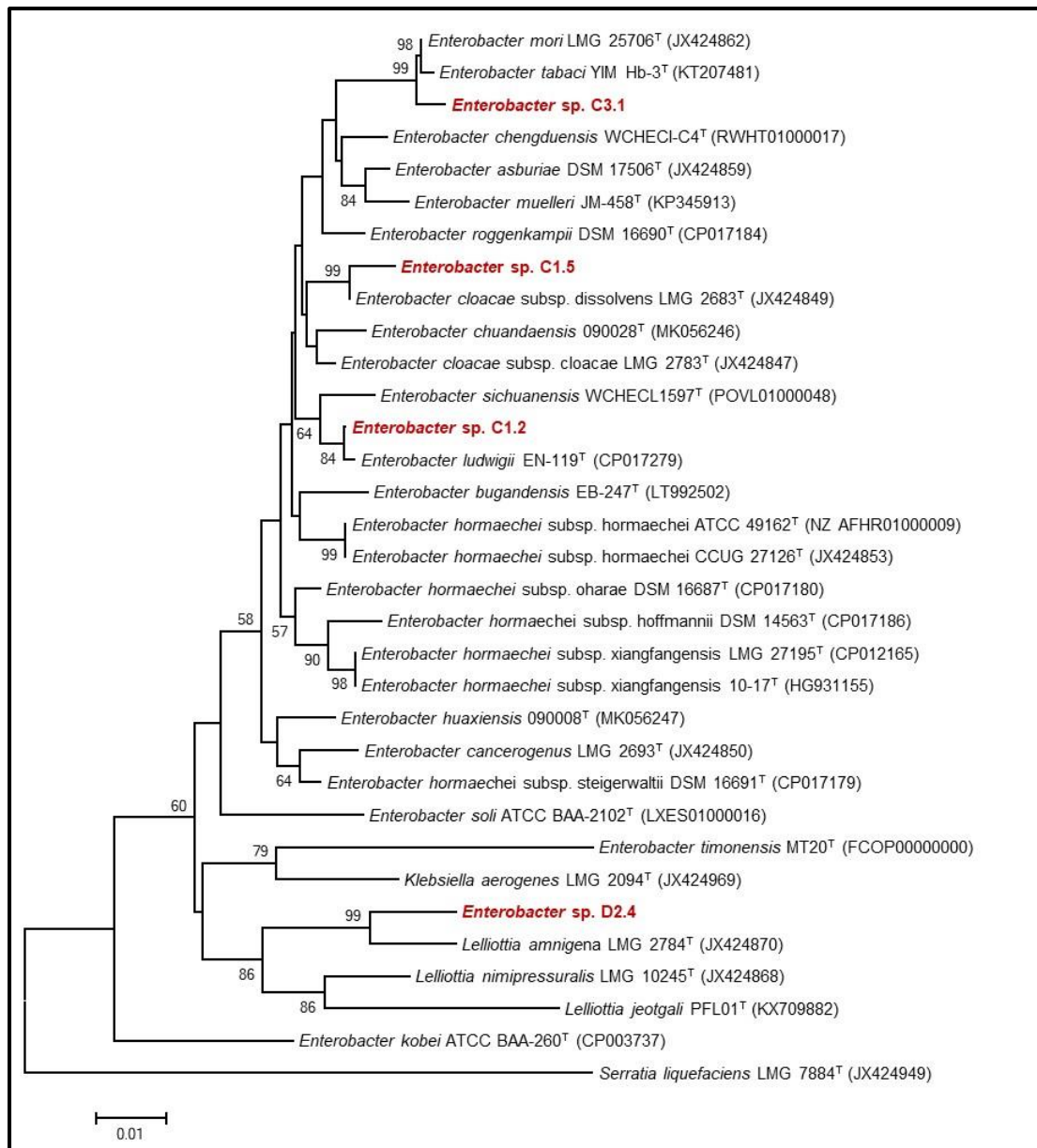
Εικόνα 36. Αποτελέσματα βιοδοκιμής ικανότητας αφομοίωσης αζώτου για τα στελέχη *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1, *Lelliottia* sp. D2.4 και το στέλεχος αναφοράς *E. coli*. Η στήλη του control παρουσιάζει τα μη εμβολιασμένα NFb και LGI θρεπτικά υποστρώματα. Σταδιακή μετατροπή του πράσινου σε μπλε από τα στελέχη *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1, *Lelliottia* sp. D2.4 (κόκκινο πλαίσιο), μετατροπή το μπλε σε κίτρινο από το *E. coli*. Δεν παρατηρείται χρωματική αλλαγή για το θρεπτικό υπόστρωμα LGI.

3.8 Φυλογενετική ανάλυση

Προκειμένου να προσδιοριστεί η φυλογενετική συγγένεια των στελεχών *Enterobacter* sp. C1.2 *Enterobacter* sp. C1.5 *Enterobacter* sp. C3.1 *Lelliottia* sp. D2.4 εφαρμόστηκε MLSA προσέγγιση. Τα γονίδια *atpD* και *infB* χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστούν δύο ξεχωριστά φυλογενετικά δέντρα με τη μέθοδο Neighbor Joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987). Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών των δύο αυτών γονιδίων από τα στελέχη *Enterobacter* sp. και *Lelliottia* sp. με τις αντίστοιχες διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank και ακολούθησε η κατάλληλη περικοπή των νουκλεοτιδικών ακολουθιών, έτσι ώστε μόνο τα ευθυγραμμισμένα (aligned) τμήματα να συμπεριληφθούν στη φυλογενετική ανάλυση. Βάσει των διαθέσιμων αλληλουχιών στη GenBank προσδιορίστηκε ο αριθμός των τάξα που περιλαμβάνονται στην παρούσα ανάλυση, καθώς και το μήκος των στοιχισμένων (aligned) αλληλουχιών για τα γονίδια, τα οποία ήταν 636 bp και 603 bp για τα *atpD* και *infB* αντίστοιχα.



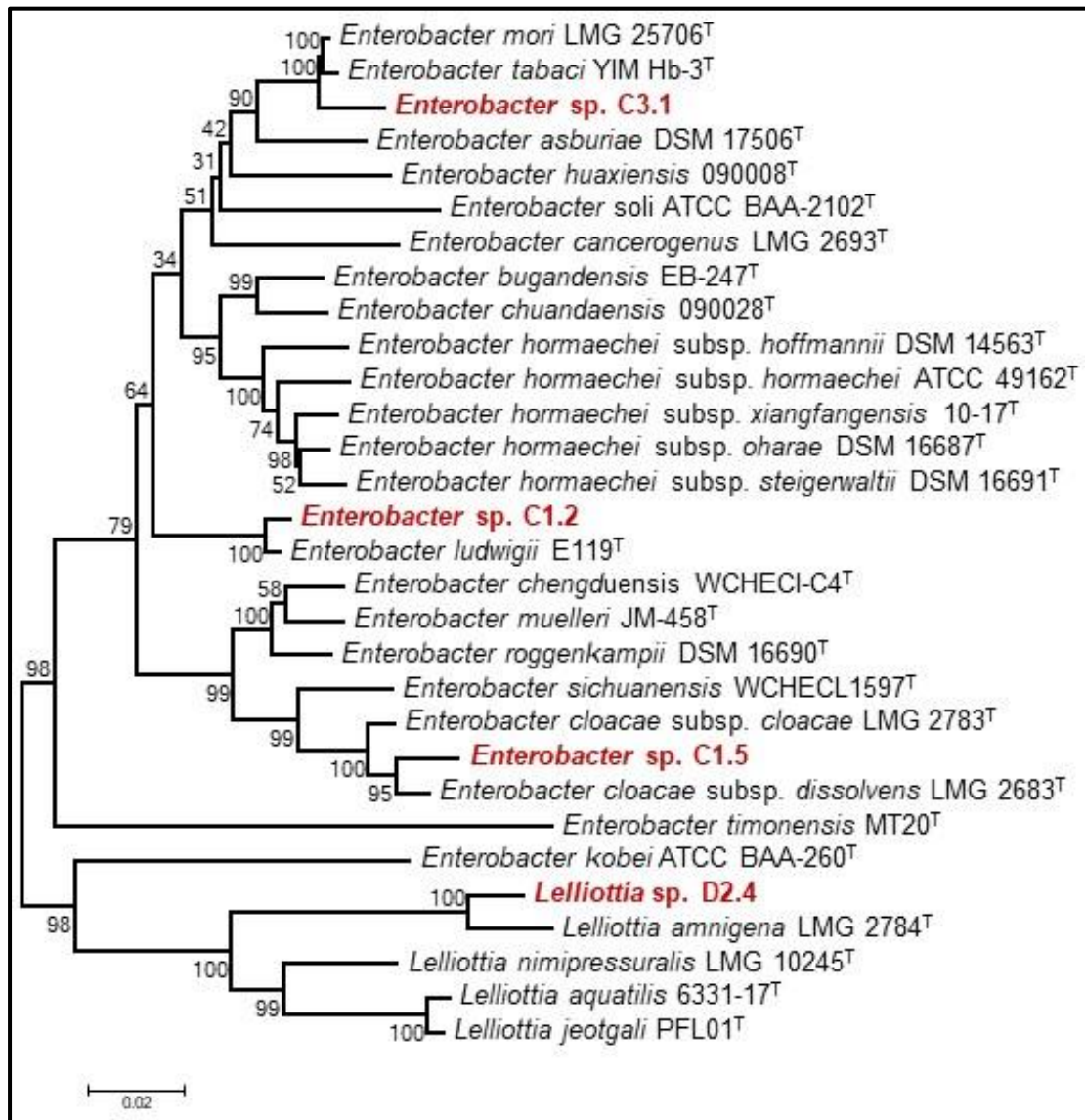
Εικόνα 37. Φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο Neighbor joining (NJ) βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *infB* των εξεταζομένων στελεχών που έχουν απομονωθεί από φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού, στην Ελλάδα και τα αντιπροσωπευτικά στελέχη των γενών *Enterobacter* και *Lelliottia*. Τα πρότυπα στελέχη κάθε γένους υποδεικνύονται με τον εκθέτη "T" (Type strain). Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων GenBank παρατίθενται εντός παρενθέσεως. Η αξιοπιστία και η σταθερότητα του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 500 bootstrap δειγμάτων. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50 % των αντιγράφων bootstrap δεν εμφανίζονται. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993) και το μοντέλο TN93+G+I. Η μπάρα της κλίμακας υποδεικνύει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση. Οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 6.



Εικόνα 38. Φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο Neighbor joining (NJ) βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *atpD* των εξεταζόμενων στελεχών που έχουν απομονωθεί από φυμάρια μαυροματίκου φασολιού, στην Ελλάδα και τα αντιπροσωπευτικά στελέχη των γενών *Enterobacter* και *Lelliottia*. Τα στελέχη εκπρόσωποι υποδεικνύονται με τον εκθέτη "T". Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων GenBank παρατίθενται εντός παρενθέσεως. Η αξιοπιστία και η σταθερότητα του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 500 bootstrap δειγμάτων. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50 % των αντιγράφων bootstrap δεν εμφανίζονται. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) και το μοντέλο K2+G+I. Η μπάρα της κλίμακας υποδεικνύει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση. Οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 6.

Στα μεμονωμένα NJ φυλογενετικά δέντρα των *atpD* και *infB* γονιδίων φαίνεται ότι τα στελέχη *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1 και *Lelliottia* sp. D2.4 σχημάτισαν τέσσερις διαφορετικές ομάδες, ενώ παρατηρήθηκε μία ελαφριά διαφοροποίηση στην τοπολογία του στελέχους *Enterobacter* sp. C3.1. Για να διευκρινιστούν οι ταξινομικές θέσεις όλων των στελεχών, οι στοιχισμένες αλληλουχίες των εξεταζόμενων γονιδίων (*atpD*

και *infB*) ενοποιήθηκαν (concatenated) με τις αλληλουχίες άλλων δύο γονιδίων των *gyrB* και *rpoB*, τα οποία είχαν αλληλουξηθεί σε προηγούμενες έρευνες του κ. Φωτιάδη Χρήστου στο εργαστήριο. Η ενοποιημένη συστοιχία γονιδίων (*atpD*, *infB*, *gyrB* και *rpoB*) είχε μήκος 2613 bp. Το φυλογενετικό δέντρο των γονιδίων, *atpD*, *infB*, *gyrB* και *rpoB* κατασκευάστηκε με τη μέθοδο ML (Felsenstein, 1981). Επιπροσθέτως, εξετάστηκε το ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών μεταξύ των στελεχών *Enterobacter* spp. και μεταξύ των στελεχών *Lelliottia* spp. με δυαδική ευθυγράμμιση/στοίχιση αλληλουχιών και τα αποτελέσματα παρατίθενται στους Πίνακες 11 και 12.



Εικόνα 39. Φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο Maximum Likelihood (ML) βάσει της ακολουθίας των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *atpD*, *infB*, *gyrB* και *rpoB* των εξεταζομένων στελεχών. Τα πρότυπα στελέχη υποδεικνύονται με τον εκθέτη "T". Η αξιοπιστία και η σταθερότητα του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50 % των αντιγράφων bootstrap δεν εμφανίζονται. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο General Time Reversible (Tavare, 1986) και το μοντέλο GTR+G+I. Η μπάρα της κλίμακας υποδεικνύει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση. Οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 6.

Πίνακας 11. Ποσοστά ομοιότητας των αλληλουχιών των στελεχών του γένους *Lelliottia*. Τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας επισημαίνονται χρωματικά.

		1	2	3	4	5
1	<i>Lelliottia</i> sp. D2.4	100.00				
2	<i>Lelliottia</i> <i>aquatilis</i> 6331- 17^T	93.07	100.00			
3	<i>Lelliottia</i> <i>amnigena</i> LMG 2784	97.47	92.81	100.00		
4	<i>Lelliottia</i> <i>jeotgali</i> PFL01	93.38	99.23	92.96	100.00	
5	<i>Lelliottia</i> <i>nimipressuralis</i> LMG 10245^T	93.42	95.37	93.31	95.45	100.00

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
100.00											
96.21	100.00										
95.56	95.98	100.00									
94.99	95.18	94.91	100.00								
95.41	96.21	97.59	94.76	100.00							
94.64	95.71	95.18	94.30	95.45	100.00						
93.69	94.49	94.87	93.20	95.18	96.02	100.00					
93.49	94.34	94.57	93.12	94.95	95.52	98.32	100.00				
95.25	95.22	96.25	95.29	96.13	94.60	94.64	94.22	100.00			
95.22	95.22	96.82	94.91	96.59	94.64	94.95	94.72	97.21	100.00		
95.56	95.37	96.67	94.99	96.71	94.95	95.06	94.95	97.55	97.86	100.00	
95.52	95.29	96.36	95.22	96.40	94.72	94.76	94.60	97.32	97.78	98.62	100.00
95.64	95.52	96.63	95.10	96.75	94.80	94.91	94.72	97.59	97.63	98.66	98.43
95.52	95.60	95.10	95.02	95.02	94.14	93.38	93.30	95.10	94.83	95.10	95.10
92.35	92.00	91.92	91.85	92.04	91.47	90.89	90.82	91.43	91.54	91.43	91.62
94.87	95.02	95.48	94.95	95.25	95.10	94.64	94.37	95.83	95.79	95.56	95.52
98.55	97.01	96.10	95.41	95.98	95.06	94.11	94.07	95.64	95.52	95.91	95.98
94.87	96.40	94.95	93.99	95.29	97.97	96.10	95.75	94.37	94.45	94.68	94.64
94.60	95.37	95.22	93.95	95.14	97.67	95.94	95.83	94.80	94.83	94.76	94.60
93.65	94.30	94.83	93.07	94.95	96.29	96.79	96.33	93.88	94.68	94.57	94.18
95.14	94.83	94.60	94.34	94.57	93.72	92.88	92.65	94.57	94.34	94.30	94.57
98.39	96.98	95.94	95.33	95.90	95.02	94.11	94.07	95.56	95.44	95.83	95.90
91.08	91.04	91.62	91.01	91.73	92.46	91.62	91.39	91.35	91.89	91.81	91.66

	1	2
1	<i>Enterobacter</i> sp. C1.2	100.00
2	<i>Enterobacter</i> sp. C1.5	94.30
3	<i>Enterobacter</i> sp. C3.1	94.99
4	<i>Enterobacter asburiae</i> DSM 17506 ^T	94.87
5	<i>Enterobacter bugandensis</i> EB-247 ^T	95.25
6	<i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693 ^T	94.76
7	<i>Enterobacter chuandaensis</i> 090028 ^T	95.14
8	<i>Enterobacter chengduensis</i>	94.95
9	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> LMG 2783 ^T	94.53
10	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> LMG 2683 ^T	94.03
11	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	95.52
12	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	95.64
13	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> DSM	95.41
14	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> DSM	95.37
15	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> 10-17 ^T	95.56
16	<i>Enterobacter huaxiensis</i> 090008 ^T	94.57
17	<i>Enterobacter kobei</i> ATCC	91.70
18	<i>Enterobacter ludwigii</i> E119T NZ J ^T	99.20
19	<i>Enterobacter mori</i> LMG 25706 ^T	94.95
20	<i>Enterobacter muelleri</i> JM-458 ^T	94.83
21	<i>Enterobacter roggenkampii</i> DSM	95.14
22	<i>Enterobacter sichuanensis</i> WCHECL1597 ^T	94.72
23	<i>Enterobacter soli</i> ATCC	94.57
24	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM	94.91
25	<i>Enterobacter timonensis</i> MT20 ^T	91.08

4. Συζήτηση

Ανάλυση ομαδικής κινητικότητας

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να αντιλαμβάνονται και να αντιδρούν σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος αποτελεί μία από τις βασικότερες ιδιότητες που συμβάλλει στην ικανότητα αποίκησης διαφορετικών ενδιαιτημάτων (Hartmann et al., 2009; Porter et al., 2011; Wadhams and Armitage, 2004). Τα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη δεν επέδειξαν ιδιαίτερη ικανότητα ομαδικής κινητικότητας υπό τις συνθήκες που εξετάστηκαν.

Ανάλυση αντοχής βακτηρίων σε συνθήκες αλατότητας

Η αλατότητα του εδάφους επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών και προκαλεί μείωση του ξηρού βάρους του βλαστού και της ρίζας τους (Bartels and Sunkar, 2005; Flowers, 2004). Έχει αποδειχτεί ότι ο εμβολιασμός των φυτών με βακτήρια τα οποία παρουσιάζουν αντοχή σε υψηλή αλατότητα, σε συνδυασμό με άλλα PGP χαρακτηριστικά, όπως η παραγωγή IAA και σιδηροφόρων συμβάλλει στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών σε συνθήκες αλατότητας (Ali et al., 2015; Naz and Bano, 2010; Shukla et al., 2012). Στην παρούσα μελέτη όλα τα εξεταζόμενα στελέχη επέδειξαν αντοχή σε αλατότητα μέχρι και 8 % NaCl. Προηγούμενες μελέτες έχουν εξετάσει την αντοχή στελεχών *Enterobacter* σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις NaCl. Το στέλεχος *Enterobacter* sp. EJ01 παρουσίασε αντοχή σε 200 mM NaCl και συνέβαλλε στην προαγωγή της ανάπτυξης φυτών τομάτας και *Arabidopsis* υπό συνθήκες αλατότητας (Kim et al., 2014), ενώ το στέλεχος *Enterobacter* sp. UPMR18 ενίσχυσε της ανάπτυξη φυτών μπάμιας σε 75 mM NaCl (Habib et al., 2016) και το *Enterobacter* sp. P23 παρουσίασε προαγωγή της ανάπτυξης φυτών ρυζιού υπό συνθήκες αλατότητας (Sarkar et al., 2018). Στελέχη του συμπλέγματος του *Enterobacter cloacae* έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν αντοχή σε συνθήκες αλατότητας μέχρι 200 mM NaCl και συμβάλλουν στην προαγωγή στην ενίσχυση της αντοχής των φυτών σε συνθήκες αλατότητας (Bhise et al., 2017; Li et al., 2017; Singh et al., 2017). Το στέλεχος *Enterobacter cloacae* SBP-8 βρέθηκε ότι προάγει την ανάπτυξη φυτών σιταριού σε 200 mM NaCl (Singh et al., 2017), ενώ το στέλεχος *Enterobacter cloacae* KBPD συνέβαλλε στην αντοχή και την ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών *Vigna radiata* σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 150 mM (Bhise et al., 2017).

Ανάλυση ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου

Οι μικροοργανισμοί με ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου (PSM) λειτουργούν μετατρέποντας τις αδιάλυτες μορφές του φωσφόρου του εδάφους, φωσφορικό ασβέστιο, φωσφορικό αργίλιο, φωσφορικό σίδηρο σε διαλυτές μορφές, αφομοιώσιμες από τα φυτά (Sims and Pierzynski, 2005). Σημαντικός πληθυσμός PSM αποικίζουν τη ριζόσφαιρα και λειτουργούν συμβάλλοντας στην αύξηση της διαθεσιμότητας του φωσφόρου για τα φυτά (Tarafdar and Claassen, 1988).

Η αξιολόγηση της ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου από τα εξεταζόμενα στελέχη πραγματοποιήθηκε σε στερεό και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα NBRIP/BPB. Αρκετά βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν διαφορετική εμφάνιση στα δύο είδη υποστρώματος, γεγονός το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα έρευνα. Ορισμένοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS). Στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα παρατηρείται η τοπική συσσώρευση των EPS στην περιοχή των ανεπτυγμένων αποικιών, τα οποία σε συνδυασμό με το οργανικά οξέα μπορεί να συμβάλλουν στην αποτελεσματικότερη

διαλυτοποίηση του φωσφόρου (Yi et al., 2008). Αντίθετα, σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα οι EPS δαισκορπίζονται στο μέσο, γεγονός το οποίο είναι πιθανόν να μειώνει την απόδοση ορισμένων στελεχών (Mara et al., 2011). Εξετάστηκε η συμβολή τεσσάρων διαφορετικών πηγών άνθρακα στην ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου στο στερεό NBRIP/BPB: Γλυκόζη (Glu), Γλυκερόλη (Gly), Αραβινόζη (Ara) και Φρουκτόζη (Fru). Έρευνες έχουν δείξει ότι η γλυκόζη αποτελεί την καταλληλότερη πηγή άνθρακα για τη βελτίωση της ικανότητας των PSM να διαλυτοποιούν φώσφορο, υποδεικνύοντας ότι με την αύξηση της παρεχόμενης ποσότητας γλυκόζης, αυξήθηκε και η διαλυτοποίηση φωσφόρου (Banik, 1982; Nautiyal, 2006; Sharan et al., 2008). Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συμβαδίζουν με τα δεδομένα αυτά, καθώς όλα τα εξεταζόμενα στελέχη εμφάνισαν υψηλότερη ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου υπό την παρουσία γλυκόζης, γεγονός το οποίο οδήγησε στη χρήση της ως πηγή άνθρακα και στο υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP/BPB. Τα εξεταζόμενα στελέχη εμφάνισαν υψηλότερη ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου από το θετικό στέλεχος αναφοράς *P. putida*, σε υγρό και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ωστόσο, η *P. putida* εμφάνισε ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου στα ίδια περίπου επίπεδα στις 24 ώρες με τα εξεταζόμενα στελέχη, στο υγρό NBRIP/BPB, σε αντίθεση με την πολύ μικρή ζώνη διαλυτοποίησης που παρουσίασε στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει, όπως προαναφέρθηκε, τη διαφοροποίηση της ικανότητας διαλυτοποίησης ορισμένων στελεχών σε στερεό και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.

Μελέτες για την επίδραση του pH στη διαλυτοποίηση φωσφόρου έχουν δείξει ότι χαμηλές τιμές pH ευνοούν το δυναμικό διαλυτοποίησης (Mara et al., 2011). Μικροοργανισμοί που επιφέρουν μεγαλύτερη μείωση του pH παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη διαλυτοποίηση φωσφόρου (Daimon, 2006; Kumar and Narula, 1999; Sridevi et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις που η μείωση του pH δεν παρουσίασε καμία επίδραση στη διαλυτοποίηση (Yi et al., 2008). Αν και η *P. putida* παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της τιμής του pH δεν παρουσίασε την υψηλότερη ικανότητα διαλυτοποίησης. Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη παρουσίασαν αλλαγή χρώματος του υγρού και στερεού NBRIP, καθώς και τη δημιουργία διαυγών ζωνών διαλυτοποίησης στο στερεό υπόστρωμα, με το στέλεχος *Enterobacter* sp. C3.1 να παρουσιάζει την υψηλότερη ικανότητα διαλυτοποίησης σε στερεό και υγρό θρεπτικό μέσο. Η αλλαγή χρώματος από πράσινο σε κίτρινο υποδεικνύει μείωση του pH, η οποία μπορεί να οφείλεται στην απελευθέρωση οργανικών οξέων από τα στελέχη, τα οποία συμβάλλουν στη διαλυτοποίηση του φωσφόρου (Deubel et al., 2000; Goldstein, 1995; Kromblekou and Tabatabai, 1994; Sharma et al., 2011).

Ανάλυση ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων

Ο σίδηρος του εδάφους βρίσκεται σε αδιάλυτη, μη αφομοιώσιμη μορφή (Fe^{+3}) (Lamanceau et al., 2009). PGPR/PGPB με ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων συμβάλλουν στην αύξηση της διαθεσιμότητας του σιδήρου, τόσο για τα ίδια τα βακτήρια, όσο και για τα φυτά (Neilands, 1981).

Για τη διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων από τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς εφαρμόστηκαν δύο τεχνικές, η τεχνική O-CAS και μία τροποποιημένη εκδοχή της τεχνικής O-CAS. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η τεχνική O-CAS αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο, η οποία εξασφαλίζει την πρόσβαση των εξεταζόμενων μικροοργανισμών στα θρεπτικά συστατικά του μέσου, καθώς την προστασία τους από τη

βακτηριοκτόνο δράση του CTAB, (Ames-Gottfred et al., 1989; Milagres et al., 1999; Schwyn and Neilands, 1987). Ωστόσο, κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ανάπτυξη των βακτηριακών καλλιέργειών στο επίστρωμα CAS, γεγονός το οποίο οδηγεί σε εσφαλμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην εφαρμογή μίας τροποποιημένης εκδοχής της τεχνικής O-CAS, η οποία όμως ενέχει τον κίνδυνο παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, καθώς κατά την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, οι βακτηριακές καλλιέργειες εμβολιάζονται στην επιφάνεια του επιστρώματος CAS, το οποίο από τη μία πλευρά δεν περιέχει θρεπτικά συστατικά ικανά να καλύψουν τις ανάγκες των βακτηρίων και από την άλλη πλευρά περιέχει CTAB, μία ουσία η οποία έχει βακτηριοκτόνο δράση απέναντι σε μύκητες, Gram⁺ βακτήρια και ορισμένα Gram⁻ βακτήρια. Το γεγονός αυτό είναι πιθανόν να ερμηνεύει την απουσία ανάπτυξης των στελεχών *P. fluorescens* B5, *P. fluorescens* 2-75 και *E. coli*, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Ωστόσο, η τροποποιημένη αυτή εκδοχή αποδείχθηκε κατάλληλη για την αξιολόγηση της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων από τους εξεταζόμενους οργανισμούς και δε φάνηκε να λειτουργεί παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των στελεχών *P. fluorescens* X και *P. putida* (θετικοί μάρτυρες). Όλοι οι μικροοργανισμοί παρουσίασαν τη δημιουργία διαυγούς ζώνης διαλυτοποίησης από 0-1 (επίπεδο 2) και αλλαγή χρώματος στο υπόστρωμα, έπειτα από 72 ώρες επώασης. Οι μικροοργανισμών *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5 και *Enterobacter* sp. C3.1 δημιούργησαν διαυγείς ζώνες μεγαλύτερου μεγέθους από αυτή του *Lelliottia* sp. D2.4, με τους *Enterobacter* sp. C1.5 και *Enterobacter* sp. C3.1 να παρουσιάζουν το μεγαλύτερο μέγεθος, πιθανότατα εξαιτίας της παραγωγής και έκκρισης υψηλότερων ποσοτήτων σιδηροφόρων. Η έκκριση διαφορετικών τύπων σιδηροφόρων έχει συνδεθεί με χρωματική διαφοροποίηση των διαυγών ζωνών, το οποίο όμως είναι πιθανό να οδηγήσει σε λανθασμένη εκτίμηση και ως εκ τούτου, κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή βιοχημικού ελέγχου, για τον ακριβέστερο προσδιορισμό του είδους των σιδηροφόρων (Milagres et al., 1999; Neilands, 1984; Payne, 1994, p. 199; Pérez-Miranda et al., 2007). Όλοι οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί παρουσίασαν τη δημιουργία διαυγών ζωνών κίτρινου χρώματος, το οποίο συνδέεται με την παραγωγή σιδηροφόρων καρβοξυλικού τύπου, το οποίο είναι πιθανόν να ισχύει και στην περίπτωση αυτή (Pérez-Miranda et al., 2007). Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στελέχη του γένους *Enterobacter*, όπως το *Enterobacter cloacae* εκκρίνουν, συνήθως εντεροβακτίνη, το οποίο είναι σιδηροφόρο κατεχολικού τύπου και αεροβακτίνη, το οποίο είναι υδροξαμικού τύπου (Costa and Loper, 1994; Mokracka et al., 2011, 2004; Van Tiel-Menkveld et al., 1982). Για το λόγο αυτό, συνιστάται περαιτέρω βιοχημικός έλεγχος για τον προσδιορισμό του τύπου των σιδηροφόρων που εκκρίνονται από τα εξεταζόμενα στελέχη.

Ανάλυση ικανότητας παραγωγής IAA

Ριζοβακτήρια με ικανότητα παραγωγής IAA μπορεί να συμβάλλουν στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών, ιδιαιτέρως σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και κατά τη διάρκεια της ριζοβολίας (Bartel, 1997; Etesami et al., 2015; Spaepen and Vanderleyden, 2011). Τα θετικά αποτελέσματα του IAA εξαρτώνται από την συγκέντρωση της ορμόνης, καθώς αρκετά υψηλές ποσότητες IAA μπορεί να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των φυτών (Glick, 2012). Το IAA παράγεται κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης ανάπτυξης των βακτηρίων, καθώς αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη. Ωστόσο, η διάρκεια της στατικής φάσης ποικίλει ανάμεσα στα βακτήρια, έτσι κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της ανάπτυξης

του κάθε εξεταζόμενου στελέχους ξεχωριστά, ώστε να προσδιοριστεί η περίοδος της υψηλότερης παραγωγής IAA (Rosangela et al., 2012).

Για τη διερεύνηση της παραγωγής IAA από τα εξεταζόμενα στελέχη εφαρμόστηκαν δύο τεχνικές, η PC και η S2/1, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση του αντιδραστηρίου Salkowski υπό μορφή R1 για την τεχνική PC και υπό μορφή R2 για την τεχνική S2/1. Η διαφορά των δύο τεχνικών έγκειται στην ευαισθησία που παρουσιάζουν ως προς την ποσότητα του παραγόμενου IAA που μπορούν να ανιχνεύσουν. Η τεχνική PC παρουσιάζει υψηλότερο δυναμικό ανίχνευσης υψηλών συγκεντρώσεων IAA έως και παραπάνω από 200 µg/ml, ενώ η τεχνική S2/1 παρουσιάζει υψηλότερη απόδοση στην ανίχνευση χαμηλότερων ποσοτήτων IAA περίπου έως 20 µg/ml. Βάσει των αποτελεσμάτων, η τεχνική PC αποδείχθηκε καταλληλότερη για την ανίχνευση της συγκέντρωσης του IAA, για τα στελέχη *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5 και *Enterobacter* sp. C3.1, τα οποία παρουσίασαν την ικανότητα παραγωγής υψηλών συγκεντρώσεων IAA παρουσία L-Trp, 304 µg/ml, την 8^η ημέρα επώασης, 255 µg/ml, την 6^η ημέρα και 378,4 µg/ml, την 6^η-8^η ημέρα, αντίστοιχα. Η τεχνική S2/1 αποδείχθηκε επαρκής για την ανίχνευση της συγκέντρωσης του παραγόμενου IAA από το στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4, στέλεχος το οποίο επέδειξε χαμηλή παραγωγή IAA ακόμη και υπό την παρουσία L-Trp. Η L-Trp αποτελεί πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση του IAA από φυτά και μικροοργανισμούς (C. Patten and Glick, 2002b; Prinsen et al., 1993). Οι ριζικές εκκρίσεις αποτελούν φυσική πηγή του αμινοξέος L-Trp για τους μικροοργανισμούς, αυξάνοντας την παραγωγή IAA στη ριζόσφαιρα (Dakora and Phillips, 2002). Στο παρελθόν, έχει αξιολογηθεί η παραγωγή IAA από ριζοβακτήρια, σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε 0, 10, 25, 50, 100 και 150 mg/ml L-Trp και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλότερη συγκέντρωση IAA παρατηρήθηκε υπό την παρουσία 150 mg/ml L-Trp (Rosangela et al., 2012). Έρευνες έχουν υποδείξει την αύξηση της παραγωγής IAA από στέλεχος του γένους *Enterobacter*, όπως και από το στέλεχος *E. cloacae* υπό την παρουσία L-Trp στο θρεπτικό μέσο (Bose et al., 2016; Ghosh et al., 2015). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, στελέχη του γένους *Enterobacter* παρουσιάζουν την ικανότητα παραγωγής IAA σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Για παράδειγμα, τα επίπεδα παραγόμενου IAA από το στέλεχος *E. ludwigii* κυμάνθηκαν από 96,87 µg/ml έως 240 µg/ml (T. Chen et al., 2014; Khalifa et al., 2016; Roy et al., 2016; Shoebitz et al., 2009; Swamy et al., 2016), για το *E. homaechei* στα 332 µg/ml (Walpola and Arunakumara, 2016), ενώ για τα στελέχη, *E. homaechei* subs. *verschuerenii* και *Enterobacter* sp. (FJ890899) στα 152,63 µg/ml και 136,9 µg/ml, αντίστοιχα (Rosangela et al., 2012). Αντιθέτως, στελέχη του γένους *Lelliottia* αναφέρονται λιγότερο συχνά για την ικανότητά τους να συνθέτουν IAA (Menendez et al., 2016).

Ανάλυση ικανότητας αζωτοδέσμευσης

Τα φυτά αδυνατούν να προσλάβουν απευθείας το μοριακό άζωτο από το περιβάλλον (N₂). Η πρόσληψή του καθίσταται ικανή μέσω της βιολογικής αζωτοδέσμευσης, η οποία τελείται από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Για αρκετά χρόνια, επικρατούσε η πεποίθηση ότι ένας μικρός αριθμός βακτηριακών ειδών έχει την ικανότητα να αζωτοδεσμεύει, ωστόσο, τα τελευταία 30 χρόνια έχει αποδειχθεί ότι πολυάριθμα στελέχη βακτηρίων και αρχαίων διαθέτουν την ικανότητα αυτή (Franche et al., 2009). Στελέχη του γένους *Enterobacter* με ικανότητα αζωτοδέσμευσης έχουν απομονωθεί από την ενδόσφαιρα φυτών και από το

εσωτερικό φυματίων ψυχανθών (Glick et al., 1995, p. 1; Hoque et al., 2011; Li et al., 2008; Ogbo and Okonkwo, 2012; Prakamhang et al., 2009).

Η ικανότητα των υπό μελέτη στελεχών να αζωτοδεσμεύουν εξετάστηκε σε δύο διαφορετικά είδη στερεών υποστρωμάτων, NFb/BTB και LGI/BTB. Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη παρουσίασαν αλλαγή χρώματος του υποστρώματος NFb/BTB από πράσινο σε μπλε, έπειτα από 48 ώρες επώασης, γεγονός το οποίο πιθανότατα οφείλεται στην ικανότητα τους να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο. Το αρνητικό στέλεχος αναφοράς, *E. coli* προκάλεσε αλλαγή χρώματος του υποστρώματος από πράσινο σε κίτρινο, υποδεικνύοντας οξίνιση του μέσου, η οποία πιθανόν να συνδέεται με αδυναμία του στελέχους να αζωτοδεσμεύει. Πρόσφατα έχει αναφερθεί η ικανότητα αζωτοδέσμευσης από 9 στελέχη *Enterobacter* sp. φυλογενετικά κοντά με το *Enterobacter cloacae*, σε στερεό υπόστρωμα NFb/BTB (Swamy et al., 2016). Αντιθέτως, στο θρεπτικό υπόστρωμα LGI δεν παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος από κανένα στέλεχος, γεγονός το οποίο πιθανώς να οφείλεται στη διαφορετική σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος.

Σύγκριση φυλογένειας των εξεταζόμενων στελεχών βάσει των γονιδίων *atpD* και *infB*

Η ταξινομική τοποθέτηση των στελεχών των γενών *Enterobacter* και *Lelliottia* βάσει των δύο NJ φυλογενετικών δέντρων των γονιδίων *atpD* και *infB* έδειξε ότι τα εξεταζόμενα στελέχη, *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1 και *Lelliottia* sp. D2.4 τοποθετούνται σε τέσσερις διαφορετικούς κλάδους. Η τοπολογία των στελεχών *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5 και *Lelliottia* sp. D2.4 είναι κοινή και στα δύο φυλογενετικά δέντρα, ωστόσο, παρατηρείται μία ελαφριά διαφοροποίηση όσον αφορά την τοπολογία του *Enterobacter* sp. C3.1. Στο φυλογενετικό δέντρο NJ του γονιδίου *atpD*, το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.2 είναι φυλογενετικά κοντά με το στέλεχος *E. ludwigii* E119^T με αξιοπιστία 100 % των bootstrap δειγμάτων, ενώ στο φυλογενετικό δέντρο NJ του γονιδίου *infB* η αξιοπιστία κυμαίνεται στο 84 % των bootstrap δειγμάτων. Το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.5 παρουσιάζεται φυλογενετικά κοντά με το *E. cloacae* subs. *dissolvens* LMG 2683^T, με αξιοπιστία 82 % και 84 % για τα φυλογενετικά δέντρα του *atpD* και του *infB*, αντίστοιχα. Βάσει του φυλογενετικού δέντρου του *atpD*, το στέλεχος *Enterobacter* sp. C3.1 παρουσιάζεται φυλογενετικά κοντά με το *E. mori* LMG 25706^T, με αξιοπιστία 95 % των bootstrap δειγμάτων, ενώ στο φυλογενετικό δέντρο του *infB* φαίνεται να απαρτίζει ξεχωριστή γενεαλογική σειρά παρουσιάζοντας φυλογενετική συγγένεια με τα στελέχη *E. mori* LMG 25706^T και *E. tabaci* YIM Hb-3^T με 99 % αξιοπιστία. Το στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4 παρουσιάζεται φυλογενετικά κοντά με το στέλεχος *L. amnigena* LMG 2784^T, με αξιοπιστία 95 % και 99 % των bootstrap δειγμάτων για τα φυλογενετικά δέντρα των *atpD* και *infB*, αντίστοιχα.

Σύγκριση φυλογένειας των εξεταζόμενων στελεχών βάσει της ενοποιημένης ακολουθίας των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *atpD*, *infB*, *gyrB* και *rpoB*

Η ταξινομική τοποθέτηση των στελεχών των γενών *Enterobacter* και *Lelliottia* βάσει του ML φυλογενετικού δέντρου για τη νουκλεοτιδική ακολουθία των γονιδίων *atpD*, *infB*, *gyrB* και *rpoB* έδειξε ότι τα στελέχη *Enterobacter* sp. C1.2, *Enterobacter* sp. C1.5, *Enterobacter* sp. C3.1

και *Lelliottia* sp. D2.4 τοποθετούνται σε τέσσερις διαφορετικούς κλάδους. Το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.2 είναι φυλογενετικά κοντά με το στέλεχος *E. ludwigii* E119^T με αξιοπιστία 100 % των bootstrap δειγμάτων. Το στέλεχος *Enterobacter* sp. C1.5 τοποθετείται στον κλάδο του *E. cloacae* και είναι φυλογενετικά κοντά με το στέλεχος *E. cloacae* subs. *dissolvens* LMG 2683^T με αξιοπιστία 99 % των bootstrap δειγμάτων δημιουργώντας ξεχωριστή γενεαλογική σειρά (lineage). Το *Enterobacter* sp. C3.1 είναι φυλογενετικά κοντά με τα στελέχη *E. mori* LMG 25706^T και *E. tabaci* YIM Hb-3^T με αξιοπιστία 99 % των bootstrap δειγμάτων, δημιουργώντας ξεχωριστή γενεαλογική σειρά. Η τοπολογία αυτή του *Enterobacter* sp. C3.1 είναι κοινή με την τοπολογία του στελέχους στο NJ φυλογενετικό του γονιδίου *infB*. Ενώ το στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4 είναι κοντά με το στέλεχος *L. amnigena* LMG 2784^T με αξιοπιστία 100 % των bootstrap δειγμάτων, δημιουργώντας ξεχωριστή γενεαλογική σειρά. Από την δυαδική ευθυγράμμιση/στοίχιση των αλληλουχιών προκύπτει ότι το πιο συγγενικό πρότυπο στέλεχος του *Enterobacter* sp. C1.2 ήταν το *E. ludwigii* E119^T με 99,2 % ομοιότητα. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην παρούσα ανάλυση, τα πρότυπα στελέχη *E. mori* LMG 25706^T και *E. tabaci* YIM Hb-3^T εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας 99,62%, υποδηλώνοντας ότι το *Enterobacter* sp. C1.2 είναι πιθανό να αποτελεί ξεχωριστό είδος από το *E. ludwigii* E119^T. Το *Enterobacter* sp. C3.1 εμφάνισε 98,55 % και 98,39% ομοιότητα με τα πιο συγγενικά πρότυπα στελέχη *E. mori* LMG 25706^T και *E. tabaci* YIM Hb-3^T, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι τα δύο τελευταία στελέχη εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας (99,62%) υποδηλώνει ότι το στέλεχος *Enterobacter* sp. C3.1 πιθανόν να αποτελεί νέο είδος διαφορετικό από τα *E. mori* και *E. tabaci*. Το *Enterobacter* sp. C1.5 εμφανίζεται στενά συγγενικό με το *E. cloacae* subs. *dissolvens* LMG 2683^T με 98,16 % ομοιότητα. Είναι ενδιαφέρον ότι τα πρότυπα υποείδη του *E. cloacae*, subs. *dissolvens* και subs. *cloacae*, εμφανίζουν 98,32 % ομοιότητα, γεγονός που υποδεικνύει ότι το *Enterobacter* sp. C1.5 πιθανόν να αποτελεί ξεχωριστό υποείδος εντός του είδους *E. cloacae*. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πρότυπα υποείδη του είδους *Enterobacter hormaechei*, subs. *xiangfangensis* 10-17^T και *steigerwaltii* DSM 16691^T, εμφάνισαν 98,43 % ομοιότητα, και τα υποείδη subs. *xiangfangensis* και subs. *oharae* 98,66 %, δηλαδή ποσοστά ομοιότητας υψηλότερα από το ποσοστό ομοιότητας ανάμεσα στο *Enterobacter* sp. C1.5 και το στενά συγγενικό του πρότυπο στέλεχος *E. cloacae* subs. *dissolvens*, το οποίο ενισχύει τον ισχυρισμό ότι το *Enterobacter* sp. C1.5 ενδεχομένως αποτελεί ξεχωριστό υποείδος.

Το στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4 παρουσίασε 97,47 % ομοιότητα με το πιο συγγενικό του είδος *L. amnigena* LMG 2784^T. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην παρούσα ανάλυση, τα πρότυπα στελέχη *Lelliottia aquatilis* 6331-17^T και *Lelliottia jeotgali* PFL01^T εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας, 99,23 %, εντός του γένους *Lelliottia*. Με βάση τα ποσοστά αυτά, το στέλεχος *Lelliottia* sp. D2.4 είναι πιθανό να αποτελεί νέο είδος εντός του γένους *Lelliottia*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Θρεπτικά υποστρώματα

Luria-Bertani Medium (LB medium), pH 7,0 (ρύθμιση pH με 5N NaOH), 1L

LB	g/L
Bacto-tryptone	10g
Bacto-yeast extract	5g
NaCl	10g
dH ₂ O, μέχρι το 1 λίτρο(1lt)	
Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προτίθενται 15 g/L στερεοποιητικού υλικού, άγαρ.	

National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP medium), pH 7,0 (Nautiyal, 1999), 1L

NBRIP	g/L
Glucose	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
MgCl ₂ x 6H ₂ O	5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.25
KCl	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
dH ₂ O, μέχρι το 1 λίτρο(1lt)	
Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού, προσθέτουμε 15 g/L στερεοποιητικού υλικού, άγαρ. Στο θρεπτικό υλικό (υγρό και στερεό) προστίθεται Μπλε της Βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue-BPB), χρωστική η οποία λειτουργεί ως δείκτης αλλαγής pH. Η χρωστική BPB προστίθεται στο θρεπτικό υλικό NBRI σε συγκέντρωση 0,025 g/lt από αποθεματικό διάλυμα (stock solution) 0,25 % w/v. Για τη ρύθμιση του pH του διαλύματος της BPB σε τιμή 6,7, χρησιμοποιείται 0,1N NaOH. Η χρωστική χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία σε αλλαγές της τιμής του pH και το NaOH προστίθεται αργά, έως ότου το διάλυμα αλλάξει χρώμα, από κόκκινο σε μπλε. Λόγω αυτής της ευαισθησίας, αποτελεί αποτελεσματικό δείκτη για αλλαγές στο pH του περιβάλλοντος.	

O-CAS (Overlay Chrome Azurol-S), pH 6,8, 1L

Περίπτωση 1	
Sol I	Chrome Azurol S (CAS) 0,065g σε 50ml H ₂ O
Sol II	1Mm FeCl ₃ ·6H ₂ O σε 10ml από 10Mm HCl
Sol III	0,0729g CTAB σε 40ml H ₂ O
<i>Αναμειγνύουμε Sol I με το Sol II υπό ανάδευση. Το διάλυμα αυτό, αναμειγνύεται με το Sol III αποδίδοντας το Sol IV</i>	
Sol V	900ml ddH ₂ O, 30.24g PIPES, pH 6,8 & 9g αγαρόζη
<i>Πριν από την επίστρωση στα τρυβλία 1 ml Sol IV αναμειγνύεται με 9 ml Sol V</i>	

R1, R2 Salkowski reagents, 1L

Reagent	Ποσότητα FeCl ₃ σε g	Συγκέντρωση H ₂ SO ₄
R1	12	7,9 M
R2	4,5	10,8 M
Διαδικασία		
για R1 : 12 g FeCl ₃ προστίθενται σε διάλυμα 7,9 M H ₂ SO ₄		
για R2 : 4,5 g FeCl ₃ προστίθενται σε διάλυμα 10,8 M H ₂ SO ₄		
(για την παρασκευή των διαλυμάτων H₂SO₄ : το δοχείο με το υγρό H ₂ SO ₄ επιθυμητού όγκου τοποθετείται σε λεκάνη με πάγο και στη συνέχεια προστίθεται αργά dH ₂ O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Κατά την προσθήκη του dH ₂ O παράγεται θερμότητα)		

1% Proteose Peptone, 1L

10g	Proteose Peptone
dH₂O μέχρι 1L	
<i>Για την παρασκευή 250ml 1% Proteose Peptone: 2,5g σκόνη Proteose Peptone διαλύονται σε dH₂O μέχρι 250ml</i>	

NFb και LGI, 1L

	NFb	LGI
Glucose	5 g	5 g
K₂HPO₄	0,5	0,2
CaCl₂ x 2H₂O	0,02	0,02
NaCl	0,1	-
MgSO₄ x 7H₂O	0,2	0,2
Na₂MoO₄ x 2H₂O	-	0,002
FeEDTA (solution 16.4 g/L)	2 ml	4 ml
Vitamin solution (biotin 10 mg, pyridoxal-HCl 20 mg. <i>Διαλύουμε σε θερμό υδατόλουτρο και συμπληρώνουμε με dH₂O μέχρι τα 100 ml)</i>	1 ml	1 ml
Micronutrient solution (CuSO ₄ x5H ₂ O 0.04 g, ZnSO ₄ x7H ₂ O 0.12 g, H ₃ BO ₃ 1.40 g, Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O 1.0g, MnSO ₄ xH ₂ O, 1.175 g <i>Συμπληρώνουμε με dH₂O μέχρι τα 1000 ml)</i>	2 ml	-
BTB (Bromothymol Blue) (5g σε 0,2 N KOH)	2 ml	2 ml
pH		6,8 – 7,0

Βιβλιογραφία

- Abel, S., Nguyen, D., Chow, W., Theologis, A., 1995. ASC4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*: Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J Biol Chem* 270, 19093–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.19093>
- Abel, S., Theologis, A., 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol* 111, 9–17.
- Abohatem, M., Chakrafi, F., Jaiti, F., Dihazi, A., Baaziz, M., 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi limit incidence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* on date palm seedlings by increasing nutrient contents, total phenols and peroxidase activities. *Open Hortic J* 4, 1–9. <https://doi.org/10.2174/1874840601104010010>
- Ahemad, M., Kibret, M., 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univ Sci* 26, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ali, S., Vidhale, N., 2013. Bacterial Siderophore and their Application: A review. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2, 303–312.
- Ali, Z., Nasr, U., Naseem, S., Inam-ul-Haq, M., Jacobsen, H., 2015. Soil bacteria conferred a positive relationship and improved salt stress tolerance in transgenic pea (*Pisum sativum* L.) harboring Na⁺/H⁺ antiporter. *Turk J Bot* 39, 962–972. <https://doi.org/10.3906/bot-1505-50>
- Alnajar, S., Gupta, R., 2017. Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family Enterobacteriaceae and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infect Genet Evol* 54, 108–127. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.024>
- Alori, E., Glick, B., Babalola, O., 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front Microbiol* 8, 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Altomare, C., Tringovska, I., 2011. Beneficial soil microorganisms, an ecological alternative for soil fertility management, in: Lichtfouse, E. (Ed.), *Genetics, Biofuels and Local Farming System. Sustainable Agriculture Reviews*. pp. 141–214.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ames-Gottfred, N.P., Christie, B.R., Jordan, D.C., 1989. Use of the Chrome Azurol S Agar Plate Technique to Differentiate Strains and Field Isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol* 55, 707–710.
- Ampomah, O., Huss-Danell, K., 2011. Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Syst Appl Microbiol* 34, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.01.006>
- Andam, C., Mondo, S., Parker, M., 2007. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* Nodule Symbionts. *Appl Environ Microbiol* 73, 4686. <https://doi.org/10.1128/AEM.00160-07>
- Andrews, M, Andrews, ME, 2017. Specificity in legume-rhizobia symbioses. *Int J Mol Sci* 18, 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Antoun, H., Beauchamp, C., Goussard, N., Chabot, R., Lalande, R., 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204, 57–67. <https://doi.org/10.1023/A:1004326910584>
- Ardley, J., Parker, M., De Meyer, S., Trengove, R., O’Hara, G., Reeve, W., Yates, R., Dilworth, M., Willems, A., Howieson, J., 2012. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically

- and taxonomically separate legume hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 2579–2588. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.035097-0>
- Ardley, J., Reeve, W., O’Hara, G., Yates, R., Dilworth, M., Howieson, J., 2013. Nodule morphology, symbiotic specificity and association with unusual rhizobia are distinguishing features of the genus *Listia* within the Southern African crotonarioid clade *Lotononis* s.l. *Ann Bot* 112, 1–15. <https://doi.org/10.1093/aob/mct095>
- Arora, N., Kang, S., Maheshwari, D., 2001. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Curr Sci* 81, 673–677.
- Aserse, A., Räsänen, L., Aseffa, F., Hailemariam, A., Lindström, K., 2013. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 10117–10134. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5248-4>
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J., Pozo, M., Azcón, R., 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56, 1761–1778. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri197>
- Babalola, O., 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32, 1559–1570. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>
- Bais, H., Weir, T., Perry, L., Gilroy, S., Vivanco, J., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57, 233–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Bakker, P.A.H.M., Berendsen, R.L., Doornbos, R.F., Wintermans, P.C.A., Pieterse, C.M.J., 2013. The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Front Plant Sci* 4, 165–165. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165>
- Banik, S., 1982. Variation in potentiality of phosphate-solubilizing soil microorganisms with phosphate and energy source. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 138, 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0232-4393\(83\)80051-1](https://doi.org/10.1016/S0232-4393(83)80051-1)
- Bano, N., Musarrat, J., 2004. Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. *FEMS Microbiol Lett* 231, 13–7. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00894-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00894-2)
- Barak, J., Gorski, L., Liang, A., Narm, K., 2009. Previously uncharacterized *Salmonella enterica* genes required for swarming play a role in seedling colonization. *Microbiol* 155, 3701–9. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032029-0>
- Barber, S.A., Walker, J.M., Vasey, E.H., 1963. Mechanisms for Movement of Plant Nutrients from Soil and Fertilizer to Plant Root. *J Agric Food Chem* 11, 204–207. <https://doi.org/10.1021/jf60127a017>
- Barea, J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C., 2004. Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria, in: Varma, A., Abbott, L., Werner, D., Hampp, R. (Eds.), *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Barea, J., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 343–351. <https://doi.org/10.1023/A:1020588701325>
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C., Kalra, A., 2014. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *J Plant Physiol* 171, 884–894. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.007>
- Bartel, B., 1997. Auxin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 51–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.51>
- Bartels, D., Sunkar, R., 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Crit Rev Plant Sci* 24, 23–58. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>

- Bascomb, S., Lapage, S., Willcox, W., Curtis, M., 1971. Numerical classification of the tribe *Klebsiellae*. J Gen Microbiol 66, 279–95. <https://doi.org/10.1099/00221287-66-3-279>
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 45, 493–496.
- Bell, C., Dickie, G., Harvey, W., Chan, J., 1995. Endophytic bacteria in grapevine. Can J Microbiol 41, 46–53. <https://doi.org/10.1139/m95-006>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genet Mol Biol 35, 1044–1051.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., Squartini, A., 2004. Gamma Proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. Syst Appl Microbiol 27, 462–468. <https://doi.org/10.1078/0723202041438527>
- Benjamins, R., Scheres, B., 2008. Auxin: the looping star in plant development. Annu Rev Plant Biol 59, 443–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103805>
- Berendsen, R., Pieterse, C., Bakker, P., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends Plant Sci 17, 478–86. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R., Ulrich, A., Hallmann, J., 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol Ecol 51, 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.006>
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., Köberl, M., 2016. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. J Exp Bot 67, 995–1002. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv466>
- Bergottini, V., Filippidou, S., Junier, T., Johnson, S., Chain, P., Otegui, M., Zapata, P., Junier, P., 2015. Genome Sequence of *Kosakonia radicincitans* Strain YD4, a Plant Growth-Promoting *Rhizobacterium* Isolated from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). Genome Announc 3, e00239-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00239-15>
- Bernhard, A., 2010. The Nitrogen Cycle: processes, players, and human impact. Nature Education Knowledge 3, 25.
- Bhise, K., Bhagwat, P., Dandge, P., 2017. Plant growth-promoting characteristics of salt tolerant *Enterobacter cloacae* strain KBPD and its efficacy in amelioration of salt stress in *Vigna radiata* L. J Plant Growth Regul 36, 215–226. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9631-0>
- Bianco, C., Defez, R., 2009. *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. J Exp Bot 60, 3097–3107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp140>
- Boesch, D., 2002. Challenges and opportunities for science in reducing nutrient over-enrichment of coastal ecosystems. Estuaries 25, 886–900.
- Bollet, C., Elkouby, A., Pietri, P., de Micco, P., 1991. Isolation of *Enterobacter amnigenus* from a heart transplant recipient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 10, 1071–1073.
- Bontemps, C., Elliott, G., Simon, M., Dos Reis Junior, F., Gross, E., Lawton, R., Neto, N., De Fatima Louriero, M., De Faria, S., Sprent, J., James, E., Young, J., 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. Mol Ecol 19, 44–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>
- Bose, A., Kher, M., Nataraj, M., Keharia, H., 2016. Phytostimulatory effect of indole-3-acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L. f.) Spreng rhizosphere. Biocatal Agric Biotechnol 6, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.03.005>
- Bozinovski, D., Taubert, M., Kleinstaub, S., Richnow, H., von Bergen, M., Vogt, C., Seifert, J., 2014. Metaproteogenomic analysis of a sulfate-reducing enrichment culture reveals

- genomic organization of key enzymes in the m-xylene degradation pathway and metabolic activity of proteobacteria. *Syst Appl Microbiol* 37, 488–501. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.07.005>
- Brady, Carrie, Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., De Vos, P., 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst Appl Microbiol* 36, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T., 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst Appl Microbiol* 31, 447–460. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.09.004>
- Brady, C., Hunter, G., Kirk, S., Arnold, D., Denman, S., 2014. *Rahnella victoriana* sp. nov., *Rahnella bruchi* sp. nov., *Rahnella woolbedingensis* sp. nov., classification of *Rahnella genomospecies* 2 and 3 as *Rahnella variigena* sp. nov. and *Rahnella inusitata* sp. nov., respectively and emended description of the genus *Rahnella*. *Syst Appl Microbiol* 37, 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.09.001>
- Bragina, A., Berg, C., Cardinale, M., Shcherbakov, A., Chebotar, V., Berg, G., 2012. Sphagnum mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. *ISME J* 6, 802–813. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.151>
- Brandl, M., Lindow, S., 1996. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* 62, 4121.
- Brenner, D., III Farmer, J., 2005. Family I. Enterobacteriaceae, in: Brenner, D., Krieg, N., Stanley, J., Garrity, G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part B, The Gammaproteobacteria*. Springer, pp. 587–607.
- Brenner, D., McWhorter, A., Kai, A., Steigerwalt, A., III Farmer, J., 1986. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *J Clin Microbiol* 23, 1114–1120.
- Brenner, D., Richard, C., Steigerwalt, A., Asbury, M., Mandel, M., 1980. *Enterobacter gergoviae* sp. nov.: A New Species of Enterobacteriaceae Found in Clinical Specimens and the Environment. *Int J Syst Bacteriol* 30, 1–6. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-1>
- Broekaert, W., Delauré, S., De Bolle, M., Cammue, B., 2006. The Role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* 44, 393–416. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440>
- Brown, M., 1974. Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopathol* 12, 181–197. <https://doi.org/10.1146>
- Brown, M., Lester, J., 1982. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge—II Effects of mean cell retention time. *Water Res* 16, 1549–1560. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90207-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90207-X)

- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E., Schulze-Lefert, P., 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* 807–838.
- Bull, C., De Boer, S., Denny, T., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G., Scortichini, M., Stead, D., Takikawa, Y., 2012. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008–2010). *J Plant Pathol* 94, 21–27.
- Bull, C., de Boer, S., Denny, T., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G., Scortichini, M., Stead, D., Takikawa, Y., 2010. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *J Plant Pathol* 92, 551–592.
- Bundy, L., 2001. Managing urea-containing fertilizers. Area Fertilizer Dealer Meetings, University of Wisconsin-Madison.
- Burr, T., Schroth, M., Suslow, T., 1978. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathol* 68, 1377–1383.
- Camilios-Neto, D., Bonato, P., Wassem, R., Tadra-Sfeir, M., Brusamarello-Santos, L., Valdameri, G., Donatti, L., Faoro, H., Weiss, V., Chubatsu, L., Pedrosa, F., Souza, E., 2014. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. *BMC Genomics* 15, 378–378. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-378>
- Campbell, J., Eik, M., 2002. Effects of oxyanions on the EDTA-promoted dissolution of goethite. *Clays Clay Miner* 50, 336–341.
- Carreño-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., Baca, B., 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol Gen Genet* 264, 521–30.
- Carro, L., Spröer, C., Alonso, P., Trujillo, M., 2012. Diversity of *Micromonospora* strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. *Syst Appl Microbiol* 35, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.11.003>
- Cassan, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V., 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol* 54, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>
- Castellani, A., Chalmers, A., 1919. *Manual of Tropical Medicine*, 3rd ed. Williams Wood and Co, New York.
- Cescutti, P., Kallioinen, A., Impallomeni, G., Toffanin, R., Pollesello, P., Leisola, M., Eerikäinen, T., 2005. Structure of the exopolysaccharide produced by *Enterobacter amnigenus*. *Carbohydr Res* 340, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.12.008>
- Chagas, F., Pessotti, R., Caraballo-Rodríguez, A., Pupo, M., 2018. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chem Soc Rev* 47, 1652–1704. <https://doi.org/10.1039/c7cs00343a>
- Chandler, D., Bailey, A., Tatchell, G., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W., 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 1987–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>
- Chandra, S., Choure, K., Dubey, R., Maheshwari, D., 2007. Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). *Braz J Microbiol* 38. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100026>

- Chao, W., 1990. Antagonistic activity of *Rhizobium* spp. against beneficial and plant pathogenic fungi. *Lett Appl Microbiol* 10, 213–215. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb01336.x>
- Chaparro, J., Badri, D., Bakker, M., Sugiyama, A., Manter, D., Vivanco, J., 2013. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One* 8, e55731–e55731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055731>
- Charles, D., 2005. *Master Mind: The Rise and Fall of Fritz Haber, the Nobel Laureate Who Launched the Age of Chemical Warfare*. Harper-Collins e-books, New York.
- Chelius, M., Triplett, E., 2001. The diversity of Archaea and Bacteria in association with roots of *Zea mays* L. *Microb Ecol* 41, 252–263. <https://doi.org/10.1007/s002480000087>
- Chen, J., Gu, J., Wang, E., Ma, X., Kang, S.T., Huang, L., Cao, X., Li, L., Wu, Y., 2014. Wild peanut *Arachis duranensis* are nodulated by diverse and novel *Bradyrhizobium* species in acid soils. *Syst Appl Microbiol* 37, 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.05.004>
- Chen, M., Laevens, S., Lee, M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P., 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1729. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1729>
- Chen, T., Chen, Z., Ma, G., Du, B., Shen, B., Ding, Y., Xu, K., 2014. Diversity and potential application of endophytic bacteria in ginger. *Genet Mol Res* 13, 4918–31. <https://doi.org/10.4238/2014>
- Chen, W., James, E., Chou, J., Sheu, S., Yang, S., Sprent, J., 2005. β -Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytol* 168, 661–675. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01533.x>
- Chen, W.-M., James, E.K., Prescott, A.R., Kierans, M., Sprent, J.I., 2003. Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -Proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 1051–1061. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.12.1051>
- Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J., Bisgaard, M., 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1601–1609. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03018-0>
- Chung, Y., Brenner, D., Steigerwalt, A., Kim, B., Kim, H., Yun, K., 1993. *Enterobacter pyrinus* sp. nov., an organism associated with brown leaf Spot disease of Pear trees. *Int J Syst Bacteriol* 43. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-157>
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. *Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards of antimicrobial disk susceptibility tests (approved standard eleventh edition)*, 11th ed, M02-A11. CLSI, Wayne.
- Comai, L., Kosuge, T., 1982. Cloning characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *J Bacteriol* 149, 40–46.
- Compant, S., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42, 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71, 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J., Gangl, H., Sessitsch, A., 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb Ecol* 62, 188–197. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>

- Costa, J., 2013. Isolation and phenotypic characterization of rhizobia that nodulate cowpea in the Cerrado in Tocantins State, Brazil. *J Biotechnol Biodiversity* 4, 249–259.
- Costa, J., Loper, J., 1994. Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol Plant Microbe Interact* 7, 440–448.
- Costacurta, A., Keijers, V., Vanderleyden, J., 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Gen Genet* MGG 243, 463–472. <https://doi.org/10.1007/BF00280477>
- Crowe, J., Crowe, L., Chapman, D., 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223, 701. <https://doi.org/10.1126/science.223.4637.701>
- Cummings, S., Gyaneshwar, P., Vinuesa, P., Farruggia, F., Andrews, M., Humphry, D., Elliott, G., Nelson, A., Orr, C., Pettitt, D., Shah, G., Santos, S., Krishnan, H., Odee, D., Moreira, F., Sprent, J., Young, J., James, E., 2009. Nodulation of *Sesbania* species by *Rhizobium* (*Agrobacterium*) strain IRBG74 and other rhizobia. *Environ Microbiol* 11, 2510–2525. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01975.x>
- da Silva, T., Vollú, R., Jurelevicius, D., Alviano, D., Alviano, C., Blank, A., Seldin, L., 2013. Does the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (pepper-rosmarin) affect its endophytic microbial community? *BMC Microbiol* 13, 29–29. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-29>
- Daimon, H., 2006. Tricalcium Phosphate Solubilization by Root Nodule Bacteria of *Sesbania cannabina* and *Crotalaria juncea*. *Plant Prod Sci* 9, 388–389. <https://doi.org/10.1626/pps.9.388>
- Dakora, F., Phillips, A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245, 35–47. <https://doi.org/10.1023/A:1020809400075>
- Dalton, D., Kramer, S., Azios, N., Fusaro, S., Cahill, E., Kennedy, C., 2004. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiol Ecol* 49, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.010>
- Dary, M., Chamber-Pérez, M., Palomares, A., Pajuelo, E., 2010. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater* 177, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.035>
- Dauga, C., 2002. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 531–47. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-531>
- de Almeida Lopes, K., Carpentieri-Pipolo, V., Oro, T., Stefani Pagliosa, E., Degrassi, G., 2016. Culturable endophytic bacterial communities associated with field grown soybean. *J Appl Microbiol* 120, 740–55. <https://doi.org/10.1111/jam.13046>
- De Coninck, B., Timmermans, P., Vos, C., Cammue, B., Kazan, K., 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends Plant Sci* 20, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.007>
- De Meyer, S., Briscoe, L., Martínez-Hidalgo, P., Agapakis, C.M., de-los Santos, P., Seshadri, R., Reeve, W., Weinstock, G., O’Hara, G., Howieson, J., Hirsch, A., 2016. Symbiotic *Burkholderia* species show diverse arrangements of *nif/fix* and *nod* genes and lack typical high-affinity cytochrome *cbb3* oxidase genes. *Mol Plant Microbe Interact* 29, 609–619. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-16-0091-R>
- De Meyer, S., De Beuf, K., Vekeman, B., Willems, A., 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.002>
- de Oliveira-Longatti, S., Marra, L., Soares, L., Bomfeti, A., da Silva, C., Avelar Ferreira, P., de Souza Moreira, F., 2014. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and

- from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 1239. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1547-2>
- de Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L.M., 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol* 38, 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Deboreiner, J., Marriel, I., Nery, M., 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol* 22, 1464–73.
- Deng, Z., Zhao, L., Kong, Z., Yang, W., Lindström, K., Wang, E., Wei, G., 2011. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiol Ecol* 76, 463–475. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x>
- Department of Economic and Social Affairs/Population Division, 2015. World Population Prospects: The 2015 Revision, Volume I: Comprehensive Tables. United Nations.
- Deubel, A., Gransee, A., Merbach, W., 2000. Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *J Plant Nutr Soil Sci* 163, 387–392. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<387::AID-JPLN387>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<387::AID-JPLN387>3.0.CO;2-K)
- Dhole, A., Shelat, H., Vyas, R., Jhala, Y., Bhange, M., 2016. Endophytic occupation of legume root nodules by *nifH*-positive non-rhizobial bacteria, and their efficacy in the groundnut (*Arachis hypogaea*). *Ann Microbiol* 66, 1397–1407.
- Dilworth, M., Carson, K., Giles, R., Byrne, L., Glenn, A., 1998. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vicibactin. *Microbiol* 781–791. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-781>
- Dinsdale, E., Edwards, R., Hall, D., Angly, F., Breitbart, M., Brulc, J., Furlan, M., Desnues, C., Haynes, M., Li, L., McDaniel, L., Moran, M., Nelson, K., Nilsson, C., Olson, R., Paul, J., Brito, B., Ruan, Y., Swan, B., Stevens, R., Valentine, D., Thurber, R., Wegley, L., White, B., Rohwer, F., 2008. Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* 452, 629. <https://doi.org/10.1038/nature06810>
- Dixon, R., Kahn, D., 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2, 621–631.
- Dobritsa, A., Linardopoulou, E., Samadpour, M., 2017. Transfer of 13 species of the genus *Burkholderia* to the genus *Caballeronia* and reclassification of *Burkholderia jirisanensis* as *Paraburkholderia jirisanensis* comb. nov. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 67, 3846–3853. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002202>
- Dobritsa, A., Samadpour, M., 2016. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 2836–46. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001065>
- Doijad, S., Imirzalioglu, C., Yao, Y., Pati, N., Falgenhauer, L., Hain, T., Foesel, B., Abt, B., Overmann, J., Mirambo, M., Mshana, S., Chakraborty, T., 2016. *Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 968–974. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000821>
- Duan, Y., Zhou, X., Di-Yan, L., Li, Q., Dang, L.-Z., Zhang, Y., Qiu, L., Salam, N., Li, W., 2015. *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem. *Antoine Van Leeuwenhoek* 108, 1161–9. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0569-1>
- Dudeja, S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., Kothe, E., 2012. Interaction of endophytic microbes with legumes. *J Basic Microbiol* 52, 248–260. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100063>
- Duponnois, R., Bâ, A., Mateille, T., 1999. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the

- endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. *Nematology* 1, 95–101. <https://doi.org/10.1163/156854199507901>
- Dutta, S., Rani, T., Podile, A., 2013. Root exudate-induced alterations in *Bacillus cereus* cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. *PloS One* 8, e78369–e78369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078369>
- Ee, R., Madhaiyan, M., Ji, L., Lim, Y., Nor, Tee, K., Chen, J., Yin, W., 2016. *Chania multitudinisentens* gen. nov., sp. nov., an N-acyl-homoserine-lactone-producing bacterium in the family Enterobacteriaceae isolated from landfill site soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 2297–304. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001025>
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., Mamadaliyeva, N., 2013. Salt-tolerant *Pseudomonas extremorientalis* able to stimulate growth of *Silybum marianum* under salt stress. *Med Arom Plant Sci Biotechnol* 7, 7–10.
- Ehlers, M., Cloete, T., 1999. Comparing the protein profiles of 21 different activated sludge systems after SDS-PAGE. *Water Res* 33. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00312-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00312-1)
- Elbein, A., Carroll, D., Pastuszak, I., Pan, Y., 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13, 17R-27R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Elser, J., 2012. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? *Phosphorus Biotechnol.* • *Pharm Biotechnol* 23, 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.001>
- English, M., Coulson, T., Horsman, S., Patten, C., 2010. Overexpression of *hns* in the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* UW5 increases root colonization. *J Appl Microbiol* 108, 2180–2190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04620.x>
- Estévez, J., Dardanelli, M., Megías, M., Rodríguez-Navarro, D., 2009. Symbiotic performance of common bean and soybean co-inoculated with rhizobia and *Chryseobacterium balustinum* Aur9 under moderate saline conditions. *Symbiosis* 49, 29–36. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0008-z>
- Estrada-de los Santos, P., 2016. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Ann Microbiol* 66, 1303–1314. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1183-1>
- Estrada-de los Santos, P., Vinuesa, P., Martínez-Aguilar, L., Hirsch, A., Caballero-Mellado, J., 2013. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Curr Microbiol* 67, 51–60. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0330-9>
- Etesami, H., Alikhani, H., Hosseini, H., 2015. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX* 2, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.02.008>
- Ewing, W., Fife, M., 1972. *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. nov. (the Herbicola-Lathyri Bacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* 22, 4–11. <https://doi.org/10.1099/00207713-22-1-4>
- Ezawa, T., Smith, S., Smith, F., 2002. P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil* 244, 221–230.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17, 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Fery, R., 2002. New Opportunities in *Vigna*, in: Janick, J., Whipkey, A. (Eds.), *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 424–428.
- Figueiredo, M., Seldin, L., Araujo, F., Mariano, R., 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications, in: *Plant growth and health promoting bacteria*. pp. 21–43. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_2

- Firincieli, A., Otilar, R., Salamov, A., Schmutz, J., Khan, Z., Redman, R., Fleck, N., Lindquist, E., Grigoriev, I., Doty, S., 2015. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic yeast *Rhodotorula graminis* WP1. *Front Microbiol* 6, 978–978. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00978>
- Fiske, C., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 375–400.
- Fitter, A., 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *J. Ecol.* 93, 231–243. <https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2005.00990.x>
- Flowers, T., 2004. Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* 55, 307–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh003>
- Fouts, D., Tyler, H., DeBoy, R., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J., Durkin, A., Huot, H., Shrivastava, S., Kothari, S., Dodson, R., Mohamoud, Y., Khouri, H., Roesch, L., Krogfelt, K., Struve, C., Triplett, E., Methé, B., 2008. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.* 4, e1000141–e1000141. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000141>
- Franche, C., Lindstrom, K., Elmerich, C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321, 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., Bahl, H., 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch Microbiol* 176, 421–6. <https://doi.org/10.1007/s002030100347>
- Franzini, I., Azcón, R., Latanze Mendes, F., Aroca, R., 2010. Interactions between *Glomus* species and *Rhizobium* strains affect the nutritional physiology of drought-stressed legume hosts. *J Plant Physiol* 167, 614–619. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.11.010>
- Fukuhara, H., Minakawa, Y., Akao, S., Minamisawa, K., 1994. The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant Cell Physiol.* 35, 1261–1265. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078722>
- Fukushima, M., Kakinuma, K., Kawaguchi, R., 2002. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J Clin Microbiol* 40, 2779–2785. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.8.2779-2785.2002>
- Gage, D., 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 68, 280–300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Gamalero, E., Berta, G., Glick, B., 2009. The use of microorganisms to facilitate the growth of plants in saline soils, in: Khan, M., Zaidi, A., Musarrat, J. (Eds.), *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Springer, pp. 1–22.
- Gamalero, E., Glick, B., 2015. Bacterial ACC deaminase and IAA: Interactions and consequences for plant growth in polluted environments. *Plant Physiol* 169, 13–22. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00284>
- Gamalero, E., Martinotti, M., Trotta, A., Lemanceau, P., Berta, G., 2002. Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. *New Phytol* 155, 293–300. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00460.x>
- Gan, H., McGroty, S., Chew, T., Chan, K., Buckley, L., Savka, M., Hudson, A., 2012. Whole-genome sequence of *Enterobacter* sp. strain SST3, an endophyte isolated from Jamaican sugarcane (*Saccharum* sp.) stalk tissue. *J Bacteriol* 194, 5981–5982. <https://doi.org/10.1128/JB.01469-12>

- García Fontán, M., Lorenzo, J., Parada, A., Franco, I., Carballo, J., 2007. Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiol* 24, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.007>
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., de Ley, J., 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 39, 37–345. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-337>
- Gebgardt, A., 1958. Collection: obtaining and use of bacterial fertilizers. Izdatelstvo (Publishing Co.) Akademiia nauk Ukrainskskii CCP 38.
- Geddes, B., Ryu, M., Mus, F., Garcia, A., Peters, J., Voigt, C., Poole, P., 2015. Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. *Food Biotechnol.* • *Plant Biotechnol.* 32, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.004>
- Gensberg, K., Hughes, K., Smith, A., 1992. Siderophore-specific induction of iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 138, 2381–2387.
- Ghosh, K., Sen, K., Maiti, K., 2015. Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.04.002>
- Glass, A., 1989. Plant mineral nutrition. An introduction to current concepts. Jones and Bartlett Publishers, Inc., Boston, USA.
- Glick, B., 2015. Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Springer, Canada.
- Glick, B., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Spec. Issue Plant Growth Promot* 169, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Glick, B., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica.* <https://doi.org/10.6064>
- Glick, B., Karaturovic, D., Newell, P., 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonas*. *Can J Microbiol* 41, 533–536. <https://doi.org/10.1139/m95-070>
- Glick, B., Patten, C., Holguin, G., Penrose, D., 1999. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London.
- Glick, B., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B., 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 227–242. <https://doi.org/10.1080/07352680701572966>
- Glick, B.R., 2004. Bacterial ACC Deaminase and the Alleviation of Plant Stress, in: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 291–312. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)56009-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)56009-4)
- Golden, J., Whorff, L., Wiest, D., 1991. Independent regulation of *nif*HDK operon transcription and DNA rearrangement during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 173, 7098–7105. <https://doi.org/10.1128/jb.173.22.7098-7105.1991>
- Goldstein, A., 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biol Agric Hortic* 12, 185–193. <https://doi.org/10.1080/01448765.1995.9754736>
- Goldstein, A., 1994. Involvement of the Quinoprotein Glucose Dehydrogenase in the Solubilization of Exogenous Phosphates by Gram-Negative Bacteria, in: *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Wassington, pp. 197–203.
- Gonçalves, A., Goufo, P., Barros, A., Domínguez-Perles, R., Trindade, H., Rosa, E., Ferreira, L., Rodrigues, M., 2016. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system. Nutritional advantages and constraints. *J Sci Food Agric* 96, 2941–51. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7644>

- Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Sharma, A., Tiwari, S., 2016. Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Biol* 18, 992–1000. <https://doi.org/10.1111/plb.12505>
- Gopalakrishnan, S., Pagidi, H., Bandru, K., Kannan, I., Vidya, M., Deepthi, K., Rupela, O., 2011. Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 1313–1321. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0579-0>
- Gopalakrishnan, S., Upadhyaya, H., Vadlamudi, S., Humayun, P., Vidya, M.S., Alekhya, G., Singh, A., Vijayabharathi, R., Bhimineni, R., Seema, M., Rathore, A., Rupela, O., 2012. Plant growth-promoting traits of biocontrol potential bacteria isolated from rice rhizosphere. *SpringerPlus* 1, 71–71. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-71>
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Samineni, S., Kumar, C., 2016. Plant growth-promotion and biofortification of chickpea and pigeonpea through inoculation of biocontrol potential bacteria, isolated from organic soils. *SpringerPlus* 5, 1882–1882. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3590-6>
- Grimont, P., Grimont, F., 2005. Genus XII. *Enterobacter hormaechel* and Edwards 1960, in: Brenner, D., Krieg, N., Stanley, J., Garrity, G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part B, The Gammaproteobacteria*. pp. 661–669.
- Grimont, P.A.D., Ageron, E., 1989. *Enterobacter cancerogenus* (Urošević, 1966) Dickey and Zumoff 1988, a senior subjective synonym of *Enterobacter taylorae* farmer et al. (1985). *Res Microbiol* 140, 459–465. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(89\)90067-3](https://doi.org/10.1016/0923-2508(89)90067-3)
- Gu, C., Li, C., Yang, L., Huo, G., 2014. *Enterobacter xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of *Enterobacter sacchari* Zhu et al. 2013 as *Kosakonia sacchari* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2650–6. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.064709-0>
- Guerinot, M., 2010. Iron, in: Hell, R., Mendel, R. (Eds.), *Cell Biology of Metals and Nutrients. Plant Cell Monographs*. Springer, Germany, pp. 75–94.
- Guerinot, M.L., Meidl, E.J., Plessner, O., 1990. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 172, 3298–3303.
- Guo, L., Qiu, J., Han, Z., Zihong, Y., Chen, C., Liu, C., Xin, X., Ye, C., Wang, Y., Xie, H., Wang, Y., Bao, J., Tang, S., Xu, J., Gui, Y., Fu, F., Wang, W., Zhang, X., Zhu, Q., Fan, L., 2015. A host plant genome (*Zizania latifolia*) after a century-long endophyte infection. *Plant J* 83, 600–9. <https://doi.org/10.1111/tpj.12912>
- Gupta, G., Parihar, S., Ahirwar, N., Snehi, S., Singh, V., 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol* 7, 096–102. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A., Moulin, L., Chen, W., Elliott, G., Bontemps, C., Estrada-de los Santos, P., Gross, E., dos Reis, F., Sprent, J., Young, J., James, E., 2011. Legume-nodulating Betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 1276–1288. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0172>
- Gyaneshwar, P., Parekh, L., Archana, G., Poole, P., Collins, M., Hutson, R., Kumar, G., 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol Lett* 171, 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13436.x>
- Gygi, S., Corthals, G., Zhang, Y., Rochon, Y., Aebersold, R., 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9390–9395. <https://doi.org/10.1073/pnas.160270797>
- Habib, S., Kausar, H., Saud, H., 2016. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2016/6284547>

- Haichar, F., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *Isme J* 2, 1221.
- Hallman, J., 2001. Plant interactions with endophytic bacteria, in: Jeger, M., Spence, N. (Eds.), *Biotic Interactions on Plant-Pathogen Associations*. CABI Publishing, pp. 87–119.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W., Kloepper, J., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43, 895–914. <https://doi.org/10.1139/m97-131>
- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M., Ouhdouch, Y., 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 2565–2575. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9817-0>
- Hao, X., Cho, C., Racz, G., Chang, C., 2002. Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. *Kluwer Acad Publ* 64, 213–224. <https://doi.org/10.1023/A:1021470824083>
- Hardoim, P., Nazir, R., Sessitsch, A., Elhottová, D., Korenblum, E., van Overbeek, L., van Elsas, J., 2013a. The new species *Enterobacter oryziphilus* sp. nov. and *Enterobacter oryzendophyticus* sp. nov. are key inhabitants of the endosphere of rice. *BMC Microbiol* 13, 164–164. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-164>
- Hardoim, P., Nazir, R., Sessitsch, A., Elhottová, D., Korenblum, E., van Overbeek, L., van Elsas, J., 2013b. The new species *Enterobacter oryziphilus* sp. nov. and *Enterobacter oryzendophyticus* sp. nov. are key inhabitants of the endosphere of rice. *BMC Microbiol* 13, 164–164. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-164>
- Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A., 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79, 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
- Hardoim, P., van Overbeek, L., Elsas, J., 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Harshey, R., 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* 57, 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091014>
- Harshey, R., 1994. Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 13, 389–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00433.x>
- Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312, 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D., Berg, G., 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321, 235–257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Hata, H., Natori, T., Mizuno, T., Kanazawa, I., Eldesouky, I., Hayashi, M., Miyata, M., Fukunaga, H., Ohji, S., Hosoyama, A., Aono, E., Yamazoe, A., Tsuchikane, K., Fujita, N., Ezaki, T., 2016. Phylogenetics of family Enterobacteriaceae and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. *Microbiol Immunol* 60, 303–311. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12374>
- Hedegaard, J., Okkels, H., Bruun, B., Kilian, M., Mortensen, K., Nørskov-Lauritsen, N., 2001. Phylogeny of the genus *Haemophilus* as determined by comparison of partial *infB* sequences. *Microbiol* 147, 2599–609. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-9-2599>
- Hedegaard, J., Steffensen, S., Nørskov-Lauritsen, N., Mortensen, K., Sperling-Petersen, H., 1999. Identification of Enterobacteriaceae by partial sequencing of the gene

- encoding translation initiation factor 2. *Int J Syst Bacteriol* 49, 1531–8.
<https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1531>
- Hemavathi, V., Sivakumar, B., Suresh, C., Earanna, N., 2006. Effect of *Glomus fasciculatum* and plant growth promoting rhizobacteria on growth and yield of *Ocimum basilicum*. *Karnataka J Agric Sci* 19, 17–20.
- Henrichsen, J., 1983. Twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 37, 81–93.
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.000501>
- Henrichsen, J., 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36, 478–503.
- Hider, R., Kong, X., 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27, 637–657.
<https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Hodkinson, T., Doohan, F., Saunders, M., Murphy, B. (Eds.), 2019. Endophytes for a growing world, 1st ed. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Hoffmann, H., Stindl, S., Ludwig, W., Stumpf, A., Mehlen, A., Heesemann, J., Monget, D., Schleifer, K., Roggenkamp, A., 2005a. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. *Syst Appl Microbiol* 28, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.010>
- Hoffmann, H., Stindl, S., Ludwig, W., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Pierard, D., Ziesing, S., Heesemann, J., Roggenkamp, A., Schleifer, K., 2005b. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. *J Clin Microbiol* 43, 3297–3303.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3297-3303.2005>
- Hoffmann, H., Stindl, S., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Heesemann, J., Schleifer, K., Roggenkamp, A., 2005c. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Syst Appl Microbiol* 28, 206–212.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.009>
- Holford, I., 1997. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *CSIRO Publ.* 35, 227. <https://doi.org/10.1071/S96047>
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J., Danchin, A., Bertin, P., 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* 40, 20–36. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02358.x>
- Hoque, M., Broadhurst, L., Thrall, P., 2011. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 299–309.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.021014-0>
- Hormaeche, e, Edwards, P., 1960. A proposed genus *Enterobacter*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 10, 71–74.
- Huang, X., Chaparro, J., Reardon, K., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J., 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* 92, 267–275. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0225>
- Ibañez, F., Angelini, J., Taurian, T., Tonelli, M., Fabra, A., 2009. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Syst Appl Microbiol* 32, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.10.001>
- III Farmer, J., Asbury, M., Hickman, F., Brenner, D., 1980. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 30. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-3-569>
- III Farmer, J., Fanning, G., Davis, B., O’Hara, C.M., Riddle, C., Hickman-Brenner, F., Asbury, M., Lowery, V., Brenner, D., 1985. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylora*,

- two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 21, 77–81.
- Illmer, P., Barbato, A., Schinner, F., 1995. Solubilization of hardly-soluble AlPO₄ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol Biochem* 27, 265–270.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00205-F](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00205-F)
- Inoue, K., Sugiyama, K., Kosako, Y., Sakazaki, R., Yamai, S., 2000. *Enterobacter cowanii* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae. *Curr Microbiol* 41, 417–420.
<https://doi.org/10.1007/s002840010160>
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. *BMC Evol Biol* 7, 64–64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-64>
- Izard, D., Gavini, F., Leclerc, H., 1980a. Polynucleotide sequence relatedness and genome size among *Enterobacter intermedium* sp. nov. and the species *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zentralblatt Für Bakteriologie. Abt Orig C Allg Angew Ökol Mikrobiol* 1, 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0172-5564\(80\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0172-5564(80)80016-9)
- Izard, D., Gavini, F., Trinel, P., Krubwa, F., Leclerc, H., 1980b. Contribution of DNA-DNA hybridization to the transfer of *Enterobacter aerogenes* to the genus *Klebsiella* as *K. mobilis*. *Zentralblatt Für Bakteriologie. Abt Orig C Allg Angew Ökol Mikrobiol* 1, 257–263. [https://doi.org/10.1016/S0172-5564\(80\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S0172-5564(80)80006-6)
- Izard, D., Gavini, F., Trinel, P., Leclerc, H., 1981. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter amnigenus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 31, 35–42. <https://doi.org/10.1099/00207713-31-1-35>
- James, E., Olivares, F., de Oliveira, A., dos Reis, F., da Silva, L., Reis, V., 2001. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52, 747–760.
<https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.747>
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W., Reddy, P., Iannetta, P., Olivares, F., Ladha, J., 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15, 894–906. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.894>
- Janda, J., Abbott, S., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45, 2761.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jaramillo, P., Guimarães, A., Florentino, L., Silva, K., Nóbrega, R., Moreira, F., 2013. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. *Sci Agric* 70, 397–404.
- Jarrell, K., McBride, M., 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* 6, 466.
- Jha, C., Aeron, A., Patel, B., Saraf, M., Maheshwari, D., 2011. *Enterobacter*: role in plant growth promotion. In: *Bacteria in Agrobiotechnology: Plant Growth Responses*. pp. 159–182.
- Jha, Y., Subramanian, R., 2013. Paddy plants inoculated with PGPR show better growth physiology and nutrient content under saline condition. *Chil J Agric Res* 73, 213–219.
- Jin, L., Sun, X., Wang, X., Shen, Y., Hou, F., Chang, S., Wang, C., 2010. Synergistic interactions of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia promoted the growth of *Lathyrus sativus* under sulphate salt stress. *Symbiosis* 50, 157–164.
<https://doi.org/10.1007/s13199-010-0058-2>

- Johnson, M., 2017. Photosynthesis. *Essays Biochem* 60, 255–273.
<https://doi.org/10.1042/EBC20160016>
- Kaga, H., Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaneko, S., Morisaki, H., 2009. Rice seeds as sources of endophytic bacteria. *Microbes Environ* 24, 154–162.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09113>
- Kageyama, K., Nelson, E., 2003. Differential inactivation of seed exudate stimulation of *Pythium ultimum sporangium* germination by *Enterobacter cloacae* influences biological control efficacy on different plant species. *Appl Environ Microbiol* 69, 1114–1120. <https://doi.org/10.1128/aem.69.2.1114-1120.2003>
- Kämpfer, P., Glaeser, S., Alekhya, G., Behringer, K., Exner, Chakraborty, T., Schmithausen, R., Doijad, S., 2018. *Lelliottia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 2454–2461. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002854>
- Kämpfer, P., McInroy, J., Glaeser, S., 2015. *Enterobacter muelleri* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Zea mays*. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 4093–4099.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000547>
- Kämpfer, P., Ruppel, S., Remus, R., 2005. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.007>
- Kan, F., Chen, Z., Wang ET, E., Tian, C., Sui, X., Chen, W., 2007. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai–Tibet plateau and in other zones of China. *Arch Microbiol* 188, 103–115.
<https://doi.org/10.1007/s00203-007-0211-3>
- Kaul, S., Sharma, T., Dhar, M., 2016. “Omics” tools for better understanding the plant-endophyte interactions. *Front Plant Sci* 7, 955–955.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00955>
- Kavamura, V., Santos, S., Silva, J., Parma, M., Ávila, L.A., Visconti, A., Zucchi, T., Taketani, R., Andreote, F., Melo, I.S. de, 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiol Res* 168, 183–191.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>
- Kearns, D., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8, 634.
- Kende, H., Zeevaart, JAD., 1997. The Five “Classical” Plant Hormones. *Plant Cell* 9, 1197.
<https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1197>
- Khalifa, A., Alsyeeh, A., Almalki, M., Saleh, F., 2016. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi J Biol Sci* 23, 79–86.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.008>
- Khan, M., Rizvi, Y., 1994. Effect of salinity, temperature, and growth regulators on the germination and early seedling growth of *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Can J Bot* 72, 475–479. <https://doi.org/10.1139/b94-063>
- Khan, M., Zaidi, A., Wani, P., 2007. Role of Phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. *Agron Sustain Dev* 27, 29–43.
<https://doi.org/10.1051/agro:2006011>
- Khosro, M., 2012. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Sci Acad Publ* 2, 80–85. <https://doi.org/10.5923/j.re.20120201.10>
- Khunthongpan, S., Bourneow, C., H-kittikun, A., Tanasupawat, S., Benjakul, S., Sumpavapol, P., 2013. *Enterobacter siamensis* sp. nov., a transglutaminase-producing bacterium isolated from seafood processing wastewater in Thailand.
<https://doi.org/10.2323/jgam.59.135>
- Kim, D., Jang, S., Neupane, G., Jang, M., Kwon, S., Kim, S., Kim, W., 2010. *Enterobacter nimipressuralis* as a cause of pseudobacteremia. *BMC Infect Dis* 10, 315.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-315>

- Kim, K., Jang, Y., Lee, S., Oh, B., Chae, J., Lee, K., 2014. Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Mol Cells* 37, 109–117. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2239>
- Kim, K.Y., Jordan, D., Krishnan, H.B., 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett* 153, 273–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12585.x>
- Kim, YC, Jung, H., Kim, YK, Park, K., 2007. An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *Eur J Plant Pathol* 120, 373–382. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9227-4>
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M., 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885–886. <https://doi.org/10.1038/286885a0>
- Kloepper, J., Schroth, M., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. IV international conference on plant pathogenic bacteria. Pro. 4th Intern Conf Plant Pathgen Bacteria (Angers, France: Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA), France.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., von Mering, C., Vorholt, J., 2012. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J* 6, 1378–1390. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.192>
- Koga, J., Adachi, T., Hidaka, H., 1991. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Mol Gen Genet MGG* 226, 10–16. <https://doi.org/10.1007/BF00273581>
- Korir, H., Mungai, N., Thuita, M., Hamba, Y., Masso, C., 2017. Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil *Front Plant Sci* 8, 141–141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00141>
- Kosako, Y., Tamura, K., Sakazaki, R., Miki, K., 1996. *Enterobacter kobei* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae resembling *Enterobacter cloacae*. *Curr Microbiol* 33, 261–265. <https://doi.org/10.1007/s002849900110>
- Kpombekou, A., Tabatabai, M., 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci* 158.
- Krishnaraj, P., Pasha, M., 2017. Metagenome of Rhizosphere and Endophytic Ecosystem, in: Singh, R., Kothari, R., Koringa, P., Singh, S. (Eds.), *Understanding Host-Microbiome Interactions-An Omics Approach*. Omics of Host-Microbiome Association. Springer, Singapore, pp. 125–147.
- Kumar, V., Narula, N., 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol Fertil Soils* 28, 301–305. <https://doi.org/10.1007/s003740050497>
- Kwon, T., Shim, S., Heo, M., An, D., Shin, K., Lee, J., 2007. Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing bacteria from Korean fermented vegetables. *Korean J Microbiol Biotechnol* 35, 191.
- Laalami, S., Putzer, H., Plumbridge, J., Grunberg-Manago, M., 1991. A severely truncated form of translational initiation factor 2 supports growth of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 220, 335–349. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90017-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90017-Z)

- Lacava, P., Azevedo, J., 2013. Endophytic bacteria: a biotechnological potential in agrobiological system, in: *Bacteria in Agrobiological: Crop Productivity*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1–41. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_1
- Ladha, J., Barraquio, W., Watanabe, I., 1983. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Can J Microbiol* 29, 1301–1308. <https://doi.org/10.1139/m83-203>
- Lagier, J., El Karkouri, K., Mishra, A., Robert, C., Raoult, D., Fournier, P., 2013. Non contiguous-finished genome sequence and description of *Enterobacter massiliensis* sp. nov. *Stand. Genomic Sci* 7, 399–412. <https://doi.org/10.4056/sigs.3396830>
- Lai, W., Hameed, A., Lin, S., Hung, M., Hsu, Y.-H., Liu, Y., Shahina, M., Shen, F., Young, C., 2015. *Paenibacillus medicaginis* sp. nov. a chitinolytic endophyte isolated from a root nodule of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 3853–3860. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000505>
- Lamanceau, P., Bauer, P., Kraemer, S., Briat, J., 2009. Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil* 321, 513–535. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0039-5>
- Lamont, I., Martin, L., 2003. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 149, 833–42. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26085-0>
- Landini, P., Zehnder, A., 2002. The global regulatory hns gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol* 184, 1522–1529. <https://doi.org/10.1128/jb.184.6.1522-1529.2002>
- Laurent-Winter, C., Ngo, S., Danchin, A., Bertin, P., 1997. Role of *Escherichia coli* histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response. *Eur J Biochem* 244, 767–773. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00767.x>
- Leach, J., Triplett, L., Argueso, T., Trivedi, P., 2017. Communication in the phytobiome. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.025>
- Lee, K., 2001. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends Biotechnol* 19, 217–22. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01639-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01639-0)
- Leite, H., Silva, A., Gomes, F., Gramacho, K., Faria, J., de Souza, J., Loguercio, L., 2013. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 2639–2651. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4574-2>
- Leite, J., Fischer, D., Rouws, L., Fernandes-Júnior, P., Hofmann, A., Kublik, S., Schloter, M., Xavier, G., Radl, V., 2017. Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. *Front Plant Sci* 7, 2064–2064. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02064>
- Leite, J., Sl, S., Passos, S., Xavier, G., Rumjanek, N., Lmv, M., 2009. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. *Rev Bras Cienc Solo* 33. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000500015>
- Lery, L., Hemery, A., Nogueira, E., von Krüger, W., Bisch, P., 2010. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 562–576. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0178>
- Leveau, J., 2007. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119, 279–300. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9186-9>
- Li, H., Lei, P., Pang, X., Li, S., Xu, H., Xu, Z., Feng, X., 2017. Enhanced tolerance to salt stress in canola (*Brassica napus* L.) seedlings inoculated with the halotolerant *Enterobacter*

- cloacae* HSNJ4. *Appl Soil Ecol* 119, 26–34.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.033>
- Li, J., Wang, E., Chen, WF, Chen, WX, 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem* 40, 238–246.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.014>
- Li, X., Zhang, T., Wang, X., Hua, K., Zhao, L., Han, Z., 2013. The composition of root exudates from two different resistant peanut cultivars and their effects on the growth of soil-borne pathogen. *Int J Biol Sci* 9, 164–173. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5579>
- Li, Y., Zhou, Y., Ji, J., Gu, C., 2016. Reclassification of *Enterobacter oryziphilus* and *Enterobacter oryzendophyticus* as *Kosakonia oryziphila* comb. nov. and *Kosakonia oryzendophytica* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 2780–3.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001054>
- Lin, L., Li, Z., Hu, C., Zhang, X., Chang, S., Yang, L., Li, Y., An, Q., 2012. Plant growth-promoting nitrogen-fixing Enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes Environ* 27, 391–398.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11275>
- Lipman, J., 1904. Soil bacteriological studies. Further contributions to the physiology and morphology of the members of the *Azotobacter* group. *Rep New Jersey State Agric Exp Station* 25, 237–289.
- Liu, G., Chater, K., Chandra, G., Niu, G., Tan, H., 2013. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 112.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00054-12>
- Liu, S., Perry, K., Schardl, C., Kado, C., 1982. Agrobacterium Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 2812–2816.
- Liu, S., Tang, Y., Wang, D., Lin, N., Zhou, J., 2016. Identification and characterization of a new *Enterobacter* onion bulb decay caused by *Lelliottia amnigena* in China. *Appl Micro Open Access* 2. <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000114>
- Liu, W., Chung, K., Wong, C., Jiang, J., Hui, R., Leung, F., 2012a. Complete genome sequence of the endophytic *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* strain ENHKU01. *J Bacteriol* 194, 5965–5965. <https://doi.org/10.1128/JB.01394-12>
- Liu, W., Chung, K., Wong, C., Jiang, J., Hui, R., Leung, F., 2012b. Complete genome sequence of the endophytic *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* strain ENHKU01. *J Bacteriol* 194, 5965–5965. <https://doi.org/10.1128/JB.01394-12>
- López-Fernández, S., Sonogo, P., Moretto, M., Pancher, M., Engelen, K., Pertot, I., Campisano, A., 2015. Whole-genome comparative analysis of virulence genes unveils similarities and differences between endophytes and other symbiotic bacteria. *Front Microbiol* 6, 419–419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00419>
- López-Fuentes, E., Ruiz-Valdiviezo, V., Martínez-Romero, E., Gutiérrez-Miceli, F., Dendooven, L., Rincon-Rosales, R., 2012. Bacterial community in the roots and rhizosphere of *Hypericum silenoides* Juss. 1804. *Afr J Microbiol Res* 6, 2704–2711.
<https://doi.org/10.5897/AJMR11.1192>
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludvigsen, A., Bachleitner, M., Fischer, U., Schleifer, K., 1993. Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase β -subunit genes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 285–305. <https://doi.org/10.1007/BF00873088>
- Ludwig, W., Schleifer, K., 1999. Phylogeny of Bacteria beyond the 16S rRNA Standard.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J., Saravanan, V., Lee, K., Santhanakrishnan, P., 2010. *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant-growthpromoting diazotrophic bacterium

- isolated from rhizosphere soil of groundnut. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1559–1564. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.013664-0>
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D., 2015. *Brock Biology of Microorganisms*, 14th ed. Pearson.
- Madmony, A., Chernin, L., Pleban, S., Peleg, E., Riov, J., 2005. *Enterobacter cloacae*, an obligatory endophyte of pollen grains of Mediterranean pines. *Folia Microbiol* 50, 209–216. <https://doi.org/10.1007/bf02931568>
- Malhotra, M., Srivastava, S., 2007. An ipdC knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *S Antoine van Leeuwenhoek* 93, 425–33. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9207-x>
- Manter, D., Hunter, W., Vivanco, J., 2011. *Enterobacter soli* sp. nov.: a lignin-degrading γ -Proteobacteria isolated from soil. *Curr Microbiol* 62, 1044–1049. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9809-9>
- Maougal, R., Brauman, A., Plassard, C., Abadie, J., Djekoun, A., Drevon, J., 2014. Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *Elsevier Sci BV* 62, 8–14.
- Mara, L., de Oliveira, S., Roberto, C., Soares, F., de Souza Moreira, F., 2011. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Sci Agric* 68.
- Maron, P., Cœur, C., Pink, C., Clays-Josserand, A., Lensi, R., Richaume, A., Potier, P., 2003. Use of polyclonal antibodies to detect and quantify the NOR protein of nitrite oxidizers in complex environments. *J Microbiol Methods* 53, 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00231-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00231-2)
- Maron, P., Ranjard, L., Mougél, C., Lemanceau, P., 2007. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. *Microb Ecol* 53, 486–93. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9196-8>
- Marques, A., Moreira, H., Franco, A., Rangel, A., Castro, P., 2013. Inoculating *Helianthus annuus* (sunflower) grown in zinc and cadmium contaminated soils with plant growth promoting bacteria – effects on phytoremediation strategies. *Chemosphere* 92, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.055>
- Marschner, P., 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, 3rd ed. Academic Press, Elsevier, USA.
- Martínez-García, P., Ruano-Rosa, D., Schilirò, E., Prieto, P., Ramos, C., Rodríguez-Palenzuela, P., Mercado-Blanco, J., 2015. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae*. *Stand Genomic Sci* 10, 10–10. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-10>
- Martínez-Hidalgo, P., Galindo-Villardón, P., Trujillo, M., Igual, J., Martínez-Molina, E., 2014a. *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising plant probiotic bacteria. *Sci Rep* 4, 6389–6389. <https://doi.org/10.1038/srep06389>
- Martínez-Hidalgo, P., García, J., Pozo, M., 2015. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Front Microbiol* 6, 922–922. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00922>
- Martínez-Hidalgo, P., Olivares, J., Delgado, A., Bedmar, E., Martínez-Molina, E., 2014b. Endophytic *Micromonospora* from *Medicago sativa* are apparently not able to fix atmospheric nitrogen. *Soil Biol Biochem* 74, 201–203. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.011>
- Martins, L., Neves, M., Rumjanek, N., 1997. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Int Symp*

- Sustain Agric Trop Role Biol Nitrogen Fixat 29, 1005–1010.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00215-5)
- Mathesius, U., Schlaman, H., Spalink, H., Sautter, C., Rolfe, B., Djordjevic, M., 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J* 14, 23–34.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00090.x>
- Matilla, M., Ramos, J., Bakker, P., Doornbos, R., Badri, D., Vivanco, J., Ramos-González, M., 2010. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environ Microbiol Rep* 2, 381–388.
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00091.x>
- Maymon, M., Martínez-Hidalgo, P., Tran, S., Ice, T., Craemer, K., Anbarchian, T., Sung, T., Hwang, L., Chou, M., Fujishige, N., Villella, W., Ventosa, J., Sikorski, J., Sanders, E., Faull, K., Hirsch, A., 2015. Mining the phytomicrobiome to understand how bacterial coinoculations enhance plant growth. *Front Plant Sci* 6, 784–784.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00784>
- Mazzola, M., White, F.F., 1994. A mutation in the indole-3-acetic acid biosynthesis pathway of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affects growth in *Phaseolus vulgaris* and Syringomycin production. *J. Bacteriol.* 176, 1374–1382.
- McFarland, J., 1907. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc* XLIX, 1176–1178. <https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
- Megías, E., Megías, M., Ollero, F., Hungria, M., 2016. Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* strain AMG521, a rice plant growth-promoting bacterial endophyte isolated from the Guadalquivir Marshes in Southern Spain. *Genome Announ* 4, 1681–15.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01681-15>
- Meier, I., Avis, P., Phillips, R., 2013. Fungal communities influence root exudation rates in pine seedlings. *FEMS Microbiol Ecol* 83, 585–595. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12016>
- Menendez, E., Helena Ramirez-Bahena, M., Peix, A., Tejedor, C., Mulas, R., González-Andrés, F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E., 2016. Analysis of Cultivable Endophytic Bacteria in Roots of Maize in a Soil from León Province in Mainland Spain, in: *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. pp. 45–53.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6_5
- Mercado-Blanco, J., Lugtenberg, B., 2014. Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Curr Biotechnol* 3, 60–75.
<https://doi.org/10.2174/22115501113026660038>
- Mercado-Blanco, J., Prieto, P., 2012. Bacterial endophytes and root hairs. *Plant Soil* 361, 301–306. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1212-9>
- Meyer, J., 2000. Pyoverdins: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of *fluorescent Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* 174, 135–42.
<https://doi.org/10.1007/s002030000188>
- Meyer, J., Geoffroy, V., Baysse, C., Cornelis, P., Barelmann, I., Taraz, K., Budzikiewicz, H., 2002. Siderophore-mediated iron uptake in *fluorescent Pseudomonas*: characterization of the pyoverdine-receptor binding Site of three cross-reacting pyoverdines. *Arch Biochem Biophys* 397, 179–183.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2667>
- Miché, L., Battistoni, F., Gemmer, S., Belghazi, M., Reinhold-Hurek, B., 2006. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 502–511. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0502>

- Milagres, A., Machuca, A., Napoleão, D., 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J Microbiol Methods* 37, 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00028-7)
- Minami, S., Yotsuji, A., Inoue, M., Mitsuhashi, S., 1980. Induction of β -Lactamase by Various β -Lactam Antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 18, 382–385.
- Mishustin, E., Naumova, A., 1962. Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action.
- Mokracka, J., Cichoszewska, E., Kaznowski, A., 2011. Siderophore production by Gram-negative rods isolated from human polymicrobial infections. *Biol Lett* 48, 147–157. <https://doi.org/10.2478/v10120-011-0012-x>
- Mokracka, J., Koczura, R., Kaznowski, A., 2004. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. *Pathog Dis* 40, 51–55. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00276-1](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00276-1)
- Molina, L., da Fonseca, G., de Moraes, G., de Oliveira, L., de Carvalho, J., Kulcheski, F., Margis, R., 2012. Metatranscriptomic analysis of small RNAs present in soybean deep sequencing libraries. *Genet Mol Biol* 35, 292–303. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000200010>
- Mori, S., 1999. Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol* 2, 250–253. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80043-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80043-0)
- Morris, P., Bone, E., Tyler, B., 1998. Chemotropic and contact responses of *phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiol* 117, 1171–1178.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C., 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411, 948–950. <https://doi.org/10.1038/35082070>
- Muller, P., Doring, M., 2009. Isothermal DNA amplification facilitates the identification of a broad spectrum of bacteria, fungi and protozoa in *Eleutherococcus* sp. plant tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98, 35–45. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9536-8>
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F., Squartini, A., 2008. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol Ecol* 63, 383–400. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x>
- Muriel, C., Jalvo, B., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Martín, M., 2015. Chemotactic motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under aerobic and denitrification conditions. *PLoS One* 10, e0132242–e0132242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132242>
- Murphy, B., Doohan, F., Hodkinson, T., 2014. Fungal endophytes of barley roots. *J Agric Sci* 152, 602–615. <https://doi.org/10.1017/S0021859613000348>
- Mwafurirwa, S., Samson, S., Nkasala, E., Kanyada, F., 2018. Isolation and characterization of plant growth promoting non-rhizobial Root nodule bacteria of major legumes in Malawi. *Res J Recent Sci* 7, 24–29.
- Nadeem, S., Zahir, Z., Naveed, M., z Naeem Asghar, H., Arshad, M., 2010. Rhizobacteria capable of producing ACC-deaminase may mitigate salt stress in wheat. *Soil Sci Soc Am J* 74, 533–542. <https://doi.org/10.2136/sssaj2008.0240>
- Nakkeeran, S., Zaki, S., Fernando, D., 1970. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases, in: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. pp. 257–296. https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_10

- Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Sheela, J., Raguchander, T., Samiyappan, R., 2001. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *BioControl* 46, 493–510. <https://doi.org/10.1023/A:1014131131808>
- Naum, M., Brown, E., Mason-Gamer, R., 2011. Is a robust phylogeny of the enterobacterial plant pathogens attainable? *Cladistics* 27, 80–93. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00313.x>
- Naumova, A., Mishustin, E., Marienko, V., 1962. The nature of action of bacterial fertilizers (Azatobacter and Phosphobacteria) on agricultural crops.
- Nautiyal, C., 2006. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170, 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170, 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Naveed, M., Mitter, B., Yousaf, S., Pastar, M., Afzal, M., Sessitsch, A., 2014. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biol Fertil Soils* 50, 249–262. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0854-y>
- Naz, I., Bano, A., 2010. Biochemical, molecular characterization and growth promoting effects of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. isolated from weeds grown in salt range of Pakistan. *Plant Soil* 334, 199–207. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0372-8>
- Ndungu, S., Messmer, M., Ziegler, D., Gamper, H., Mészáros, É., Thuita, M., Vanlauwe, B., Frossard, E., Thonar, C., 2018. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. *Agric Ecosyst Environ* 261, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.014>
- Neilands, J., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270, 26723–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
- Neilands, J., 1984. Methodology of siderophores, in: Chimiak, A., Hider, R., Liu, A., Neilands, J., Nomoto, K., Sugiura, Y. (Eds.), *Siderophores from Microorganisms and Plants*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–24.
- Neilands, J., 1981. Iron Absorption and transport in microorganisms. *Annu Rev Nutr* 1, 27–46. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.01.070181.000331>
- Nelson, E., Chao, W., Norton, J., Nash, G., Harman, G., 1986. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off. *Phytopathol* 76, 327–335.
- Newton, W., 2000. Nitrogen fixation in perspective, in: Pedrosa, F., Hungria, M., Yates, M., Newton, W. (Eds.), *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Proceedings of the 12th International Congress in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 3–8.
- Ngamau, C., Matiru, V., Tani, A., Muthuri, C., 2012. Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *Afr J Microbiol Res* 6.
- Nhung, H., Ohkusu, K., Mishima, N., Noda, M., Shah, M., Sun, X., Hayashi, M., Ezaki, T., 2007. Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.019>

- Niner, B.M., Brandt, J.P., Villegas, M., Marshall, C.R., Hirsch, A.M., Valdés, M., 1996. Analysis of partial sequences of genes coding for 16S rRNA of actinomycetes isolated from *Casuarina equisetifolia* nodules in Mexico. *Appl Environ Microbiol* 62, 3034–3036.
- Nishikawa, K., Oi, S., Yamamoto, T., 1979. Induced production of acidic polysaccharide by benzalkonium chloride in a bacterium and some properties of the acidic polysaccharide produced. *Agric Biol Chem* 43, 2305–2310.
<https://doi.org/10.1271/bbb1961.43.2305>
- Noel, T., Sheng, C., Yost, C., Pharis, R., Hynes, M., 1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Can J Microbiol* 43, 279–83.
- Nørskov-Lauritsen, N., Christensen, H., Okkels, H., Kilian, M., Bruun, B., 2004. Delineation of the genus *Actinobacillus* by comparison of partial *infB* sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 635–44 <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02785-0>
- Ogbo, F., Okonkwo, J., 2012. Some characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp. isolated from the roots of maize. *Adv Microbiol* 2, 368–374.
<https://doi.org/10.4236/aim.2012.23046>
- Ogunseitan, O., 1996. Protein profile variation in cultivated and native freshwater microorganisms exposed to chemical environmental pollutants. *Microb Ecol* 31, 291–304. <https://doi.org/10.1007/BF00171573>
- Ogunseitan, O., 1993. Direct extraction of proteins from environmental samples. *J Microbiol Methods* 17, 273–281. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(93\)90056-N](https://doi.org/10.1016/0167-7012(93)90056-N)
- O’Hara, C., Steigerwalt, A., Hill, B., III Farmer, J., Fanning, G., Brenner, D., 1989. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75. *J Clin Microbiol* 27, 2046–2049.
- Olanrewaju, O., Glick, B., Babalola, O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 33, 197.
<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Oldroyd, G., Dixon, R., 2014. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Food Biotechnol* ● *Plant Biotechnol* 26, 19–24.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.006>
- Oliveira, M., Santos, T., Vale, H., Delvaux, J., Cordero, A.P., Ferreira, A., Miguel, P., Tótola, M., Costa, M., Moraes, C., Borges, A., 2013. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Can J Microbiol* 59, 221–230.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0674>
- Ono, S., Goldberg, M., Olsson, T., Esposito, D., Hinton, J., Ladbury, J., 2005. H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation. *Biochem J* 391, 203–213. <https://doi.org/10.1042/BJ20050453>
- Ordentlich, A., Elad, Y., Chet, I., 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol* 78, 84–88.
- Ottemann, K., Miller, J., 1997. Roles for motility in bacterial–host interactions. *Mol Microbiol* 24, 1109–1117. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4281787.x>
- Padulosi, S., Ng, N., 1997. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, in: Singh, B., Raj, M., Dashiell, K., Jackai, L. (Eds.), *Advances in Cowpea Research*. International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), pp. 1–10.
- Palaniappan, P., Chauhan, P., Saravanan, V., Anandham, R., Sa, T., 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol Fert Soil* 46, 807–816. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0485-5>
- Pandey, A., Chaudhry, S., Sharma, A., Choudhary, V., Malviya, M., Chamoli, S., Kooliyottil, R., Trivedi, P., Palni, L., 2011. Recovery of *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. from the ‘fired

- plots' under shifting cultivation in Northeast India. *Curr Microbiol* 62, 273–80. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9702-6>
- Pandey, A., Mann, M., 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837–46. <https://doi.org/10.1038/35015709>
- Pandey, P., Kang, S., Maheshwari, D., 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr Sci* 89, 177–180.
- Pandya, M., Kumar, G., Rajkumar, S., 2013. Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. *FEMS Microbiol Lett* 348, 58–65. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12245>
- Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Bélanger, S., Martel, E., Boudreau, D., Picard, F., Ouellette, M., Roy, P., Bergeron, M., 2005. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2013–25. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63539-0>
- Parida, A., Das, A., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ. Saf.* 60, 324–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Patel, H., Chakraborty, R., Desai, S., 1988. Isolation and partial characterization of phenolate siderophore from *Rhizobium leguminosarum* IARI 102. *Elsevier* 131–134.
- Patel, J., 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 6, 313–321. <https://doi.org/10.1054/modi.2001.29158>
- Patten, C., Glick, B., 2002a. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can J Microbiol* 48, 635–42.
- Patten, C., Glick, B., 2002b. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68, 3795–3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl Environ Microbiol* 68, 3795. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Pavan, M., Franco, R., Rodriguez, J., Gadaleta, P., Abbott, S., Janda, J., Zorzó pulos, J., 2005. Phylogenetic relationships of the genus *Kluyvera*: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard et al. 1980 to the genus *Kluyvera* as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera cochleae* as a later synonym of *K. intermedia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 437–42. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63071-0>
- Pawlicki-Jullian, N., Courtois, B., Pillon, M., Lesur, D., Le Flèche-Mateos, A., Laberche, J., Goncharova, N., Courtois, J., 2010. Exopolysaccharide production by nitrogen-fixing bacteria within nodules of *Medicago* plants exposed to chronic radiation in the Chernobyl exclusion zone. *Tribute Jacques Monod 1910-1976* 161, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.009>
- Payne, S.M., 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 329–344. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)
- Pena, C., Loyola-Vargas, V., 2014. Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. *Plant Physiol* 166. <https://doi.org/10.1104/pp.114.241810>
- Peng, G., Zhang, W., Luo, H., Xie, H., Lai, W., Tan, Z., 2009. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1650–5. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65484-0>
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio, L., Fernández, F., 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods* 70, 127–31. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>

- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F., Ollero, F., Cubo, T., 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 169, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Petrini, O., 1991. Fungal Endophytes of Tree Leaves, in: Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. pp. 179–197. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Phillips, D., Fox, T., King, M., Bhuvaneswari, T., Teuber, L., 2004. Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiol* 136, 2887–2894. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044222>
- Pieterse, C., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., van Wees, W., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5, 308–16. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pilet, P., Chollet, R., 1970. Sur le dosage colorimétrique de l'acide indolylacétique. *C R Acad Sci, D* 1675–1678.
- Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (Eds.), 2007. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil–plant interface, 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Porter, S., Wadhams, H., Armitage, P., 2011. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Int J Syst Bacteriol* 49, 1531–1538. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2505>
- Prakamhang, J., Minamisawa, K., Teamtaisong, K., Boonkerd, N., Teaumroong, N., 2009. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Appl Soil Ecol* 42, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.02.008>
- Premachandra, D., Hudek, L., Brau, L., 2016. Bacterial modes of action for enhancing of plant growth. *J Biotechnol Biomater* 6, 1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-952X.1000236>
- Prenomo, M., Moawad, A., Vlek, P., 1996. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian J Crop Sci* 11, 13–23.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Vanonckelen, H., 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-Tryptophan dependent pathway. *Mol Plant Microbe Interact* 6, 609–615. <https://doi.org/10.1094>
- Pule-Meulenberg, F., Belane, A., Krasova-Wade, T., Dakora, F., 2010. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. *BMC Microbiol.* 10, 89–89. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-89>
- Radl, V., Simões-Araújo, J., Leite, J., Ribeiro, P., Vieira, L., Ribeiro XG, Gouvêa RN, Ivo BJ, Zilli JE, 2013. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 725–730. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.053082-0>
- Regli, A., Pagès, J., 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol* 6, 392–392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>
- Reis, V., Teixeira, K., 2015. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. *J Basic Microbiol* 55, 931–949. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400898>
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H., Sessitsch, A., 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl Environ Microbiol* 68, 2261–2268. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2261-2268.2002>
- Rengasamy, P., 2006. World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* 57, 1017–1023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj108>

- Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L., Antoun, H., 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol Biochem* 33, 1741–1747. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00099-2)
- Richardson, A., 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Funct Plant Biol* 28, 897–906. <https://doi.org/10.1071/PP01093>
- Rincón, A., Arenal, F., González, I., Manrique, E., Lucas, M., Pueyo, J., 2008. Diversity of rhizobial bacteria isolated from nodules of the Gypsophyte *Ononis tridentata* L. growing in Spanish soils. *Microb Ecol* 56, 223–233. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9339-6>
- Ringel, M., Brucer, T., 2018. The biosynthesis of pyoverdins. *Microbial Cell* 5, 424–437. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.649>
- Rioux, C., Jordan, D., Rattray, J., 1986. Iron requirement of *Rhizobium leguminosarum* and secretion of anthranilic acid during growth on an iron-deficient medium. *Arch Biochem Biophys* 248, 175–182. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90414-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90414-5)
- Riov, J., Yang, S., 1989. Ethylene and Auxin-Ethylene Interaction in Adventitious Root Formation in Mung Bean Cuttings. *J Plant Growth Regul* 8, 131–141. <https://doi.org/10.1007/BF02025280>
- Roberts, D., Short, N., Maloney, A., Nelson, E., Schaff, D., 1994. Role of colonization in biocontrol: studies with *Enterobacter cloacae*. *Plant Sci* 101, 83–89. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90167-8)
- Roblot, P., Pillon, M., Apanga, L., Pilard, S., Courtois, J., Nathalie, J., 2013. Structural features and bioremediation activity of an exopolysaccharide produced by a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated in the Chernobyl exclusion zone. *Carbohydr Polym* 93, 154–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.025>
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17, 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- Roggenkamp, A., 2007. Phylogenetic analysis of enteric species of the family Enterobacteriaceae using the *oriC*-locus. *Syst Appl Microbiol* 30, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.06.004>
- Rosangela, N., Kishi, L., Kishi, C., Picchi, C., Barbosa, M., Oliverio, T., Lemos, J., Marcondes, E., de Macedo Lemos, E., 2012. Phosphorus solubilizing and IAA production activities in plant growth promoting rhizobacteria from Brazilian soils under sugarcane cultivation. *ARPN J Eng Appl Sc* 7.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 827–837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>
- Roy, P., Guha, D., Banerjee, R., Singh, M., 2016. A comparative study of three rhizospheric bacteria belonging to different genera, co-infecting a leguminous plant. *J Investig Genomics* 3. <https://doi.org/10.15406/jig.2016.03.00053>
- Ruiz-Sánchez, M., Aroca, R., Muñoz, Y., Polón, R., Ruiz-Lozano, J., 2010. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *J Plant Physiol* 167, 862–869. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.01.018>
- Ryu, R., Patten, C., 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J Bacteriol* 190, 7200–7208. <https://doi.org/10.1128/JB.00804-08>

- Saber, K., Nahla, L., Ahmed, D., Chedly, A., 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agron Sustain Dev* 25, 389–393.
<https://doi.org/10.1051/agro:2005034>
- Saber, Z., Pirdashti, H., Heidarzade, A., 2013. Plant growth promoting rhizobacteria effects on yield and yield components of four rapeseed (*Brassica napus* L) cultivars under salt condition. *Int J Agri Crop Sci* 5, 1869–1873.
- Saharan, B., Nehra, V., 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sci Med Res* 2011, 1–30.
- Saïdi, S., Chebil, S., Gtari, M., Mhamdi, R., 2012. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. *World J Microbiol Biotechnol* 29, 1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1278-4>
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406–425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Saleh, S., Glick, B., 2001. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Can J Microbiol* 47, 698–705. <https://doi.org/10.1139/w01-072>
- Sánchez, A., Gutiérrez, R., Santana, R., Urrutia, A., Fauvert, M., Michiels, J., Vanderleyden, J., 2014. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *Eur J Soil Biol* 62, 105–112.
<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.03.004>
- Sarkar, A., Ghosh, P., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., Pandey, S., Mondal, M., Maiti, T., 2018. A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Res Microbiol* 169, 20–32.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.005>
- Sarr, P., Yamakawa, T., Fujimoto, S., Saeki, Y., Hoang, T., Myint, A., 2009. Phylogenetic diversity and symbiotic effectiveness of root-nodulating bacteria associated with Cowpea in the South-West area of Japan. *Microbes Environ* 24, 105–112.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME08558>
- Sawana, A., Adeolu, M., Gupta, R., 2014. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front Genet* 5, 429–429.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
- Scales, B., Dickson, R., LiPuma, J., Huffnagle, G., 2014. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev* 27, 927–948.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14>
- Scheublin, T., Ridgway, K., Young, J., van der Heijden, M., 2004. Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl Environ Microbiol* 70, 6240. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6240-6246.2004>
- Scheublin, T., Van Der Heijden, M., 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize nonfixing root nodules of several legume species. *New Phytol* 172, 732–738.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01858.x>
- Schlesinger, W., Bernhardt, E., 2013. *Biochemistry: an analysis of global change*, 3rd ed. Academic Press, Elsevier.
- Schønheyder, H., Jensen, K., Frederiksen, W., 1994. Taxonomic notes: synonymy of *Enterobacter cancerogenus* (Urosević 1966) Dickey and Zumoff 1988 and *Enterobacter taylora* Farmer et al. 1985 and resolution of an ambiguity in the

- biochemical profile. *Int J Syst Bacteriol* 44, 586–7.
<https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-586>
- Schrey, S., Tarkka, M., 2008. Friends and foes: Streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 11–9.
<https://doi.org/10.1007/s10482-008-9241-3>
- Schwartz, A., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C., Fujishige, N., Vijanderan, J., Diener, A., DeMason, D., 2013. *Bacillus simplex*—A little known PGPB with anti-fungal activity—alters Pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agron* 3, 595–620.
<https://doi.org/10.3390/agronomy3040595>
- Schwyn, B., Neilands, J., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160, 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., Overbeek, L., Brar, D., D van Elsas, J., Reinhold, B., 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol Plant Microbe Interact* 25, 28–36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>
- Sgroy, V., Cassan, F., Masciarelli, O., Del Papa, F., Lagares, A., Luna, M., 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 371–81.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2116-3>
- Shah, S., Li, J., Moffatt, B., Glick, B., 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 44, 833–43.
- Sharan, A., Shikha, Darmwal, N., 2008. Efficient phosphorus solubilization by mutant strain of *Xanthomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 3087–3090.
<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9807-2>
- Sharma, A., Johri, B., 2003. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol Res* 158, 243–248. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00197>
- Sharma, S., Kumar, V., Tripathi, R., 2011. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Sch Res Libr* 1, 90–95.
- Shiraishi, A., Matsushita, N., Hougetsu, T., 2010. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Syst Appl Microbiol* 33, 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.04.005>
- Shoebitz, M., Ribaudo, C., Pardo, M., Cantore, M., Ciampi, L., Cura, J., 2009. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 41, 1768–1774.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.031>
- Shukla, P., Agarwal, P., Jha, B., 2012. Improved salinity tolerance of *Arachishypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. *J Plant Growth Regul* 31, 195–206. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9231-y>
- Sims, J., Pierzynski, G., 2005. Chemistry of phosphorus in soil, in: *Chemical Processes in Soil*, 8. Madison, pp. 151–192.
- Singh, P., Shin, Y., Park, C., Chung, Y., 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathol* 89, 92–99.

- Singh, R., Runthala, A., Khan, S., Jha, P., 2017. Quantitative proteomics analysis reveals the tolerance of wheat to salt stress in response to *Enterobacter cloacae* SBP-8. *PloS One* 12, e0183513–e0183513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183513>
- Smil, V., 2001. *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production*. MIT Press, Cambridge.
- Smith, E., Dickson, S., Smith, F., 2001. Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: How are fungal and plant processes integrated? *Aust J Plant Physiol* 28, 685–696. <https://doi.org/10.1071/PP01033>
- Smith, G., Middleton, K., Edmonds, A., 1980. Sodium nutrition of pasture plants. I. Translocation of sodium and potassium in relation to transpiration rates. *Willey* 84, 603–612.
- Smith, M., Shoolery, J., Schwyn, B., Holden, I., Neilands, J., 1985. Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. *J Am Chem Soc* 107, 1739–1743. <https://doi.org/10.1021/ja00292a047>
- Song, O.-R., Lee, S.-J., Lee, Y.-S., Lee, S.-C., Kim, K.-K., Choi, Y.-L., 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol* 39, 151–156. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000030>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a001438. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31, 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Sperber, J., 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust J Agric Res* 9. <https://doi.org/10.1071/AR9580778>
- Sridevi, M., Mallaiah, K., Yadav, N., 2007. Phosphate solubilization by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. *J Plant Sci* 2, 635–639. <https://doi.org/10.3923/jps.2007.635.639>
- Steenhoudt, O., Vanderleyden, J., 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24, 487–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>
- Steenkamp, E., Stępkowski, T., Przymusiak, A., Botha, W., Law, I., 2008. Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. *Mol Phylogenet Evol* 48, 1131–1144. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.04.032>
- Steffensen, S., Poulsen, A., Mortensen, K., Sperling-Petersen, H., 1997. *E. coli* translation initiation factor IF2 – an extremely conserved protein. Comparative sequence analysis of the infB gene in clinical isolates of *E. coli*. *FEBS Lett* 419, 281–284. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01472-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01472-5)
- Stepanova, A., Hoyt, J., Hamilton, A., Alonso, J., 2005. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2230. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033365>
- Stephan, R., Van Trappen, S., Cleenwerck, I., Iversen, C., Joosten, H., De Vos, P., Lehner, A., 2008. *Enterobacter pulveris* sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 237–241. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65427-0>
- Stephan, R., VanTrappen, S., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., De Vos, P., Lehner, A., 2007. *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov., isolated from fruit powder. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 820–6. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64650-0>

- Sturz, A., Christie, B., Nowak, J., 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci* 19, 1–30. <https://doi.org/10.1080/07352680091139169>
- Suárez, R., Villarreal, A., Ramirez, M., Barraza, A., Del Carmen Orozco, M., Cevallos, M., Lara, M., Hernández, G., Iturriaga, G., 2008. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in Rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 958–66. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-7-0958>
- Subramanian, P., 2015. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. *Plant Growth Regul* 76, 327–332. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9993-x>
- Sulas, L., Muresu, R., Polone, E., Alberghini, S., Squartini, A., Tondello, A., Baldan, B., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Benguedouar, A., Benhizia, Y., Benhizia, H., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F., 2008. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol Ecol* 63, 383–400. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x>
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., Song, W., 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb Ecology* 55, 415–24. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9287-1>
- Swaby, R., Sperder, J., 1958. Phosphate dissolving microorganisms in the rhizosphere of legume, nutrition of legumes, in: *Proc Univ Nottingham 5th Eastern Sch Agril Sci Soils Fert*, (CSIRO Adelaide), pp. 289–294.
- Swamy, C., Gayathri, D., Devaraja, T., Bandekar, M., D’Souza, S., Meena, R., Ramaiah, N., 2016. Plant growth promoting potential and phylogenetic characteristics of a lichenized nitrogen fixing bacterium, *Enterobacter cloacae*. *J Basic Microbiol* 56, 1369–1379. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600197>
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., Dreyfus, B., 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* 183, 214–220. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.214-220.2001>
- Sy, A., Timmers, A.J., Knief, C., Vorholt, J., 2005. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl Environ Microbiol* 71, 7245–7252. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7245-7252.2005>
- Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., Barac, T., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of Poplar Trees. *Appl Environ Microbiol* 75, 748–57. <https://doi.org/10.1128/AEM.02239-08>
- Taghavi, S., van der Lelie, D., Hoffman, A., Zhang, Y., Walla, M.D., Vangronsveld, J., Newman, L., Monchy, S., 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet* 6, e1000943–e1000943. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000943>
- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pagès, S., Boemare, N., 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1921–37. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014308-0>

- Taiz, L., Zeiger, E., 2010. Plant physiology, 5th ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, USA.
- Tajini, F., 2012. Phosphorus use efficiency in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as related to compatibility of association among arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. *Afr J Microbiol Res* 11. <https://doi.org/10.5897/AJB12.603>
- Talboys, P., Owen, D., Healey, J., Withers, P., Jones, D., 2014. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biol* 14, 51–51. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-51>
- Tallapragada, P., Seshagiri, S., 2017. Application of bioinoculants for sustainable agriculture, in: Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. (Eds.), *Probiotics and Plant Health*. Springer Singapore, Singapore, pp. 473–495. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_22
- Tamagnini, L., Sousa, G., Gonzalez, R., Budde, C., 2008. Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese: influence of fluctuating storage temperature. *Small Rumin Res* 76, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.01.001>
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10, 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tang, Y., Bonner, J., 1948. The enzymatic inactivation of indole acetic acid. II. The physiology of the enzyme. *Am J Bot* 35, 570–578. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1948.tb08123.x>
- Tanwar, A., Aggarwal, A., Kadian, N., Gupta, A., 2013. Arbuscular mycorrhizal inoculation and super phosphate application influence plant growth and yield of *Capsicum annum*. *J Soil Sci Plant Nutr* 13, 55–66. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000006>
- Tarafdar, J., Claassen, N., 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plants roots and microorganisms. *Spinger-Verl* 5, 308–312. <https://doi.org/10.1007/BF00262137>
- Tarafdar, J., Jungk, A., 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biol Fert Soil* 3, 199–204. <https://doi.org/10.1007/BF00640630>
- Tariq, M., Hameed, S., Yasmeen, T., Zahid, M., Zafar, M., 2013. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World J Microbiol Biotechnol* 30, 719–725. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1488-9>
- Tavare, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences, in: Miura, R. (Ed.), *Some Mathematical Questions in Biology-DNA Sequence Analysis*. The American Mathematical Society, USA, pp. 57–86.
- Teale, W., Paponov, I., Palme, K., 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 847. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>
- Tester, M., Davenport, R., 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot* 91, 503–527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

- Timmusk, S., Wagner, E., 1999. The plant-growth-promoting Rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 951–959. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.951>
- Tindall, J., Sutton, G., Garrity, G., 2016. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 502–504. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001572>
- Tittabutr, P., Piromyong, P., Longtonglang, A., Noisa-Ngiam, R., Boonkerd, N., Teaumroong, N., 2013. Alleviation of the effect of environmental stresses using co-inoculation of mungbean by *Bradyrhizobium* and rhizobacteria containing stress-induced ACC deaminase enzyme. *Soil Sci Plant Nutr* 59, 559–571. <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.804391>
- TJAI, 2010. Cowpea: A versatile legume for hot, dry conditions. Thomas Jefferson Agricultural Institute (TJAI).
- Tomic, S., Gabdoulline, R., Kojic-Prodic, B., Wadw, R., 1998. Classification of auxin plant hormones by interaction property similarity indices. *J Comput Aided Mol Des* 12, 63–79.
- Torres, A., Araujo, W., Cursino, L., Hungria, M., Plotegher, F., Mostasso, F., Azevedo, J., 2008. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. *J Microbiol* 46, 373–379. <https://doi.org/10.1007/s12275-007-0165-9>
- Trémouillaux-Guiller, J., Rohr, T., Rohr, R., Huss, V., 2002. Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *Am J Bot* 89, 727–733. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.5.727>
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S., Netrusov, A., 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res* 162, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.014>
- Ulrich, K., Ulrich, A., Ewald, D., 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 63, 169–180. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00419.x>
- Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P., Martínez-Molina, E., Igual, J., Willems, A., 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1985–9. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63551-0>
- Van Bastelaere, E., De Mot, R., Michiels, K., Vanderleyden, J., 1993. Differential gene expression in *Azospirillum* spp. by plant root exudates: Analysis of protein profiles by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 112, 335–342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06472.x>
- Van Bastelaere, E., Lambrecht, M., Vermeiren, H., Van Dommelen, A., Keijers, V., Proost, P., Vanderleyden, J., 1999. Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Mol Microbiol* 32, 703–714. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01384.x>
- van Elsas, J., Nissinen, R., Männistö, M., 2012. Endophytic bacterial communities in three arctic plants from low arctic fell tundra are cold-adapted and host-plant specific. *FEMS Microbiol Ecol* 82, 510–522. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01464.x>
- Van Tiel-Menkveld, G.J., Mentjox-Vervuurt, J.M., Oudega, B., de Graaf, F.K., 1982. Siderophore production by *Enterobacter cloacae* and a common receptor protein for the uptake of aerobactin and cloacin DF13. *J Bacteriol* 150, 490–497.

- Vandamme, P., Coenye, T., 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2285–9. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63247-0>
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J., Curie, C., Lemanceau, P., 2007. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 441–7. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0441>
- Vardharajula, S., Ali, S., Grover, M., Reddy, G., Bandi, V., 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J Plant Interact* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1080/17429145.2010.535178>
- Velázquez, E., Martínez-Hidalgo, P., Carro, L., Alonso, P., Peix, Á., Trujillo, M., Martínez-Molina, E., 2013. Nodular Endophytes: An Untapped Diversity, in: Belén Rodelas González, M., Gonzalez-López, J. (Eds.), *Beneficial Plant Microbial Interactions: Ecology and Applications*. Boca Raton, FL : CRC Press/Taylor & Francis Group, pp. 215–236.
- Verdcourt, B., 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the “Flora of Tropical East Africa”: IV. *Kew Bull.* 24, 507–569. <https://doi.org/10.2307/4102859>
- Vessey, J., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Villegas, J., Fortin, A., 2011. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO. *Can J Bot* 80, 571–576. <https://doi.org/10.1139/b02-038>
- Vitousek, P., Aber, J., Howarth, R., Likens, G., Matson, P., Schindler, D., Schlesinger, W., Tilman, D., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecol Appl* 7, 737–750. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1997\)007\[0737:HAOTGN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0737:HAOTGN]2.0.CO;2)
- Volpin, H., 1996. Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial *nod*-gene inducers by alfalfa roots. *Mol Plant Microbe Interact* 9, 388. <https://doi.org/10.1094/MPMI-9-0388>
- Vorholt, J., 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 828.
- Wade, T., Le Quéré, A., Laguerre, G., N’Zoué, A., Ndione, J.-A., doRego, F., Sadio, O., Ndoye, I., Neyra, M., 2014. Eco-geographical diversity of cowpea Bradyrhizobia in Senegal is marked by dominance of two genetic types. *Syst Appl Microbiol* 37, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.10.002>
- Wadhams, G., Armitage, J.P., 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 1024–1037. <https://doi.org/10.1038/nrm1524>
- Walker, T., Bais, H., Grotewold, E., Vivanco, J., 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* 132, 44. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>
- Wall, D., Kaiser, D., 1999. Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 32, 01–10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01339.x>
- Walpolá, B., Arunakumara, K., 2016. Assessment of phosphate solubilization and indole acetic acid production in plant growth promoting bacteria isolated from green house soils of Gonju-Gun, South Korea. *Tropical Agricultural Research and Extension* 18, 31–39. <https://doi.org/10.4038/tare.v18i1.5322>
- Wang, H., Wang, L., Yang, Y., Lu, F., Ma, X., Xia, X., Jiang, J., 2015. *Enterobacter cloacae* infection after anterior cervical decompression and fusion: case study and literature review. *Int J Clin Exp Med* 8, 3438–3446.
- Wehner, J., Antunes, P., Powell, J., Mazukatow, J., Rillig, M., 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? *Pedobiologia* 53, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2009.10.002>
- Wekesa, C., Muoma, J., Ombori, O., Maingi, J., Okun, D., Juma, K., Okoth, P., Wamalwa, E., Kollenberg, M., Mauti, E., 2017. Genetic characterization of rhizosphere bacteria

- that inhabit common bean nodules in Western Kenya soils. *Appl Micro Open Access* 3. <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000128>
- Wekesa, C., Okun, D., Juma, K., Shitabule, D., Okoth, P., Nyongesa, P., Katoo, A., Mulamu, S., Wamalwa, E., Mahalo, C., Koyo, M., Rotich, A., Kawaka, F., Muoma, J., 2016. Abundance and symbiotic potential of common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodule associated bacteria in Western Kenya Soil. *J Agric Sci* 1, 1–9.
- Wenger, P., Tokars, J., Brennan, P., Samel, C., Bland, Miller, M., Carson, L., Arduino, M., Edelstein, P., Agüero, S., Riddle, C., O'Hara, C., Jarvis, W., 1997. An outbreak of *Enterobacter hormaechei* infection and colonization in an intensive care nursery. *Clin Infect Dis* 24, 1243–4.
- Wennstrom, A., 1994. Endophyte: the misuse of an old term. *Oikos* 71, 535–536.
- Westerfeld, C., Papaliodis, G., Behlau, I., Durand, M., Sobrin, L., 2009. *Enterobacter amnigenus* endophthalmitis. *Retin Cases Brief Rep* 3, 409–411. <https://doi.org/10.1097/ICB.0b013e31818a46c0>
- White, F., Ziegler, F., 1991. Cloning of the genes of Indoleacetic Acid synthesis from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 4, 207–210.
- Wilkins, M., Sanchez, J., Gooley, A., Appel, R., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D., Williams, K., 1996. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be Identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>
- Williams, R., Rimsky, S., 1997. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol Lett* 156, 175–185. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12724.x>
- Windstam, S., Nelson, E., 2008. Differential interference with *Pythium ultimum* sporangial activation and germination by *Enterobacter cloacae* in the corn and cucumber spermospheres. *Appl Environ Microbiol* 74, 4285–4291. <https://doi.org/10.1128/AEM.00263-08>
- Xiao, T., Yang, Q., Ran, W., Xu, G., Shen, Q., 2010. Effect of Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus on nitrogen and phosphorus utilization in upland rice-mungbean intercropping system. *Agr Sci Chi* 9, 528–535. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60126-7](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60126-7)
- Xie, H., Pasternak, J., Glick, B., 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr Microbiol* 32, 67–71. <https://doi.org/10.1007/s002849900012>
- Xu, L., Zhang, Y., Wang, L., Chen, W., Wei, G., 2014. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. *Syst Appl Microbiol* 37, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.05.009>
- Yadav, J., Verma, J., Tiwari, K., 2011. Solubilization of tricalcium phosphate by fungus at different carbon source and salinity. *Trends Applied Sci Res* 6, 606–613. <https://doi.org/10.3923/tasr.2011.606.613>
- Yadav, R., Tarafdar, J., 2003. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. *Soil Biol Biochem* 35, 745–751. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00089-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00089-0)
- Yadava, P., Kumar Bhuyan, S., Bandyopadhyay, P., Yadava, P., 2015. Extraction of proteins for two-dimensional gel electrophoresis and proteomic analysis from an endophytic fungus. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/protex.2015.084>
- Yadegari, M., Rahmani, H., Noormohammadi, G., Ayneband, A., 2008. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. *Pak J Biol Sci* 11, 1935–1939. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1935.1939>

- Yang, J., Kloepper, J., Ryu, C., 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* 14, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Yates, J., Speicher, S., Griffin, P., Hunkapiller, T., 1993. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem* 214, 397–408. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1514>
- Yi, Y., Huang, W., Ge, Y., 2008. Exopolysaccharide: A novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 1059–1065. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9575-4>
- Young, J., Park, D., 2007. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial *atpD*, *carA*, and *recA* as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.03.002>
- Yuk, K., Kim, Y., Huh, C., Lee, J., 2018. *Lelliottia jeotgali* sp. nov., isolated from a traditional Korean fermented clam. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 1725–1731. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002737>
- Yura, T., Ishihama, A., 1979. Genetics of bacterial RNA Polymerases. *Annu Rev Genet* 13, 59–97. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.13.120179.000423>
- Zhang, Y., Qiu, S., 2015. Examining phylogenetic relationships of *Erwinia* and *Pantoea* species using whole genome sequence data. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108, 1037–1046. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0556-6>
- Zhu, B., Lou, M., Xie, G., Wang, G., Zhou, Q., Wang, F., Fang, Y., Su, T., Li, B., Duan, Y., 2011. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2769–74. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.028613-0>
- Zhu, B., Zhou, Q., Lin, L., Hu, C., Shen, P., Litao, Y., An, Q., Xie, G., Li, Y., 2013. *Enterobacter sacchari* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane (*Saccharum officinarum* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 2577–82. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.045500-0>
- Zhu, F., Qu, L., Hong, X., Sun, X., 2011. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* 2011, 615032. <https://doi.org/10.1155/2011/615032>
- Zilli, J., Passos, S., Leite, J., Xavier, G., Rumjanek, N., Simoes-Araujo, J., 2015. Draft genome sequence of *Microvirga vignae* strain BR 3299T, a novel symbiotic nitrogen-fixing Alphaproteobacterium isolated from a Brazilian semiarid region. *Genome Announc* 3, e00700-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00700-15>
- Zuo, Y., Zhang, F., 2011. Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant Soil* 339, 83–95. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0566-0>
- Γαλάτης, Β., Γανωτάκης, Δ., Γκανή-Σπυροπούλου, Κ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Κοτζαμπάσης, Κωσταντινίδου, Ε., Μανέτας, Ι., Ρουπελάκη-Αγγελικάκη, Κ., 2014. Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Κυριαζής, Ι., Καμπούρης, Μ., Πατρινός, Γ., 2014. Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών. *Arch Hell Med* 31, 23–40.