

Fizjologiczna charakterystyka bakterii z rodzaju *Azospirillum*

Maria J. Król

*Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Osada Pałacowa, 24-100 Puławy*

Słowa kluczowe: ryzosfera, *Azospirillum*, asocjacja, ściana komórkowa, fitohormony, źródła węgla, PHB, adaptacja w środowisku

Wstęp

Do najbardziej znanych bakterii wolno żyjących, wiążących wolny azot, należą bakterie z rodzaju *Azospirillum*, które w ciągu ostatnich kilkunastu lat są znowu przedmiotem wzrastającego zainteresowania [12, 17, 21, 22, 23, 26, 28, 40]. Żyją one w asocjacji z korzeniami wielu roślin o dużym znaczeniu gospodarczym (np. wszystkie zboża i trawy), uprawianych zarówno w klimacie umiarkowanym, jak i tropikalnym na całym świecie. Bakterie te mają zdolności nie tylko wiązania azotu atmosferycznego, ale również wytwarzania substancji wzrostowych, które powodują lepszy rozwój i rozgałęzianie systemu korzeniowego, a w związku z tym usprawnienie gospodarki wodnej i pobierania soli mineralnych przez roślinę. Dzięki tym właściwościom mogą wpływać na zwiększenie plonów.

Po raz pierwszy zostały one opisane w 1925 r. przez Beijerincka jako *Spirillum lipoferum*. Dopiero w 1974 r. Döbereiner i Day [9] wyizolowali je z korzeni tropikalnych traw w Brazylii. W Polsce po raz pierwszy prace nad bakteriami z rodzaju *Azospirillum* zostały podjęte na SGGW w roku 1975 przez Kulińską [28], która wcześniej pracowała w Zakładzie Mikrobiologii (w Instytucie EMBRAPA-CNPAB) w Rio de Janeiro u Döbereiner w Brazylii. Następnie w 1978 r. Tarand i in. [44], na podstawie składu zasad i homologii DNA, utworzyli rodzaj *Azospirillum*, do którego zaliczyli dwa gatunki: *A. brasilense* i *A. lipoferum* [44]. Początkowo bakterie te uważane były za typowe bakterie związane z klimatem tropikalnym, dopóki nie zostały wyizolowane w Finlandii w 1981 roku [13].

W 1983 r. Magalhaes i in. [31] wyizolowali z korzeni traw i palm rosnących w Amazonii następny gatunek *A. amazonense*, charakteryzujący się dużą tolerancją

na kwaśny odczyn środowiska. Później został jeszcze jeden – *A. serpoedicae*, wydzielony z korzeni zbóż (pszenica, sorgo ryż). Jednak po przeprowadzeniu analizy homologii DNA-rRNA przeniesiono go w 1986 roku do nowego rodzaju *Herbaspirillum* jako *H. serpoedicae*. Cztery lata później Reinhold i in. [36] wyizolowali z korzeni trawy *Leptochloa fusca* z zasolonych gleb Pakistanu (prowincja Punjab) – *Azospirillum halopraeferens*.

Piąty gatunek – *Azospirillum irakense* – wyizolowali z korzeni ryżu w prowincji Diwaniyah (Qadisya), w Iraku, w 1989 r. Khammas i in. [20].

W 1997 roku Ben Dekhil i in. [7], na podstawie filogenetycznej analizy przez porównanie sekwencji 16S rDNA i wcześniejszych badań hybrydyzacji kwasów nukleinowych, przenieśli gatunek z rodzaju *Conglomeromonas* – *C. largomobilis*, wyizolowany z wody w Australii, do rodzaju *Azospirillum*, pod nazwą *A. largomobile* [41]. Następnie nazwa ta (*A. largomobile*) została skorygowana przez Sly'ego i Stackebrandta [42] i obecnie znana jako *A. largimobile*.

Ostatni gatunek – *A. doebereineriae* został wyizolowany przez Eckert w 2000 roku [11] z ryzosfery trawy (C4) *Miscanthus sinensis* cv. uprawianej w Niemczech (Neuherberg).

Morfologia

Do rodzaju *Azospirillum* należą bakterie: Gram-ujemne, ruchliwe, w kształcie przecinka, litery S lub spirali, urzęsione. Szerokość ich wynosi około 1 μm . Cechą charakterystyczną wszystkich gatunków, z wyjątkiem *A. brasilense*, jest pleomorfizm. W podłożach płynnych wytwarzają jedną polarną rzęskę, na podłożach stałych, z wyjątkiem *A. amazonense* i *A. halopraeferens*, liczne rzęski lateralne, tworzą formy cystopodobne w starych hodowlach. Rzęski polarne, długości około 1,2 μm i szerokości wraz z osłonką 18 μm , odpowiedzialne są za ruch w podłożach płynnych; lateralne, krótsze (0,7 μm) i cieńsze (13,5 μm), pozbawione osłonki, służą jako organella lokomocji na podłożach stałych. Trzy gatunki bakterii z tego rodzaju – *A. amazonense*, *A. halopraeferens* i *A. doebereineriae* – tworzą tylko jedną rzęskę polarną [11, 36]. Charakterystykę różniącą gatunki w obrębie rodzaju *Azospirillum* przedstawiono w tabeli 1.

Bakterie te gromadzą wewnątrzkomórkowo poli- β -hydroksymaśłany (PHB) – *A. brasilense* i *A. lipoferum*, lub polihydroksyalkanoniany (PHA) – *A. brasilense*, nie tworzą śluzu [44].

W starszych hodowlach *A. lipoferum* i *A. brasilense*, opornych na wysuszenie i temperaturę, spotyka się obecność nieruchliwych, powiększonych form pleomorficznych, zwanych ciałami kulistymi lub formami C – „cocoid bodies” lub „c-forms” [44]. Formy te są owalne i silnie załamują światło, szerokość ich wynosi około 2,5 μm , a długość od 3 do 15 μm . Zawierają one otoczkę polisacharydową, a w środku liczne granule kwasu poli- β -hydroksymaśłowego. Cystopodobne formy nie występują

Tabela 1. Fizjologiczne różnice między gatunkami bakterii z rodzaju *Azospirillum* [11, 17, 18, 28, 36, 44, 54]

Cecha	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. largimobile</i>	<i>A. amazonense</i>	<i>A. halopraeferens</i>	<i>A. irakense</i>	<i>A. doebereineriae</i>
Szerokość komórki [μm]	1,0–1,5	1,0–1,2	0,7–1,5	0,8–1,0	0,7–1,4	0,6–0,9	1,0–1,5
Pleomorfizm	+	-	+	+	+	+	+
Obecność rzęski polarnej	+	+	+	+	+	+	+
Obecność rzęsek lateralnych	+	+	+	-	-	+	-
Optymalna temperatura wzrostu [$^{\circ}\text{C}$]	37	37	28	35	41	33	33
Wzrost i wiązanie N_2 w podłożu:							
pH 7,5	+	+	+	-	+	+	+
pH 6,0	+	+	+	+/-	+	+	+
Wzrost w obecności 3-procentowy NaCl	-	-	-	-	+	+	-
Zapotrzebowanie na biotynę	+	-	-	-	+	-	-
Wytwarzanie kwasu (beztlenowo)							
D-glukozy	+	-	-	-	-	-	d
D-fruktozy	+	-	+	-	+	-	+
Denitryfikacja	+/-	+/-	-	-	+	-	+
Skład DNA [mol% G + C]	69–70	70–71	70	67–68	69–70	64–67	69,6

w hodowlach bulionowych tylko na podłożu półpłynnym i stałym, szczególnie powstawanie form stymuluje dodatek do podłoża fruktozy i azotanów. Proces ten u *A. brasilense* sprzężony jest z wytwarzaniem brązowocznego barwnika melaninowego, wydzielanego do podłoża, który prawdopodobnie chroni komórki bakterii przed szkodliwym działaniem promieni słonecznych.

Budowa ściany komórkowej

Ściana komórek bakterii Gram-dodatnich ma przeważnie około 50 nm i jest złożona z peptydoglikanu i kwasu teichoowego. Natomiast powierzchnia ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych jest bardziej złożona, ponieważ oprócz warstwy peptydoglikanu (PG) zawiera białka, tłuszcze i lipopolisacharyd (LPS) i lipoproteinę (LP). Składnikami peptydoglikanu, czyli sztywnej warstwy R (rigid layer), są N-acetyloglukozamina i kwas N-acetylmuraminowy, połączone wiązaniem β (1, 4). U bakterii Gram-ujemnych peptydoglikan nie przekracza 10% składników ściany.

Kwasy tłuszczowe wchodzące w skład membrany lipidowej, jako materiał budulcowy fosfolipidów, glikolipidów i glikofosfolipidów, mogą być używane do klasyfikacji szczepów bakterii [16]. Ostatnio stosuje się kwasy tłuszczowe jako biomarkery w badaniach stanu zanieczyszczenia środowiska, ponieważ występują w komórkach bakteryjnych w stałej ilości w stosunku do ich biomasy, są szybko rozkładane po śmierci komórki oraz nie są składnikami zanieczyszczeń antropogenicznych. Skład kwasów tłuszczowych u bakterii jest bardzo zróżnicowany. Oprócz kwasów prostolącuchowych nasyconych i nienasyconych powszechnie u bakterii w fosfolipidach występują kwasy rozgałęzione – zarówno u bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich, cyklopropanowe (np. *Lactobacillus* sp.) i hydroksykwas, np. kwas poli- β -hydroksymaślowy [16]. Kwasy tłuszczowe utrzymują integralną strukturę błony, wpływając na jej przepuszczalność; wzrost ilości nienasyconych kwasów zwiększa płynność błony i nasila procesy dyfuzyjne, natomiast wzrost ilości rozgałęzionych kwasów i cyklopropanowych wzmacnia strukturę błony i obniża jej przepuszczalność.

A. brasilense i *A. lipoferum* mają podobnie zbudowane kwasy tłuszczowe, natomiast *A. amazonense* i *A. halopraeferens* różnią się zasadniczo od każdego z nich.

Podobnie jak wszystkie bakterie Gram-ujemne, tak samo ściana komórkowa *Azospirillum* spp. zawiera zewnętrzną kilkuwarstwową membranę, wewnętrzną membranę cytoplazmatyczną i przestrzeń peryplazmatyczną przepuszczającą między nimi elektrony. Membrana cytoplazmatyczna chroni enzymy powstające w tlenowym i beztlenowym oddychaniu, jak również chroni powstałą energię oraz ogranicza wszelki transport membranowy [14]. Przestrzeń peryplazmatyczna posiada enzymy (np. hydrolazy, fosfatazy), uczestniczące w reakcjach katabolicznych, i białka wiążące komponenty, wysoko spokrewnione z procesami takimi jak transport glicyny.

Fosfolipidowa dwuwarstwowa zewnętrzna membrana jest połączona z warstwą peptydoglikanu. Stwierdzono u *A. brasilense* R6, że białko znajdujące się na zewnątrz

membrany, o wadze 42-kDa, które zawiera około 60% całego białka, jest dołączone – ale nie kowalencyjnie – z kwasem muraminowym [1]. U *A. brasilense* Sp7, po stronie zewnętrznej membrany, znaleziono białko kwaśne o wadze około 40-kDa. Białka te mogą funkcjonować jako podjednostki na zewnątrz przestrzeni membranowych. Opisano także mniejsze białko, o wadze molekularnej od 15 do 90 kDa [1]. W warunkach ograniczonego żelaza mogą być indukowane cztery białka o wadze od 72 do 87 kDa, które prawdopodobnie funkcjonują jako specyficzny receptor systemu transportu sideroforów, co jest znane u bakterii Gram-ujemnych. Białko o wadze molekularnej 85 kDa i nieznannej funkcji znaleziono także na zewnątrz membrany na powierzchni komórki.

Lipopolisacharydy (LPS) są umieszczone w dwuwarstwowej fosfolipidowej zewnętrznej membranie, umożliwiając one identyfikację serologiczną gatunku przy stosowaniu przeciwciał poli- lub monoklonalnych.

U szczepów bakterii *A. brasilense* i *A. lipoferum* stwierdzono występowanie kwaśnych egzopolisacharydów (EPS). Prace nad tymi polisacharydami są prowadzone ze względu na funkcję, jaką odgrywają przy rozpoznawaniu i przyciąganiu bakterii przez powierzchnię włókników korzeniowych. Wyizolowano mutanty *A. brasilense* i *A. lipoferum*, hodowane na pożywce „Congo-red”, które miały uszkodzoną syntezę egzopolisacharydów (EPS) i również były niezdolne do wytwarzania form C. Pewne szczepy tego gatunku hodowane na pożywce z fruktozą, jako źródłem węgla, wytwarzały grubą błonę tzw. torebkowych polisacharydów (CPS), która prowadziła do formowania cyst lub form C [37]. Glikoproteiny o wadze 97 kDa, powodujące aglutynację komórek, przyciąganie ich i adsorpcje na korzeniach siewek pszenicy, zostały znalezione u *A. brasilense* Cd. Aglutynacja ta była hamowana przez D-glukozę, melobiozę i alfa-metylo glukozyd. Przyciąganie i adsorpcja komórek *A. brasilense* do korzeni siewek pszenicy wydaje się zależeć od powierzchniowego składu białek rzęski polarnej, tj. lektyn – wiązania wapniowo-fluorowego na powierzchni polisacharydów.

Asocjacja *Azospirillum*

Azospirillum spp. żyjące w asocjacji [47] z korzeniami wielu roślin wykazuje największą aktywność po wnikięciu komórek bakterii do głębszych warstw korzenia. Środowisko wewnątrz korzenia w porównaniu z glebą dobrze chroni bakterie, zabezpieczając je przed suszą czy mrozem i sprawiając, że *Azospirillum* może z powodzeniem konkurować z innymi bakteriami o źródło energii i węgla.

Zjawisko powstawania takich układów zostało odkryte przez Döbereiner i Campelo [10]. W wypadku *Azospirillum* nie wykryto jednak ścisłej specyficzności, a jedynie powinowactwo szczepów do ich gospodarzy. *A. lipoferum* wykazuje powinowactwo głównie w stosunku do roślin o typie fotosyntezy C-4, takich jak: trawy tropikalne, kukurydza czy sorgo, podczas gdy *A. brasilense* wykazuje je wobec roślin o typie fotosyntezy C-3, takich jak: pszenica, żyto, owies, jęczmień i ryż.

Bashan i Holugin [4], którzy kolonizowali *A. brasilense* korzenie 64 gatunków różnych roślin, donoszą o niespecyficzności tej bakterii w stosunku do roślin. Badania nad rozmieszczeniem *Azospirillum* w korzeniach roślin wykazały, że bakterie te przylegają do ziarnistości na włosnikach korzeniowych. Następnie przenikają do wnętrza i układają się w przestrzeniach międzykomórkowych wzdłuż kory.

Wytwarzanie fitohormonów

Synteza fitohormonów u bakterii z rodzaju *Azospirillum* jest niezbędna do wytwarzania trwałych asocjacji z korzeniami roślin. Hormony roślinne powodują podział i różnicowanie komórek w merystematycznej tkance korzenia, wskutek czego następuje wydłużanie się korzenia, produkowanie większej liczby włosników i rozgałęzianie się ich. Niewykluczone też, że na skutek kolonizacji korzeni przez bakterie i wytwarzania fitohormonów – sama roślina zostaje pobudzona do wydzielania substancji stymulujących wzrost [45].

W 1979 roku stwierdzono u *A. brasilense* wytwarzanie auksyn oraz substancji podobnych do cytokinin i giberelin [45]. Obserwowano zwiększenie liczby włosników korzeniowych i korzeni bocznych po zaszczepieniu roślin mieszkanką kwasu indolilo-3-octowego, kinetyną i kwasem giberelinowym GA₃, otrzymaną z tych bakterii.

Auksyny. W płynnych kulturach *A. brasilense*, zawierających w pożywce tryptofan, stwierdzono metodą chromatograficzną wytwarzanie kwasu indolilo-3-octowego [45]. Zimmer i Bothe [46] wykryli również niezidentyfikowaną substancję fitohormonalną o dwukrotnie wyższej aktywności niż kwas indolilo-3-octowy (IAA). Autorzy ci sugerują, że wytwarzanie fitohormonów jest szczepowo specyficzne i zależne od fazy rozwojowej bakterii, a także od pH środowiska glebowego. Stwierdzono, że najwyższe stężenie IAA w glebie było przy pH 6,3 [34]. Wydaje się, że *Azospirillum* spp. jest aktywniejszym „producentem” IAA niż wiele innych bakterii glebowych [49].

Dla bakterii z rodzaju *Azospirillum* spp. sugerowano obecność w genomie kilku kopii genów kodujących enzymy uczestniczące w biosyntezie IAA oraz więcej niż jeden cykl syntezy IAA. Wśród mikroorganizmów są znane dwa cykle syntezy kwasu indolilo-3-octowego:

1. W pierwszym cyklu, opisanym dla fitopatogena *Pseudomonas syringae* i dla *Agrobacterium tumefaciens* uszkadzającego komórki roślinne, tryptofan (Trp) jest początkowo przekształcany w indolo-3-acetamid (IAM) przez monooksygenazę tryptofanową [50]. Następny etap to katalizowanie IAA przez hydrolazę IAM. W badaniach stwierdzono, że szczepy *A. brasilense*: Cd i również szczep Sp7, nie były zdolne do wytwarzania produktów pośrednich między IAM a IAA [50].
2. W drugim cyklu tryptofan (Trp) jest przekształcany do indolo-pirogronianu (Ipyr) przez aminotransferazy. Następny etap to dekarboksylacja indolo-pirogronianu do indolo-acetaldehydu (IAAld) i oksydacja do IAA.

Mechanizm syntezy IAA przypuszczalnie jest aktywowany w momencie dostarczenia bakteriom tryptofanu [62]. Antranilany pośredniczące w biosyntezie i degra-

dacji tryptofanu wydają się mieć właściwości hamowania biosyntezy IAA u *A. irakense* KA3. Jest całkiem możliwe, że regulacja biosyntezy IAA może być różna wśród szczepów bakterii z rodzaju *Azospirillum*.

Cytokininy. Substancje podobne do cytokinin były znalezione również u bakterii z rodzaju *Azospirillum* [45]. Stwierdzono, że zarówno *A. brasilense*, jak i *A. lipoferum* wytwarzają cytokininy [49]. Z supernatantu 10-dniowych kultur *A. brasilense* Sp13t otrzymano frakcję butanolową, która miała właściwości podobne do cytokinin, jakie obserwowano, gdy zastosowano kinetyny w ilości ($1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$). Substancje cytokiniopodobne często mogą powstawać przy degradacji kwasów nukleinowych w starych hodowlach bakterii.

Gibereliny. W hodowlach bakterii z rodzaju *Azospirillum* stwierdzono niewielkie ilości giberelin. Wytwarzanie substancji giberelinopodobnych było potwierdzone u szczepu *A. brasilense* Sp13t, ponieważ ekstrakty otrzymane z supernatantu powodowały elongacje hipokotyli sałaty. Elongacja hipokotyli jest często również stymulowana przez auksyny. Metodą chromatografii gazowej i spektrometrycznej znaleziono w kulturach *A. lipoferum* op33 gibereliny A1, A3 i izo-A3 w koncentracji od 20 do $40 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ [8].

Inne substancje wzrostowe. Azotyny w stężeniu od 0,1 do 10,0 mM mogą powodować podobne efekty do kwasu indoliloctowego (IAA), co zostało zaobserwowane podczas testu z roślinami [49]. Efekt azotynów może być zwiększony przez dodatek askorbinianów – to by sugerowało, iż azotyny w komórkach roślinnych wchodzi w interakcje z askorbinianami. Prace badawcze ujawniły, że głównie azotyny powodują zwiększenie korzeni bocznych pszenicy – efekt, którego nie można otrzymać, kiedy azotyny są zastąpione przez azotany, amoniak czy siarczki.

Fizjologia

Wykorzystywanie źródeł węgla i ich rozkład metaboliczny

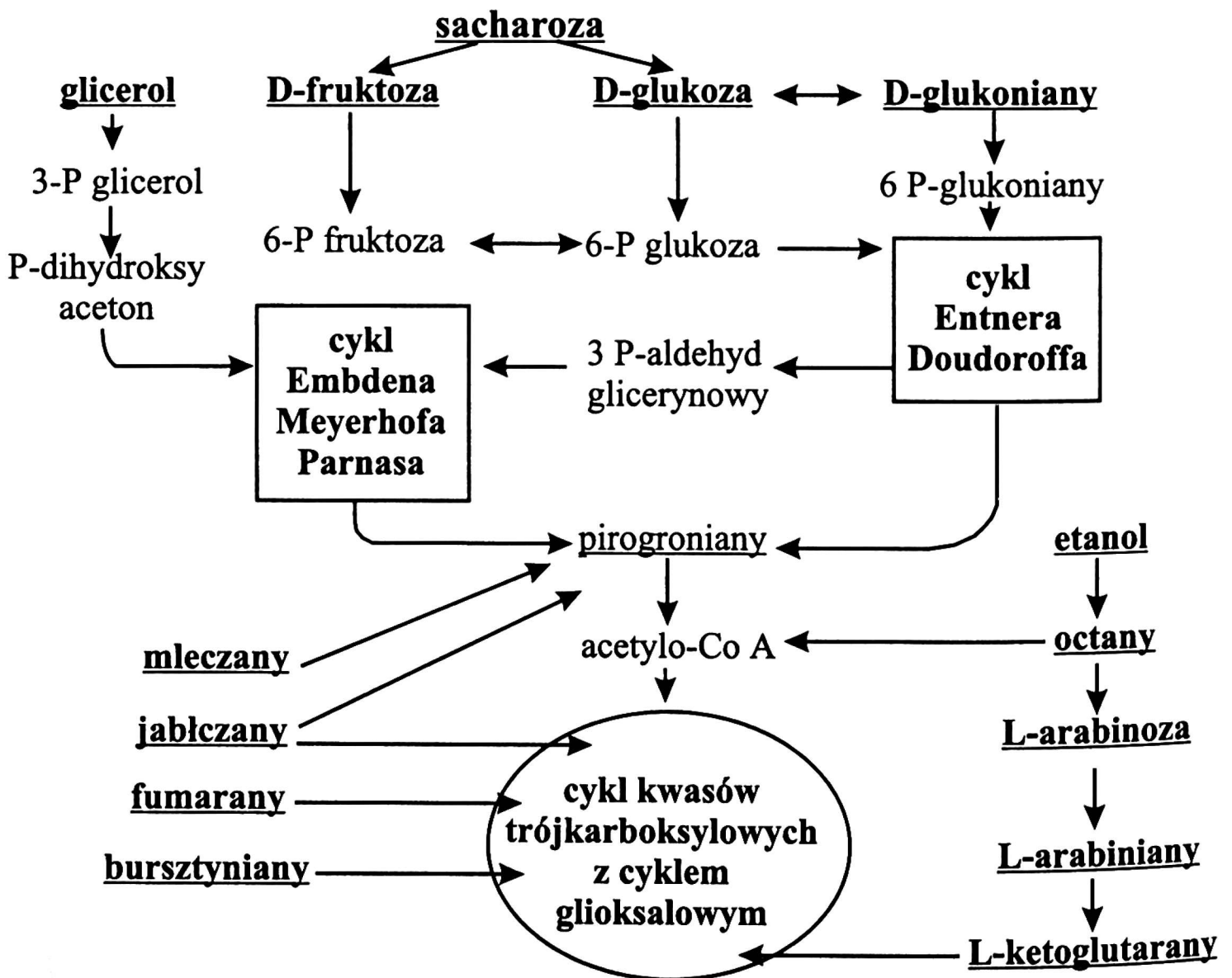
Bakterie tlenowe i liczne bakterie względnie beztlenowe w obecności tlenu oddychają tlenowo. Jeden z mechanizmów oddychania tlenowego przebiega przez glikolizę (cykl Embdena-Meyerhofa-Parnasa). Glikoliza jest łańcuchem reakcji przekształcających glukozę w pirogronian z jednoczesną produkcją ATP. Następnym etapem wytwarzania energii z glukozy w warunkach tlenowych jest oksydacyjna dekarboksylacja pirogronianu do acetylokoenzymu A (acetylo-CoA). Aktywowany acetyl jest kompletnie utleniany do CO_2 w serii reakcji, zwanych cyklem kwasów trójkarboksylowych albo cyklem Krebsa lub inaczej jeszcze cyklem cytrynowym.

Cykl Krebsa jest końcowym, wspólnym szlakiem utleniania cząsteczek materiału energetycznego – aminokwasów, kwasów tłuszczowych i węglowodanów. Większość tych związków wchodzi do cyklu pod postacią acetylo-CoA. Cykl ten dostarcza także pośrednich metabolitów do biosyntezy. Reakcje cyklu kwasu cytrynowego prze-

biegają wewnątrz mitochondriów w przeciwieństwie do reakcji glikolizy, przebiegających w cytozolu (część płynna cytoplazmy).

U wielu bakterii oddychanie odbywa się poprzez cykl Krebsa, u innych jednak zachodzi poprzez cykl pentozowy lub cykl Entnera-Doudoroffa. Cykl pentozowy poprzez związki trójwęglowe (aldehyd glicerynowy) może łączyć się z cyklem kwasów trójkarboksylowych. W cyklu Entnera-Doudoroffa glukoza po fosforylacji podlega procesom odwodorowania bez rozbicia cząsteczki, w wyniku czego powstaje kwas 2-keto-3-dezoksy-6-fosfoglukonowy. Ten z kolei rozpada się na kwas pirogronowy i aldehyd 3-fosfoglicerynowy. Produkty te mogą się następnie włączyć do dalszych przemian oksydoredukcyjnych w cyklu Krebsa lub cyklu pentozowym.

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* są względnymi heterotrofami wykorzystującymi różne cukry, alkohole, kwasy organiczne i ich sole: jabłczan, bursztynian, mleczan i pirogronian. Wykorzystanie różnych źródeł węgla przez gatunki *Azospirillum* przedstawiono w tabeli 2 i na rysunku 1. Wszystkie aktywne enzymy katabolicznego cyklu glikolizy (Embdena-Meyerhofa-Parnasa), cyklu Entnera-Doudoroffa i kwasów trójkarboksylowych (Krebsa) znaleziono u bakterii z rodzaju *Azospirillum* [15]. Jakkolwiek



Rysunek 1. Degradacja związków węgla: cukrów, alkoholi i kwasów organicznych przez *Azospirillum*. Związki podkreślone są używane w reakcjach katabolicznych przez *A. brasilense*, *A. lipoferum* i *A. amazonense* [15]

Tabela 2. Wykorzystanie źródeł węgla przez gatunki bakterii z rodzaju *Azospirillum* wg testów API20 NE i API50 CHE [11, 17, 18, 28, 36, 44, 54]

Wykorzystywane źródło węgla	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. largimobile</i>	<i>A. amazonense</i>	<i>A. halopraeferens</i>	<i>A. irakense</i>	<i>A. doebereineriae</i>
N-acytoglukozamina	+	-	+	d	nd	+	-
D-glukoza	+	d	+	+	-	+	d
L-arabinoza	+	v	+	+	v	+	+
D-celobioza	-	-	-	+	nd	+	+
D-fruktoza	+	+	+	+	+	v	+
L-fukoza	v	-	+	+	nd	+	nb
D-galaktoza	+	d	+	+	-	+	nb
Gentobioza	-	-	+	+	nd	+	+
D-glukoniany	+/-	+	-	-	nd	-	+
Glicerol	+	+	+	-	+	-	+
Mioinozytol	-	-	-	+	nd	-	-
Laktoza	-	-	-	v	nd	+	+
D-lyksoza	-/+	-	-	-	-	-	+
Maltoza	-	-	-	+	nd	+	+
D-mannitol	+	-	+	-	+	-	-
D-mannoza	v	-	-	+	+	+	+
L-ramnoza	-	-	-	v	nd	+	+
D-ryboza	+	-	+	+	+	d	-
D-sorbitol	+	-	+	-	-	-	+
Sacharoza	-	-	nd	+	-	+	+
D-trehaloza	-	-	-	+	-	+	+
Hydroliza eskuliny	+	+	+	+	+	+	+
Hydroliza pektyny	-	-	-	-	-	+	+

+ pozytywne dla wszystkich szczepów, - negatywne dla wszystkich szczepów, d - zmienne dla wszystkich szczepów, v - słabe, nd - nie określono.

u szczepów bakterii *A. brasilense* Sp7 i *A. lipoferum* Sp59 niska aktywność 6-fosfofruktokinazy wskazuje, że glikoliza nie jest bezpośrednio używana przez te szczepy bakterii w reakcjach katabolicznych. Nieobecność NADP^+ w reakcjach, zależnego od dehydrogenazy 6-fosfoglukonowej, wskazuje również na nieobecność cyklu pentozowego.

W podłożach półpłynnych, bezazotowych z glukozą dobrze rosną wszystkie gatunki z wyjątkiem *A. halopraeferens*. Niektóre szczepy *A. brasilense*, pomimo że mają wszystkie enzymy do degradacji glukozy, to nie wykorzystują jej jako jedyne źródła węgla, ale natomiast łatwo degradują takie polimery, jak ksylan, celulozę i skrobię, których jest pod dostatkiem w ryzosferze roślin [24, 44]. Niektóre szczepy tego gatunku mogą rozkładać jeszcze arabinozę i galaktozę. Natomiast fruktoza jest bardzo dobrym źródłem węgla dla wszystkich gatunków.

Laktoza jest wykorzystywana jako jedyne źródło węgla i energii tylko przez dwa gatunki, *A. irakense* i *A. doebereinaerae*.

Metabolizowanie sacharozy jest cechą charakterystyczną tylko dla gatunków: *A. amazonense*, *A. irakense* i *A. doebereinaerae*. W warunkach tlenowych niektóre szczepy zakwaszają podłoża cukrowe – np. *A. lipoferum* na podłożu peptonowym z glukozą, natomiast w beztlenowych wywołują ich fermentację. Szczepy bakterii *A. lipoferum* i *A. largimobile* w tych warunkach zakwaszają podłoża z glukozą i fruktozą, a *A. halopraeferens* – tylko z fruktozą.

Wszystkie gatunki bakterii z rodzaju *Azospirillum* rosną dobrze i wiążą wolny azot w obecności kwasów organicznych i ich soli, jak również wykorzystują różne cukry (tab. 2), co było wyżej wymienione, ale tylko jeden gatunek – *A. irakense* – może wiązać N_2 , wykorzystując pektynę jako jedyne źródło węgla [20, 27]. Liazy polisacharydowe są grupą enzymów, które degradują łańcuchy polisacharydowe w roślinnej ścianie komórkowej. Wśród nich najważniejsze są liazy pektynianowe [6], które odgrywają ważną rolę w rozwoju chorób korzeniowych roślin.

Stwierdzono również, że szczepy tych bakterii asymilują różne alkohole: glicerol, mannitol, sorbitol, arabitol, dulcitol, ksylitol i inozytol (tab. 2) [11], jak również mogą rosnąć w pożywkach z metanolem lub innymi związkami jednowęglowymi [39].

Niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum* mogą wykorzystywać jako jedyne źródło węgla i energii przy wiązaniu N_2 wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), takie jak: antracen, naftalen i fenantren [29]. Z korzeni pszenicy, kukurydzy i trawy (*Digitaria decumbens*) wyizolowano szczepy bakterii *Azospirillum brasilense* i *Azospirillum lipoferum*, które były zdolne do degradacji fenolu i benzoesanów [3]. Również wiadomo od dawna, że niektóre szczepy bakterii z tego rodzaju [33] mogą rozkładać herbicydy (np. karbofuran, tiobenkarb).

Wykorzystywanie różnych źródeł węgla przez te bakterie jest uwzględniane między innymi przy określaniu przynależności szczepów do gatunku. Niektóre szczepy bakterii wymagają do wzrostu obecności w podłożu witamin, biotyny (tab. 1) i pirydoksyny oraz pierwiastków śladowych [30, 36].

Synteza węglowodanów

Azospirillum jest zdolne do wzrostu na podłożach zawierającymi nie tylko kwasy organiczne, takie jak np. jabłczan, ale również do wzrostu autotroficznego z CO₂, jako źródłem węgla, i H₂ – jako źródłem energii. Wiązanie CO₂ jest katalizowane przez cykl Calvina. Powstające w procesach świetlnych NADPH i ATP są wykorzystywane do redukcyjnego przekształcenia CO₂ w węglowodany w serii reakcji zwanych cyklem Calvina. Pierwszym ich etapem jest redukcja CO₂ z rybulozodwufosforanem, prowadząca do utworzenia się dwóch cząsteczek 3-fosfoglicerynianu, co stwierdzono w chemolitoautotroficznym wzroście u *A. lipoferum* [39].

Formowanie i degradacja poli-β-hydroksymaślanów (PHB)

Podobnie do wielu innych bakterii, *Azospirillum* spp. są zdolne do gromadzenia wewnątrz komórek poli-β-hydroksymaślanów (PHB) jako rezerwowego węgla i źródła energii, wykorzystywanego w warunkach stresowych środowiska [19]. Stwierdzono, że komórki *A. brasilense* podczas wzrostu i wiązania azotu mogą zawierać powyżej 40% suchej biomasy PHB, a nawet może ona dochodzić do 88% przy wysokim stosunku C/N i ograniczonym stężeniu tlenu. W badaniach zaobserwowano, że raczej O₂ niż azot jest czynnikiem ograniczającym wytwarzanie poli-β-hydroksymaślanów.

Podczas wzrostu w warunkach beztlenowych, w hodowlach ciągłych przy ograniczonym dopływie jabłczanów, wytwarzanie PHB w komórkach *A. brasilense* wahało się od 1% do 40%, kiedy ograniczono ilość azotynów zamiast tlenu, jako jedyne akceptora elektronów [49]. Stąd można sugerować, że akumulacja PHB u *Azospirillum* spp. zależy od wysokiego poziomu NADH w komórce, gdyż pojawia się tylko wtedy, gdy tylko część celularnego NADH może być ponownie utleniona w łańcuchu oddechowym, ponieważ ogranicza akceptory elektronu [49]. Dehydrogenaza D(-)-β-hydroksymaślanu katalizuje przemianę β-hydroksymaślanu w acetoctan i jest uważana za kluczowy enzym uczestniczący w regulacji syntezy PHB. Zaobserwowano, że utlenianie β-hydroksymaślanu przez oczyszczony enzym otrzymany z komórek *A. brasilense* jest hamowane przez wysoką koncentrację NADH i NADPH [43], co już opisano wcześniej dla enzymów pochodzących z *Azotobacter vinelandii*. W surowych ekstraktach komórek *Azospirillum* spp., po 24 h ich głodowania, odnotowano zwiększoną aktywność dehydrogenazy D(-)-β-hydroksymaślanu i transferazy CoA, katalizujących przeniesienie CoA na acetoctan, oraz acetylotransferazy acetylo-CoA, kiedy PHB było rozkładane [43]. Ostatnio został zidentyfikowany gen u *A. brasilense* Sp7, który wykazywał wysoką homologię do genu u *Alcaligenes eutrophus phbB* i nie zawierał informacji genetycznej dla NADPH, podobnej do reduktazy acetoacetylo-CoA. Prawdopodobnie u bakterii z rodzaju *Azospirillum* PHB jest syntetyzowane przez kilka różnych reduktaz acetoacetylo-CoA [48].

Trzy geny: *phbA*, *phbB*, *phbC*, kodujące enzymy, które uczestniczą w metabolicznym cyklu PHB: β -ketiolaza, reduktaza acetoacetylu-CoA i syntetaza PHB, były zidentyfikowane w genomie u *A. brasilense* Sp7, a następnie sklonowane i sekwencjonowane [18]. Ostatnie badania donoszą [19] o sklonowaniu i sekwencjonowaniu jeszcze dwóch genów u *A. brasilense* Sp7 biorących udział w cyklu PHB, to *hbdH* (dehydrogenaza β -hydroksymaślanu) i *phaZ* (depolimeraza PHB).

Adaptacja w środowisku

Osmoregulacja

Bakterie glebowe i kolonizujące ryzosferę *Azospirillum* spp. są poddawane różnorodnym stresowym sytuacjom, głównie spowodowanym przez roztwór wodny. W słonej glebie muszą dawać sobie radę z wysokim potencjałem osmotycznym, w suchej glebie niski potencjał ogranicza ich aktywność i żywotność. Dlatego podłoża piaskowe lub gleba o małej zawartości substancji organicznej nie są wskazane dla dobrej kolonizacji korzeni przez bakterie ryzosferowe z rodzaju *Azospirillum*, ponieważ „przywiązanie” tych bakterii do czystego piasku, w którym brakuje koloidów lub substancji organicznej, jest słabe. Jak donoszą Bashan i Levanony [5], bakterie wytwarzają w tym środowisku siatkę mostków białkowych pomiędzy swoimi komórkami a cząsteczkami kwarcu. Aby pokonać te bariery i skolonizować korzenie roślin komórki *Azospirillum*, muszą użyć dużo energii na poruszanie się poprzez cząstki piasku czy gleby.

Z zasolonego środowiska glebowego można wyizolować bakterie tolerancyjne na potencjał osmotyczny [36]. Podobnie jak inne mikroorganizmy, *Azospirillum* spp. akumulują organiczne związki, które nie ograniczają ich aktywności komórkowej, a pomagają w środowisku wodnego stresu. Opisano związki kompatybilne do komórek *Azospirillum* spp., takie jak trehaloza, glicyna, betaina, glutaminiany i prolina. Odporne na zwiększenie potencjału osmotycznego są szczepy bakterii z gatunków: *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. lipoferum* i *A. halopreferens*, szczególną osmotolerancją odznaczają się szczepy z gatunku *A. irakense*, natomiast niektóre szczepy *A. brasilense* i *A. halopreferens* mogą różnie reagować. U bakterii *A. halopreferens* i *A. brasilense* glicyna i betaina stymulowały wzrost i wiązanie azotu w warunkach stresu spowodowanego zasoleniem środowiska. Osmotolerancyjne szczepy *Azospirillum* spp. nie używają, lub w tylko małym stopniu, jako źródeł azotu i węgla: choli-ny, glicyny, betainy, glutaminianów, proliny i innych aminokwasów [20].

Chemotaksja i aerotaksja

Ruchliwość, dzięki polarnej rzęsce, umożliwia bakteriom przyciąganie (lub odpychanie zależnie od ładunku) przez chemiczne związki wydzielin korzeniowych. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* są przyciągane przez wiele organicznych związków, typowych dla metabolitów korzeniowych, obejmujących: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, bursztyniany, jabłczany, glicynę, galaktozę i arabinozę w optymalnej

koncentracji 10^{-3} M [46]. Nieoczekiwanie, sacharoza może przyciągać komórki *A. lipoferum*, chociaż ten gatunek nie wykorzystuje tego źródła węgla. Substraty znane jako metabolizowane przez *Azospirillum* spp., takie jak D-fruktoza i L-arabinoza, nie przyciągają ani *A. lipoferum* ER 15, ani *A. brasilense* JM 6A2 [35]. Dla gatunku *A. brasilense* najlepszymi chemotaktycznymi związkami są cukry: arabinoza, fukoza i galaktoza. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* (np. *A. lipoferum* Sp 59b, *A. brasilense* Sp 7 i Sp CD) są również przyciągane chemotaktycznie przez związki aromatyczne, takie jak benzoesyany i hydroksybenzoesyany w optymalnej koncentracji od 10^{-6} do 10^{-11} M [30].

Próbki zawierające różne związki, przyciągając komórki bakterii, mogą być również jednym z czynników określających specyficzność rośliny-gospodarza [35]. W dodatku przyciąganie chemotaktyczne *Azospirillum* spp. przez różne organiczne związki preferuje migracje komórek w kierunku stref o niskiej rozpuszczalności tlenu. W konsekwencji, bakterie tworzą błonkę w półpłynnej bezazotowej pożywce w pewnej odległości od powierzchni. Ta mikroaerofilność w pożywkach bezazotowych jest standardową procedurą w izolacji *Azospirillum* spp. i innych bakterii diazotroficznych.

Wytwarzanie związków chelatujących Fe^{3+}

W środowisku tlenowym w ryzosferze dostępność żelaza jest ograniczona przez skrajnie niską rozpuszczalność kompleksów żelaza [K_D : 10^{-38}], jak również przez dużą konkurencję wśród mikroorganizmów, a także zależy od ilości koloidów hydrofobowych w glebie [15]. Najniższe stężenie żelaza, które pokrywa zapotrzebowanie bakterii Gram-ujemnych, wynosi 3×10^{-7} M. Tak więc środowisko ryzosferowe nie zapewnia odpowiedniego stężenia wolnych jonów żelaza, które podtrzymywałyby wzrost bakterii.

Wśród bakterii spotykamy dwa systemy asymilacji żelaza. Pierwszy z nich to system niskiego powinowactwa oparty na swobodnej dyfuzji, który jest czynny przy stężeniach żelaza rzędu $10 \mu\text{M}$ i wyższych. Drugi to system wysokiego powinowactwa do żelaza, działający w warunkach niedoboru tego pierwiastka, składający się z dwóch elementów – sideroforu i systemu aktywnego transportu [32].

Większość sideroforów należy do dwóch znanych grup chemicznych: pochodnych kwasów hydroksamowych, tworzących klasę sideroforów hydroksamowych, i pochodnych fenolu, tworzących klasę sideroforów fenolanowo-katecholowych. Znane są również siderofory tzw. klasy mieszanej, które są ligandami hybrydowymi, zawierającymi jednocześnie ugrupowania hydroksamowe i katecholowe.

W literaturze są jedynie nieliczne prace dotyczące informacji o wytwarzaniu sideroforów przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* [2, 25].

Bakterie te syntetyzują siderofory, które są głównie związkami hydroksamowymi lub fenolowymi i mają duże powinowactwo do Fe^{3+} . W procesie wiązania azotu cząsteczkowego, Fe i Mo są głównie potrzebne do budowy i funkcjonowania nitroge-

nazy. W większości wypadków u *A. lipoferum* siderofory były identyfikowane jako pochodne kwasu dihydroksybenzoesowego (DHBA) – 2,3-DHBA i 3,5-DHBA. Produkcja kwasu salicylowego i związków fenolowych była także zanotowana u *Azospirillum* spp. [2]. U *A. brasilense* RG, kwas 2,3-dihydroksybenzoesowy związany z ornityną i seryną tworzy związek zwany spirillobaktyną. Spirillobaktyny pośredniczą nie tylko w systemie transportu żelaza u mikroorganizmów, ale również biorą udział w procesach dysocjacji membranowej Fe^{3+} w komórkach roślin.

Podsumowanie

Obecnie uważa się, że w wypadku asocjacji *Azospirillum* z roślinami niemotylikowymi udział wiązania N_2 w zaspokajaniu ich zapotrzebowania azotowego jest niewielki. Większość związanego przez nie azotu może być udostępniona roślinom dopiero po śmierci i lizie komórek bakteryjnych, obserwowane zwyczajki plonu mogą być prawdopodobnie spowodowane przez wytwarzanie substancji wzrostowych, enzymów pektynolitycznych czy celulolitycznych lub sideroforów produkowanych przez te bakterie.

U większości roślin zbożowych: pszenicy, kukurydzy, sorga i innych zboż, szczepionych *Azospirillum* spp., uzyskiwano wyraźny wzrost plonów części wegetatywnych (od 18 do 39%), lepszy rozwój i rozgałęzienie systemu korzeniowego i zwiększenie plonów ziarna (od 10 do 30%). W warunkach polowych najlepszy efekt zastosowania szczepionek otrzymywano w wypadku szczepienia *Azospirillum* spp. siewek kukurydzy. Największe plony, wzrost od 60 do 70%, uzyskiwano przy optymalnym nawożeniu i nawodnieniu roślin.

Szczepienie roślin bakteriami z rodzaju *Azospirillum* może okazać się w przyszłości jeszcze jednym sposobem praktycznego zwiększania plonów upraw rolnych niezależnie od tego, czy korzystny wpływ takich zabiegów dotyczy wiązania azotu atmosferycznego, produkcji fitohormonów czy też innych, nieodkrytych do tej pory, skutków oddziaływania tych bakterii na rośliny.

Literatura

- [1] Bachhawat A.K., Ghosh S. 1987. Isolation and characterisation of the outer membrane proteins of *A. brasilense*. *J. Gen. Microb.* 133: 1751–1756.
- [2] Bachhawat A.K., Ghosh S. 1987. Iron transport in *Azospirillum brasilense*: role of the siderophore spirillobactin. *J. Gen. Microb.* 133: 1759–1765.
- [3] Barkovski A.L., Korshunova V.E., Pozdnyacova L.I. 1995. Catabolism of phenol and benzoate by *Azospirillum* strains. *App. Soil Ecol.* 2: 17–24.

- [4] Bashan Y., Holugin G., Rodriguez N., Puente M.E., Ferrera-Cerrato R. 1994. *Azospirillum brasilense*: Root-colonization of weeds and crop plants, inter-root movement and survival in soils and rhizosphere. 15th World Congress of Soil Science. Acapulco, Mexico, July 10–16, 4a: 13–29.
- [5] Bashan Y., Levanony H. 1988. Interaction between *Azospirillum brasilense* CD and wheat root cells during early stages of root colonization. W: *Azospirillum*. IV. Ed. W. Klingmüller Springer Verlag, Berlin: 166 ss.
- [6] Bekri M.A., Desair J., Keijers V., Proost P., Van Leeuwen M.S., Vanderleyden J., Vande Broek A. 1999. *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *J. Bacteriol.* 181: (8) 2440–2447.
- [7] Ben Dekhil S., Cahill M., Stackebrandt E., Sly L.I. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 72–77.
- [8] Bottini R., Fulcheri M., Pearce D., Pharis R.P. 1989. Identification of gibberellins a1, a3, and iso-a3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90: 45–47.
- [9] Day J.M., Döbereiner J. 1976. Physiological aspects of N₂-fixation by *Spirillum* from *Didymopanax* roots. *Soil Biol. Biochem.* 8: 45–50.
- [10] Döbereiner J., Campelo A.B. 1971. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soil. *Plant Soil. Spec. Vol.* 457–470.
- [11] Eckert B., Weber O.B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M., Hartmann A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 17–26.
- [12] Fendrik I., del Gallo M., Vanderleyden J., de Zamaroczy M. 1994. *Azospirillum* VI and related microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Proceedings of NATO Advanced Research Workshop held September 4–7, Sarvar, Hungary: 387–389.
- [13] Haahtela K., Wartiovaara T., Sundman V., Skujins J. 1981. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Enterobacter* i *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 203–206.
- [14] Hartmann A., Kleiner D. 1982. Ammonium (methylammonium) transport by *Azospirillum* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 65–67.
- [15] Hartmann A., Zimmer W. 1994. Physiology of *Azospirillum*. W: *Azospirillum/Plant Associations*. Red. Y. Okon, CRC Press, Boca Raton: 15–41.
- [16] Huijbregts R.P.H., de Kroon A.I.P.M., de Kruijff B. 2000. Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochem. Biophys. Acta.* 1469: 43–61.
- [17] Jaśkowska H. 1993. Występowanie i charakterystyka bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze roślin zbożowych. Praca doktorska. Warszawa. SGGW.
- [18] Kadouri D., Burdman S., Jurkevich E., Okon Y. 2002. Identification and isolation of genes involved in poly-β-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phbC mutant. *App. Environ. Microbiol.* 68: 2943–2949.
- [19] Kadouri D., Edelshtein Z., Jurkevich E., Okon Y. 2002. Isolation of genes involved in poly-β-hydroxybutyrate (PHB) metabolism and stress endurance in *Azospirillum brasilense*. 9th International Symposium on Nitrogen Fixation with non-legumes. September 1–5, Leuven, Belgium: 130.

- [20] Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.A.D., Kaiser P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., anitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140: 679–693.
- [21] Król M.J. 1999. *Azospirillum* – bakterie asocjacyjne w zrównoważonym rolnictwie. *Fol. Univ. Agric. Stetin. 201 Agricultura* (78): 93–102.
- [22] Król M.J. 1997. Występowanie bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze traw. *Zesz. Nauk. AR Szczec.* 181. *Rolnictwo.* 68: 133–140.
- [23] Król M.J., Kobus J. 1996. Free-living halophilic bacteria fixing - N₂. 2nd European Nitrogen Fixation Conference. NATO Advanced Research Workshop. Poznań. September 8–13: 168.
- [24] Król M.J., Perzyński A. 2000. Cellulose and xylan utilization by pure cultures of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. 4th European Nitrogen Fixation Conference, September 16–20, Sevilla – Spain: 143.
- [25] Król M.J., Perzyński A. 2001. Wytwarzanie związków chelatujących Fe³⁺ przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. *Fol. Univ. Agric. Stetin. 221 Agricultura* (88): 125–131.
- [26] Król M.J., Perzyński A. 2001. Charakterystyka biochemiczna bakterii z rodzaju *Azospirillum* ryzosfery zbóż. *Fol. Univ. Agric. Stetin. 221 Agricultura* (88): 112–116.
- [27] Król M., Kobus J., Perzyński A. 1998. Hydroliza pektyn przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. *Zesz. AR w Poznaniu*: 155–167.
- [28] Kulińska D. 1983. Occurrence of *Azospirillum* in Polish soils. *Acta Microbiol. Pol.* 32: 265–268.
- [29] Kurek E., Król M.J., Zielewicz-Dukowska J., Perzyński A. 2001. Rozkład produktów nadtowych zanieczyszczających glebę przez bakterie wykorzystujące azot atmosferyczny. Ekologia w przemyśle rafineryjnym. Konferencja naukowo-techniczna, Kielce 10–12.10. ISBN 83-915734-0-0: 153–162.
- [30] Lopez-de Victoria G., Lovell C.R. 1993. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2951–2955.
- [31] Magalhaes F.M., Baldani J.I., Souto S.M., Kuykendall J.R., Dobereiner J. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Ann. Acad. Bras. Cien.* 55: 417–430.
- [32] Mikucki J., Lisiecki P. 1998. Siderofory – agresyny bakterii. *Post. Mikrobiol.* 37: 73–97.
- [33] Omar M.N.A., Berge O., Hassanein E.E., Shalan S.N. 1992. In vitro and in situ effects of herbicide thioben carb on rice-*Azospirillum* association. *Symbiosis.* 13: 55–63.
- [34] Ona O., Smets I., Bernaerts K., Van Impe J., Vanderleyden J. 2002. The effect of pH on indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic activity of *Azospirillum brasilense* Sp7. 9th International Symposium on Nitrogen Fixation with non-legumes. September 1–5, Leuven, Belgium: 135.
- [35] Reinhold B., Hurek T., Fendrik J. 1985. Strain specific chemotaxis of *Azospirillum* sp. *J. Bacteriol.* 162: 190–195.
- [36] Reinhold B., Hurek T., Fendrik J., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans S., De Ley J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov. of Kallar grass (*Leptochloa fusca* L. KUNTH). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43–51.
- [37] Sadasivan L., Neyra C.A. 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. W: *Azospirillum* III. Genetics, physiology, ecology, red. W. Klingmüller, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo: 230.

- [38] Sajbidor J. 1997. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 87–103.
- [39] Sampaio M.J.A.M., Silva E.M.R., Döbereiner J., Yates M.G., Pedrosa F.O. 1981. Autotrophy and methylo-trophy in *Derxia gummusa*, *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* in Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Gibson A.H., Newton W.E. red. Australian Academic Science. Canberra: 444.
- [40] Sawicka A., Makarowa M. 1994. Nitrogen fixation by *Azospirillum* with wheat and maize radicles as a source of carbon and energy. *Acta Microbiol. Pol.* 43: 107–109.
- [41] Skerman V.B.D., Sly L.I., Williamson M.L. 1983. *Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a sodium-sensitive, mixed-flagellated organism from fresh waters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 300–308.
- [42] Sly L.I., Stackebrandt E. 1999. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 541–544.
- [43] Tal S., Okon Y. 1990. Purification and characterization of D(-)- β -hydroxybutyrate dehydrogenase from *Azospirillum brasilense*. *Cd. J. Gen. Microbiol.* 136: 645–653.
- [44] Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb.nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967–980.
- [45] Tien T.U., Gaskins U.H., Hubbell D.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(5): 1016–1024.
- [46] 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.
- [47] Vande Broek A., Vanderleyden J. 1995. Review: genetics of the *Azospirillum* – plant root association. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 445–466.
- [48] Vieille C., Elmerich C. 1992. Characterization of an *Azospirillum brasilense* Sp7 gene homologous to *Alcaligenes eutrophus* phbB and *Rhizobium meliloti* nodG. *Mol. Gen. Genet.* 231: 375–387.
- [49] Zimmer W., Bothe H. 1988. The phytohormonal intrereactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant Soil.* 110: 239–247.
- [50] Zimmer W., Elmerich C. 1990. Regulation of the synthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum*. W: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Vol. I. Hennecke H., Verma D.P.S. red., Kluwer Academic Publishers. London: 465.

Physiological characteristics of *Azospirillum* bacteria genus

Key words: rhizosphere, *Azospirillum*, association, wall of the cell, phytohormones, carbon source, PHB, adaptation in environment

Summary

From the seven species: *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. largimobile*, *A. irakense* and *A. doebereineriae*, that had been described, *A. brasilense* and *A. lipoferum* were isolated all over the world from soil and the roots a variety of grasses and cereals.

These bacteria are aerobic nonfermentative chemoorganotrophs. They are Gram negative, the cells are vibrioid to S-shaped, mobile in liquid media by a polar flagellum. On solid media, *A. brasilense*, *A. lipoferum* and *A. irakense* have the lateral flagellae. In case of *Azospirillum* spp. the formation of cyst-like structures in old cultures was described. They contain granules of poly- β -hydroxybutyrate (PHB). *Azospirillum* spp. synthesize exopolysaccharides and capsular polysaccharides. The G + C content in DNA varies between 64 and 70 mol%. Their optimum growth temperature ranges from 28° to 41°C. In general, the bacteria of *Azospirillum* genus utilize a variety of sugars, alcohols and organic acids as carbon sources. *A. irakense* grows with pectin as the sole carbon source. Autotrophic growth under aerobic conditions, with H₂ as the energy source has been demonstrated for *A. lipoferum*. *Azospirillum* spp. can utilize the ammonia and nitrate, most strains of *A. brasilense* and *A. lipoferum* are denitrifiers, whereas *A. amazonense* and *A. irakense* are reported to be unable to denitrify. From other physiological properties, they can produce siderophores, phytohormones and other plant growth-promoting substances.