

## Systematyka, genetyka i biologia bakterii z rodzaju *Azospirillum*

Anna Gałązka, Joanna Bigos, Sylwia Siebielec

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Polska

**Abstrakt.** Bakterie z rodzaju *Azospirillum* stanowią główną grupę drobnoustrojów poprawiających wzrost i rozwój roślin. Są to Gram-ujemne diazotroficzne bakterie wiążące azot w asocjacji z większością roślin. Obecnie znanych jest 19 gatunków bakterii z tego rodzaju. Izolaty tych gatunków pozyskiwane były z ryzosfery traw i zbóż całego świata, zarówno z roślin pochodzących ze strefy tropikalnej jak i umiarkowanej. *Azospirillum* tworzy asocjacje zarówno z dziko rosnącymi roślinami, jak i roślinami uprawnymi, warzywami i drzewami owocowymi. Pierwszy poznany gatunek *Azospirillum* został opisany w połowie lat 70. jako gatunek heterotroficzny zdolny do wiązania azotu atmosferycznego. Bakterie te zdolne są do utylizacji wielu źródeł węgla, co znacznie ułatwia im konkurencję w ryzosferze. Ponadto *Azospirillum* są zdolne do wykorzystywania nie tylko azotu atmosferycznego, ale także azotu pochodzącego z amoniaku, azotanów, azotynów, aminokwasów. W niesprzyjających dla wzrostu i rozwoju warunkach (susza, brak składników pokarmowych) tworzą formy cystopodobne. Zmianom morfologicznym towarzyszy wytwarzanie otoczki polisacharydowej i gromadzenie w komórce granulek hydroksymaślanu, służącego jako zapasowe źródło węgla i energii. Są to bakterie ruchliwe, posiadające jedną pojedynczą rzęską lub rzęski peritrichalne. Gatunki *A. brasilense*, *A. lipoferum* i *A. irakense* w zależności od warunków wykazują różne modele urzęsienia. Rdzeń genomu bakterii z rodzaju *Azospirillum* składa się z około 2328 białek, co stanowi od 30% do 38% całkowitych białek kodowanych w tym genomie. Ponadto w budowie genomu *Azospirillum* można wyróżnić kilka megareplikonów (głównie liniowych), natomiast analiza 16S rybosomalnego DNA wskazuje wiele chromosomów w genomie w zakresie wielkości od 4,8 do 9,7 MBP.

**słowa kluczowe:** *Azospirillum*, diazotrofy endofityczne, morfologia, struktura genomu, siedlisko naturalne

### WSTĘP

Najważniejszą rolę w systemie korzeniowym roślin odgrywają asocjacyjne bakterie diazotroficzne wiążące  $N_2$  należące do rodzajów: *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Campylobacter*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Gluconoacetobacter* i najpóźniej poznanego rodzaju *Burkholderia* (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000; Bashan i in., 2004). Do najbardziej znanych bakterii wolno żyjących, wiążących azot cząsteczkowy należą bakterie z rodzaju *Azospirillum*, które w ciągu ostatnich kilkunastu lat stały się przedmiotem wzrastającego zainteresowania (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Bakterie z rodzaju *Azospirillum* są jednymi z najlepiej przebadanych ryzobakterii stymulujących wzrost roślin (PGPR – *plant growth-promoting rhizobacteria*). Należą one do endofitów fakultatywnych – mikroorganizmów występujących w glebie, jak również zdolnych do kolonizacji zarówno zewnętrznej powierzchni, jak i wewnętrznych tkanek roślinnych. Wiedza na temat tej grupy bakterii dostępna w publikacjach jest bardzo obszerna, ale nieusystematyzowana. Brakuje opracowań, które przedstawiałyby syntetycznie całokształt wiedzy w tym zakresie. Niniejsze opracowanie jest próbą usystematyzowania aktualnej wiedzy na temat bakterii z rodzaju *Azospirillum*, z zaznaczeniem zarówno historii badań, jak i najważniejszych cech charakteryzujących tę grupę bakterii: biologii, genetyki, produkcji substancji promujących wzrost i plonowanie roślin, wiązania azotu oraz asocjacji z rośliną.

### HISTORIA BADAŃ BAKTERII Z RODZAJU *AZOSPIRILLUM* (1925–2015)

Odkrycie pierwszego rodzaju mikroaerofilowych bakterii wiążących wolny azot było możliwe dzięki zastosowaniu bezazotowych, półpłynnych podłoży zawierających agar (Döbereiner, Baldani, 1979). W warunkach gradientu tlenu utworzonego w półpłynnej pożywce Nfb organizmy

Autor do kontaktu:

Anna Gałązka  
e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl  
tel. tel +48 81 4786 950

Praca wpłynęła do redakcji 26 listopada 2015 r.

Tabela 1. Zidentyfikowane gatunki *Azospirillum* z uwzględnieniem miejsc ich izolacji. (opracowanie własne)  
Table 1. *Azospirillum* species and their place of isolation.

Gatunek Species	Szczep Strain	Źródło Place of isolation
<i>A. brasilense</i>	Sp7	ryzosfera trawy ( <i>Digitaria decumbens</i> ) Brazylia; rhizosphere of <i>Digitaria decumbens</i> , Brasil
<i>A. lipoferum</i>	Sp59b	korzeń pszenicy ( <i>Triticum aestivum</i> ), Brazylia; wheat root, Brasil
<i>A. amazonense</i>	Y1	korzeń trawy ( <i>Digitaria decumbens</i> ), Brazylia; root of <i>Digitaria decumbens</i> , Brasil
<i>A. largimobile</i>	ACM 2041	próbka wody z jeziora, Australia; lake water, Australia
<i>A. halopraeferens</i>	Au4	korzeń trawy ( <i>Leptochloa fusca</i> ), Pakistan <i>Leptochloa fusca</i> , Pakistan
<i>A. irakense</i>	KBC1	korzeń ryżu ( <i>Oryza sativa</i> ), Irak; rice root, Iraq
<i>A. doebereineriae</i>	GSF71	korzeń miskanta chińskiego ( <i>Miscanthus sinensis</i> ); root of <i>Miscanthus sinensis</i>
<i>A. oryzae</i>	COC8	ryzosfera ryżu ( <i>Oryza sativa</i> ), Japonia; rhizosphere of rice, Japan
<i>A. melinis</i>	TMCY 0552	łodyga i korzenie trawy ( <i>Melinis minutiflora</i> ), Chiny stem and roots of <i>Melinis minutiflora</i> , China
<i>A. canadense</i>	DS2	ryzosfera kukurydzy ( <i>Zea mays</i> ), Kanada; rhizosphere of corn, Canada
<i>A. zea</i>	N7	ryzosfera kukurydzy ( <i>Zea mays</i> ), Kanada; rhizosphere of corn, Canada
<i>A. rugosum</i>	IMMIB AFH-6	gleba skażona ropa naftową, Tajwan; soil contaminated with oil, Taiwan
<i>A. palatum</i>	ww 10	gleba leśna, Chiny; forest soil, China
<i>A. picis</i>	IMMIB TAR-3	smoła, Tajwan; tar, Taiwan
<i>A. thiophilum</i>	BV-S	jezioro siarczkowe, Rosja; sulfide spring, Russia
<i>A. formosense</i>	CC-Nfb-7-(T)	gleba rolnicza, Tajwan; agricultural soil, Taiwan
<i>A. fermentarium</i>	CC-LY743(T)	zbiornik fermentacyjny, Tajwan; fermentation tank, Taiwan
<i>A. humicireducens</i>	SgZ-5(T)	mikrobiologiczne ogniwa paliwowe; microbial fuel cell
<i>A. himalayense</i>	Ptl-3 <sup>T</sup>	gleba, Indie; soil, India

mogły przemieszczać się do tych miejsc, gdzie tempo ich oddychania było w równowadze z szybkością dyfuzji tlenu. Intensywny wzrost tych bakterii zachodzi głównie na powierzchni podłoża, gdzie ze względu na dostępność zawartego w powietrzu tlenu mikroorganizmy mają możliwość wiązania wolnego azotu. Efektem tego jest zwiększony metabolizm komórek bakteryjnych i ich intensywny wzrost (Hartmann, Zimmer, 1994). Odkrycie to pozwoliło również na potwierdzenie obecności innych oprócz *Azospirillum* mikroaerofilnych bakterii diazotroficznych prezentujących tę samą strategię zachowania w środowisku (Reinhold i in., 1993). *Azospirillum* tworzą na powierzchni pożywki charakterystyczną około 5 mm błonkę (Krieg, Döbereiner, 1984). Do chwili obecnej znanych jest 19 gatunków bakterii z rodzaju *Azospirillum*. Charakterystykę ich izolacji przedstawiono w tabeli 1.

Bakterie asocjacyjne wiążące wolny azot zostały po raz pierwszy opisane w 1925 r. przez Beijerincka. Izolaty pochodziły z ubogiej w azot gleby piaszczystej w Holandii i były pierwotnie nazwane *Spirillum lipoferum*. Później izolowano je również z innych typów gleb (Schröder, 1932) oraz z wysuszonych wodorostów morskich w Indonezji, jak też jako bakterie fylosfery roślin tropikalnych (Becking, 1963).

W 1963 roku zespół profesora Beckinga wyizolował bakterię przypominającą *S. lipoferum* (Becking, 1963). Bakteria wykazywała wysoką aktywność nitrogenazy, enzymu biorącego udział w procesie wiązania azotu. Dzie-

się lat później F. Favilli zidentyfikował bakterie diazotroficzne izolowane z gleb włoskich jako *Spirillum lipoferum* i wykazał ich zdolność do wiązania azotu w czystej hodowli na podłożu półpłynnym zawierającym małe ilości ekstraktu drożdżowego (Döbereiner, 1990). Jednak izolację czystych kultur bakterii *Spirillum* należy przypisać dr Johannie Döbereiner (Döbereiner i in., 1976), która do ich hodowli wykorzystywała półpłynne, bezazotowe podłoże z kwasem jabłkowym – podłoże Nfb (Döbereiner, Day, 1976). Podłoże to jest stosowane do dziś w izolacji bakterii asocjacyjnych z rodzaju *Azospirillum* i umożliwia selektywny wzrost tych bakterii przy wykorzystaniu N<sub>2</sub> jako jedyne źródła azotu w warunkach mikroaerofilnych. Następnie Döbereiner i Day (1976) wyizolowały bakterie z rodzaju *Azospirillum* z korzeni tropikalnych traw w Brazylii. Pierwsze doniesienie na ten temat Döbereiner i Day przedstawiły podczas I Międzynarodowego Sympozjum Wiązania Azotu w Waszyngtonie. Od tego czasu *Azospirillum* wyizolowano z korzeni wielu dziko rosnących i uprawnych traw, zbóż, roślin strączkowych, rosnących zarówno w klimacie tropikalnym, subtropikalnym, jak i umiarkowanym (Hall, Krieg, 1984; Hartman, Baldani, 2006).

Cztery lata później Tarrand i in. (1978), w oparciu o fizjologiczne i morfologiczne różnice pomiędzy szczepami oraz różnice w składzie zasad i homologii DNA, zaproponowali przypisanie do rodzaju *Azospirillum* dwóch gatunków: *Azospirillum brasilense* i *Azospirillum lipoferum*

(Falk i in., 1986). Początkowo bakterie te uważane były za typowe bakterie związane z klimatem tropikalnym, dopóki nie zostały wyizolowane w Finlandii w 1981 roku. Dziś wiadomo, iż oba gatunki występują powszechnie w ryzosferze wielu traw, głównie na obszarach tropikalnych (trawy pastewne, kukurydza, pszenica, ryż, sorgo, trzcina cukrowa) (Hartman, Baldani, 2006), ale również w ryzosferze roślin klimatu umiarkowanego i międzyzworotnikowego.

W 1983 r. Magalhaes i in. (1983) wyizolowali z korzeni traw i palm rosnących w Amazonii następnego gatunek *Azospirillum amazonense* charakteryzujący się dużą tolerancją na kwaśny odczyn środowiska. Obecność *A. amazonense* potwierdzono również w ryzosferze ryżu, kukurydzy, i innych traw w środkowo-południowej Brazylii (Magalhaes i in., 1983). Później, z korzeni zbóż (pszenica, sorgo, ryż), został wyizolowany jeszcze jeden gatunek – *A. serpoedicae*. Jednak po przeprowadzeniu analizy homologii DNA-rRNA przeniesiono go w 1986 roku do nowego rodzaju *Herbaspirillum* jako *Herbaspirillum serpoedicae* (Döbereiner i in., 1984).

W roku 1983 z wody w Australii Skerman i in. (1983) wyizolowali gatunek *Conglomeromonas largomobilis*, który w roku 1997 został przez Dekhil i in. (1997) na podstawie filogenetycznej analizy przeniesiony do rodzaju *Azospirillum* pod nazwą *Azospirillum largomobile*. Nazwa ta została później zmieniona przez Sly i Stackebrandta na *Azospirillum largimobile* (Sly, Stackebrandt, 1999).

Następnie Reinhold i inni (1987) wyizolowali z korzeni trawy *Leptochloa fusca* z zasolonych gleb Pakistanu (prowincja Punjab) *Azospirillum halopraeferens*. Ten gatunek *Azospirillum* wydaje się być ściśle związany właśnie z tym gatunkiem trawy, gdyż późniejsze próby potwierdzenia obecności *A. halopraeferans* w asocjacji z innymi roślinami rosnącymi w glebie silnie zasolonej m.in. w Brazylii nie przyniosły pozytywnych rezultatów (Reinhold i in., 1987).

Piąty gatunek – *Azospirillum irakense* – wyizolowali z korzeni ryżu w prowincji Diwanayah (Qadisya) w Iraku w 1989 r. Khammas i in. (1989). Mimo iż później gatunek ten nie został wyizolowany z innych traw lub w innym kraju, nazwa została oficjalnie zatwierdzona jako nowy gatunek *Azospirillum* (List No. 39, 1991).

W 2001 roku został opisany przez Eckert i in. (nazwany na cześć dr Johnny Döbereiner) nowy gatunek – *A. doebereineriae* (2001). *Azospirillum doebereineriae* został wyizolowany z ryzosfery trawy ( $C_4$ ) *Miscanthus sinensis* uprawianej w Niemczech (Neuherberg).

Inny gatunek – *A. oryzae* – wyizolowano z gleby spod uprawy ryżu w 1982 roku w Chinach (Xie, Yokota, 2005). Następnie, z ryzosfery traw, głównie paszowych uprawianych w Chinach, przy zastosowaniu metodyki sterylizacji powierzchniowej części korzeni i pędów *Melinis minutiflora* Beauv. i zastosowaniu półpłynnych, bezazotowych podłoży został zidentyfikowany kolejny nowy gatunek bakterii z rodzaju *Azospirillum* – *A. melinis* (Peng i in., 2006).

W roku 2007 naukowcy z Kanady opisali dwa nowe szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum*. Szczepy te zostały wyizolowane z ryzosfery kukurydzy uprawianej w Ontario i nazwane *A. canadense* (Mehnaz i in., 2007a) i *A. zeae* (Mehnaz i in., 2007b). Oba izolaty różnią się znacznie pod względem cech fizjologicznych. Gatunek *Azospirillum canadense* wykorzystuje inne źródła węgla nie opisane wcześniej przy identyfikacji poprzednich gatunków *Azospirillum*.

Powszechne występowanie bakterii z rodzaju *Azospirillum* nawet w warunkach silnego skażenia gleb potwierdzili naukowcy z Tajwanu. Nowo opisany gatunek *Azospirillum* wyizolowano z gleby zanieczyszczonej olejem napędowym, przy zastosowaniu agaru odżywczego jako pożywki (Young, Yassin, 2008). Gatunek ten został nazwany *A. rugosum* i charakteryzuje się bliskim pokrewieństwem filogenetycznym z gatunkami: *A. canadense*, *A. brasiliense*, *A. doebereineriae*.

W 2009 r. opisano dwa kolejne gatunki należące do rodzaju *Azospirillum*: *A. palatum* (Zhou i in., 2009) i *A. picis* (Lin i in., 2009). Pierwszy został wyizolowany z gleby w Chinach, nie wykazuje aktywności redukcji acetyleny, nie produkuje indoli, redukuje azotany (V) i/lub azotany (III). Drugi szczep wyizolowano z gleby pokrytej zużytą smołą drogową w Tajwanie, ze środowiska silnie skażonego, między innymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) i innymi związkami niebezpiecznymi dla zdrowia człowieka.

W ostatnich latach opisano kilka nowych gatunków bakterii z rodzaju *Azospirillum*, m.in. *Azospirillum thiophilum* wyizolowany z wód jeziora siarczkowego w Rosji (Lavrinenko i in., 2010).

W roku 2012 zespół naukowy z Tajwanu wyizolował z gleby uprawianej rolniczo w prowincji Yunlin szczep CC-Nfb-7<sup>T</sup>, który został nazwany *A. formosense* (Lin i in., 2012). Na podstawie analizy 16S rRNA potwierdzono jego bliskie pokrewieństwo z *A. brasiliense* (97,4%), *A. rugosum* (96,8%) i *A. oryzae* (96,6%) (Lin i in., 2012).

W roku 2013 Lin i in. opisali kolejny gatunek *Azospirillum* – *A. fermentarium* wyizolowany ze zbiornika fermentacyjnego w Tajwanie. Szczep CC-LY743T wykazywał silne pokrewieństwo (na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA) z *A. picis* (96%), *A. oryzae* (96%) i *A. rugosum* (96%).

Rok później zespół profesora Zhou opisał kolejny nowy gatunek – *A. humicireducens* (Zhou i in., 2013). Szczep SgZ-5<sup>T</sup> został wyizolowany z mikrobiologicznego ogniwa paliwowego (ang. MFC, Microbial Fuel Cells) i wykazywał bliskie pokrewieństwo z *A. lipoferum* (98,0%), *A. thiophilum* (97,1%), *A. oryzae* (97,1%). Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe pozwalają na bezpośrednią produkcję energii z surowców biodegradowalnych, zazwyczaj zredukowanych, z wykorzystaniem komórek bakterii lub grzybów.

Ostatnim do tej pory opisanym gatunkiem *Azospirillum* jest *A. himalayense* wyizolowany z gleby w Dolinie Chamba w Indiach (Tyagi, Singh, 2014).

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BAKTERII  
Z RODZAJU *AZOSPIRILLUM*,  
CECHY MORFOLOGICZNE I FIZJOLOGICZNE

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* należą do  $\alpha$ -podklasy *Proteobacteria* – klasy *Alphaproteobacteria*, w której miejsce znalazły takie grupy drobnoustrojów promujących wzrost roślin, jak: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* lub *Gluconacetobacter* (tab. 2). Na podstawie badań filogenetycznych, chemotaksonomicznych, fizjologicznych i biochemicznych wyróżnionych jest obecnie 19 gatunków *Azospirillum*, przy czym pod względem fizjologii i genetyki najlepiej poznanymi gatunkami są *A. lipoferum* i *A. brasilense* (Tarrand i in., 1978). Charakterystykę bakterii z rodzaju *Azospirillum* na tle innych bakterii diazotroficznych należących do *Alphaproteobacteria* przedstawio-

no w tabeli 3. Charakterystykę poszczególnych gatunków w obrębie rodzaju *Azospirillum* przedstawiono w tabeli 4.

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* ze względu na budowę ściany komórkowej zaliczamy do bakterii gramujemnych, charakteryzujących się cienką warstwą mureiny. Komórki bakterii, zwykle o kształcie przecinka, spirali lub litery S, mają szerokość nie przekraczającą 1  $\mu\text{m}$  (Król, 2006). *Azospirillum* posiadają dwuwarstwową fosfolipidową zewnętrzną błonę, w której umieszczone są lipopolisacharydy (LPS). Zawartość fosfolipidów w strukturze ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Azospirillum* jest również postawą do ich identyfikacji gatunkowej (tab. 5). Fosfolipidowa dwuwarstwową zewnętrzną membrana jest połączona z warstwą peptydoglikanu. U szczepu *A. brasilense* R6 stwierdzono, że białko znajdujące się na zewnątrz membrany, o wadze 42 kDa, które zawiera około 60% całego białka, jest połączone z kwasem muraminowym (Michiels i in., 1991). U *A. brasilense* Sp7 po stronie zewnętrznej membrany znaleziono białko o wadze około 40 kDa. W warunkach ograniczonego dostępu żelaza mogą być indukowane cztery białka o wadze od 72 do 87 kDa, które prawdopodobnie funkcjonują jako specyficzny receptor systemu transportu sideroforów. U szczepów bakterii *A. brasilense* i *A. lipoferum* stwierdzono również występowanie kwaśnych egzopolisacharydów (EPS) (Skvortsov, Ignatov, 1998). Prace nad tymi polisacharydami są prowadzone ze względu na funkcję, jaką odgrywają przy rozpoznawaniu i przyciąganiu bakterii przez powierzchnię włóśników korzeniowych. 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 (Bashan i in., 2004).

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* mają otoczkę polisacharydową, a w środku liczne granule kwasu poli- $\beta$ -hydroksymaślowego jako źródło rezerwowego węgla i energii, wykorzystywane w warunkach stresowych środowiska (Castellanos i in., 1998). *Azospirillum* nie wytwarzają na powierzchni komórki śluzu (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000; Król, 2006). Gromadzą wewnątrzkomórkowo poli- $\beta$ -hydroksymaślan (PHB) lub poli- $\beta$ -hydroksyalanoniany (PHA). Z badań wynika, iż komórki *A. brasilense* podczas intensywnego wzrostu i aktywnego wiązania azotu mogą zawierać powyżej 40% suchej biomasy PHB, a nawet 88% przy wysokim stosunku C/N i ograniczonym stężeniu tlenu. Ponadto w tym przypadku to bardziej tlen niż azot jest czynnikiem ograniczającym wytwarzanie poli- $\beta$ -hydroksymaślanów (Król, 2006). 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 azotanów (III) zamiast tlenu jako jedyne akceptora elektronów (Del Gallo i in., 1989). Utlenianie  $\beta$ -hydroksymaślanu przez oczyszczony enzym otrzymany z komórek *A. brasilense* jest hamowane

Tabela 2. Systematyka bakterii z rodzaju *Azospirillum*  
Table 2. Systematics of bacteria of the genus *Azospirillum*.

Systematyka <i>Azospirillum</i> Systematics of <i>Azospirillum</i>	
Domena Domain	Bakterie Bacteria
Typ Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Klasa Class	<i>Alphaproteobacteria</i>
Rząd Order	<i>Rhodospirillales</i>
Rodzina Family	<i>Rhodospirillaceae</i>
Rodzaj Genus	<i>Azospirillum</i>
Gatunek Species	<i>Azospirillum brasilense</i> <i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Azospirillum amazonense</i> <i>Azospirillum largimobile</i> <i>Azospirillum halopraeferens</i> <i>Azospirillum irakense</i> <i>Azospirillum doebereineriae</i> <i>Azospirillum oryzae</i> <i>Azospirillum melinis</i> <i>Azospirillum canadense</i> <i>Azospirillum zeae</i> <i>Azospirillum rugorum</i> <i>Azospirillum palatum</i> <i>Azospirillum picies</i> <i>Azospirillum thiophilum</i> <i>Azospirillum humiciredunces</i> <i>Azospirillum formosense</i> <i>Azospirillum fermentarium</i> <i>Azospirillum himalayense</i>

opracowanie własne

Tabela 3. Charakterystyka bakterii z rodzaju *Azospirillum* na tle innych bakterii diazotroficznych należących do *Alphaproteobacteria*. (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000)  
 Table 3. Characteristics of bacteria of the genus *Azospirillum* against other bacteria belonging to the *Alphaproteobacteria*.

Cecha Feature	<i>Azospirillum</i>	<i>Aquaspirillum</i> <i>peregrinus</i>	<i>Rhodospirillum</i> <i>rubrum</i>	<i>Magnetospirillum</i> <i>magnetotacticum</i>	<i>Azorhizobium</i> <i>caulinodans</i>	<i>Xanthobacter</i> <i>autotrophicus</i>	<i>Beijerinckia</i>
Kształt komórki; Cell shape:							
wibroidalna; vibroidal	+	-	-	-	-	-	- b
helikalna; helical	- c	+	+	+	-	-	-
Szerokość komórki [ $\mu\text{m}$ ]	0,6–1,7	0,5–0,7	0,8–1,0	0,2–0,4	0,5–0,6	0,4–0,8	0,5–1,5
The width of the cell [ $\mu\text{m}$ ]							
Ruchliwość; Mobility	+	+	+	+	+	- d	D
Dominujący typ rzęsek	MP, L	BT	BT	BS	PT, L	±	PT
The predominant type of flagellum							
Aktywność nitrogenazy	+	+	+	+	+	+	+
Nitrogenase activity							
Wiązanie azotu w asocjacji z rośliną	+	-	-	-	+	+	-
Nitrogen fixation in association with the plant							
Fotoautotrofy; Photoautotroph	-	-	+	-	-	-	-
Hipertrofia korzeni lub łodyg	-	-	-	-	+	-	-
Hypertrophy of roots or stems							
Skład DNA [mol% G+C]	64–71	60–64	64–66	65	66–68	65–70	55–61
DNA content [mol% G+C]							

+ cecha pozytywna; positive - cecha negatywna; negative ± w zależności od gatunku; depending on the species D – różnie w obrębie gatunku; the differences within a species L – rzęski lateralne; lateral flagellum PT – rzęski peritrichalne; peritrichal flagellum MP – pojedyncza rzęska polarna; single polar flagellum BS – pojedyncza rzęska; bipolar flagellum BT – bipolarna kiść; bipolar bunch b – komórki mogą być proste lub lekko zakrzywione w kształcie gruszki; the cells may be straight or slightly curved in the shape of a pear c – kilka helikalnych komórek obserwowano w przypadku gatunku *A. halopraeferens*; helical few cells were observed in the case of *A. halopraeferens* d – ruchliwość zależy od warunków wzrostu (substrat, wiek); motility depends on the growth conditions (substrate, age)

przez wysoką koncentrację NADH i NADPH, co już opisano wcześniej dla enzymów pochodzących z *Azotobacter vinelandii* (Bachhawat, Ghosh, 1987).

*Azospirillum* w większości poznanych gatunków to bakterie pleomorficzne. Pleomorfizm bakterii z rodzaju *Azospirillum* jest zwykle odpowiedzią adaptacyjną komórek bakteryjnych na warunki środowiska, w którym żyją (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Formy wielopostaciowe są charakterystyczne dla gatunków: *A. largomobile*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. dobereineriae*, *A. rugosum*, *A. thiophilum*. W starszych hodowlach komórek *Azospirillum* spotyka się obecność nieruchliwych, powiększonych form pleomorficznych, zwanych ciałami kulistymi lub formami C (Tarrand i in., 1978; Lam, Neyra, 1981). Formy te są owalne i silnie załamują światło, szerokość ich wynosi około 2,5 µm, a długość od 3 do 15 µm. Cystopodobne formy nie występują w hodowlach bulionowych tylko na podłożu półpłynnym i stałym, szczególnie powstawanie takich form stymuluje dodatek do podłoża fruktozy i azotanów (III) (Kawasaki i in., 1992). Proces ten u *A. brasilense* sprzężony jest z wytwarzaniem brązowo-czarnego barwnika melaninowego, wydzielanego do podłoża, który prawdopodobnie chroni komórki bakterii przed szkodliwym działaniem promieni słonecznych (Sadasivan, Neyra, 1987).

Komórki bakterii *Azospirillum* posiadają zdolność ruchu: rzęski polarne i lateralne (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). W podłożach płynnych *Azospirillum* zwykle wytwarzają jedną polarną rzęskę, na podłożach stałych z wyjątkiem *A. amazonense* i *A. halopraeferens* liczne rzęski lateralne, natomiast w starych hodowlach tworzą liczne formy cystopodobne (Król, 2006). Obecność tylko rzęsek lateralnych jest charakterystyczna dla gatunku *A. palatum* (Zhou i in., 2009). Natomiast obecnością zarówno rzęsek polarnych, jak i lateralnych cechują się gatunki: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. largimobile*, *A. irakense*, *A. dobereineriae*. Trzy gatunki bakterii z tego rodzaju *A. amazonense*, *A. halopraeferens* i *A. dobereineriae* tworzą tylko jedną rzęskę polarną (Magalhaes i in., 1983; Reinhold i in., 1987; Eckert i in., 2001). Rzęski polarne, o długości około 18 µm i szerokości wraz z osłonką 1,2 µm, odpowiedzialne są za ruch w podłożach płynnych; lateralne, krótsze i cieńsze (0,7 x 13,5 µm) pozbawione osłonki, służą jako organella lokomocji na podłożach stałych (Hall, Krieg, 1984).

*Azospirillum* są względnie heterotrofami, wykorzystują kwasy organiczne i ich sole jako źródło węgla i energii: jabłczan, bursztynian, mleczan, pirogronian, jak również różne cukry: sacharozę, glukozę, maltozę, fruktozę, galaktozę, arabinozę i alkohole: glicerol, sorbitol, mannitol (Hartman, Baldani, 2006). Różnice w wykorzystywaniu odmiennych źródeł węgla (tab. 6) przez gatunki *Azospirillum* były również podstawą do ich identyfikacji gatunkowej. Jeśli w podłożu dostępny jest azot, bakterie z rodzaju *Azospirillum* spp. rosną jak typowy tlenowiec. Bakterie z tego rodzaju charakteryzują się szerokim zakresem moż-

liwości przemian azotu, z wyjątkiem nityfikacji (Kirchhof, Hartmann, 1992; Kirchhof i in., 1997).

#### GENETYKA I BIOCHEMIA BAKTERII Z RODZAJU *AZOSPIRILLUM*

Zagadnienia związane z genetycznymi i biochemicznymi aspektami badań bakterii z rodzaju *Azospirillum* zostały szeroko opisane w literaturze (Becking, 1963; Steenhoudt, Vanderleyden, 2000; Bashan i in., 2004; Król, 2006). Ostatnie lata pokazują, iż bakterie z rodzaju *Azospirillum* są ważnym przedmiotem wieloaspektowych badań, a nowo opisane izolaty znacznie poszerzyły wiedzę na temat genomiki tych bakterii. Wyniki tych badań przyniosły nowe spojrzenie na potencjał genetyczny *Azospirillum* i ich zastosowanie nie tylko związane z asocjacją roślin i promowaniem ich wzrostu, ale także w bioremediacji (Gałązka i in., 2012; Gałązka, Gałązka, 2015) i biokontroli (Gałązka, 2013; Kaneko, Sato, 2010).

Początki badań nad genetyką bakterii z rodzaju *Azospirillum* sięgają drugiej połowy XX wieku. Zastosowanie metod opartych na analizie DNA i rRNA pozwoliło stwierdzić (1978 rok), że dwa szczepy *Azospirillum* należą do dwóch oddzielnych gatunków: *A. brasilense* i *A. lipoferum* (Tarrand i in., 1978). Na podstawie również homologii DNA gatunki takie jak: *Spirillum* spp., *Aquaspirillum* spp. i *Herbaspirillum* spp. zostały oddzielone od rodzaju *Azospirillum*. Szczegółowa analiza 16S rDNA pozwoliła podzielić bakterie z rodzaju *Azospirillum* na klastry: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. dobereineriae*, *A. largimobile* i *A. halopraeferens* stanowią jeden podklaster, natomiast *A. irakense*, *A. amazonense* i *Rhodocista* tworzą drugi podklaster. Zawartość par zasad G+C w obrębie rodzaju *Azospirillum* mieści się w zakresie 64–71 mol%. Zgodnie z tym, na podstawie konserwatywnych obszarów 16S DNA możliwe stało się utworzenie specyficznych dla danego klastra sond: specyficznie dla całego klastra (sonda AZO440a + b) oraz do podklastra (AZOI-665) poszczególnych gatunków (Stoffels i in., 2001).

W celu identyfikacji *Azospirillum* stosowane są często sondy w zastosowaniu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*). Jest to technika cytogenetyczna, służąca do wykrywania w badanym materiale genetycznym określonej sekwencji DNA za pomocą fluorescencyjnych sond DNA (Kirchhof i in., 1997; Schloter, Hartmann, 1998). *Azospirillum* spp. badano także metodami rybotypowania m.in. przez analizę 23S rDNA (Kirchhof, Hartmann, 1992; Caballero-Mellado i in., 1999). Badania te przedstawiają porównywalny filogenetycznie obraz rodzaju *Azospirillum* z zestawem krótkich sond oligonukleotydowych. Jednakże wyniki otrzymane z zastosowaniem analizy 16S rDNA (Van Leeuwenhoek, 2011) dają znacznie większe porównanie w bankach danych w odniesieniu do analizy 23S rDNA (Assmus i in., 1997). Należy również podkreślić, iż na obecnym etapie

Tabela 4. Charakterystyka bakterii z rodzaju *Azospirillum*  
Table 4. Characteristics of bacteria of the genus *Azospirillum*.

Cecha Character	<i>Azospirillum</i> – gatunki/species#								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Wzrost na pożywce BSM Growth on BSM medium	różowy, wypukły, karbowany pink, convex, crenate	różowy, wypukły, karbowany pink, convex, crenate	biały, płaski, wypukły brzeg white, flat, higher edges	nd	brak lack	nd	nd	nd	nd
Typ kolonii na pożywce Congo Red Typ of colony on Congo Red medium	szkarłatny scarlet	szkarłatny scarlet	nd	szkarłatny scarlet	brak wzrostu lack	nd	szkarłatny scarlet	nd	nd
DNA G+C [mol%]; DNA content	70–71	69–70	67–68	70	68–70	64–67	69,6 – 70,7	66,8	68,7
Szerokość komórki [µm] The width of the cell (µm)	1,0–1,2	1,0–1,5	0,8–1,0	0,7–1,5	0,7–1,4	0,6–0,9	1,0–1,5	1,0	0,7–0,8
Długość komórki [µm] The length of the cell [µm]	nd	nd	nd	nd	nd	bd	2,0–3,0	1,5–5,0	1,0–1,5
Pleomorfizm: Pleomorphism	-	+/-	+	+	+	+	+	nd	nd
Ruchliwość: Mobility	+	+	+	nd	nd	+	+	+	nd
Obecność rzęski polarnej Polar flagellum	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
Obecność rzęsek lateralnych Lateral flagellum	+	+	-	+	-	+	-	-	nd
Typ rzęski Typ of flagellum	MP, L	MP, L	MP	MP, L	MP	MP, L	MP, L	MP	nd
Opt. temp. wzrostu [°C] Temperature of growth	35–37	35–37	35	28	41	33	30	30	20–33
Zapotrzebowanie na biotynę The demand for biotin	-	+	-	-	+/-	-	-	+	-
3% NaCl	-	v	-	-	+	+	-	-	+
2% NaCl	+	-	nd	-	+	bd	-	-	+
pH	6,0–7,8	5,7–6,8	5,7–6,5	bd	6,8–8,0	5,5–8,5	6,0–7,0	6,0–7,0	4,0–8,0
Denitryfikacja: Denitrification	+/-	+/-	-	-	+	-	+	-	nd
Wzrost i wiązanie N <sub>2</sub> w podłożu; Growth and fixing N <sub>2</sub>	+	+	-	bd	+	+	+	+	+
pH 7,5	+	+	-	bd	+	+	+	+	+
pH 6,0	+	+	+	bd	-	+	+	+	+
Wytwarzanie kwasu bezludenowego; Preparation of acid in anaerobic condition	-	+/+	-	-	-	-	v	+	nd
D-glukozy: D-glucose	-	+/+	-	-	+	-	+	+	nd
D-fruktozy: D-fructose	-	+/+	-	+	+	-	+	+	nd

# 1 – *A. brasilense* (Tarrand i in., 1978); 2 – *A. lipoferum* (Tarrand i in., 1978); 3 – *A. amazonense* (Magalhães i in., 1983); 4 – *A. largimobile* (Skerman i in., 1983); 5 – *A. halopraeferens* (Reinhold i in., 1987); 6 – *A. irakense* (Khammas i in., 1989); 7 – *A. doebereineriae* (Eckert i in., 2001); 8 – *A. oryzae* (Xie, Yokota, 2005) 9 – *A. melinis* (Peng i in., 2006).

+ – wynik pozytywny; positive - wynik negatywny; negative nd – nie określono; not determined sl – wartości śladowe; the trace

Cecha Character	Azospirillum – gatunki/species#												
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
Wzrost na pożywce BSM growth on BSM medium	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Typ kolonii na pożywce Congo Red Typ of colony on Congo Red medium	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DNA G+C [mol%]; DNA content	67,9	67,6	nd	67,3	68,7	67	64–66	69,6±0,1	67,7	nd	nd	nd	nd
Szerokość komórki [µm] The width of the cell [µm]	0,9	0,9–1,5	nd	0,6–1,0	nd	1,1–2,0	0,8	nd	nd	nd	nd	0,35–0,50	nd
Długość komórki [µm] The length of the cell [µm]	1,8–2,5	1,9–6,8	nd	2,0–2,6	nd	3,6–7,0	2,5	nd	nd	nd	0,75–1,25	nd	nd
Pleomorfizm: Pleomorphism	nd	nd	+	nd	nd	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ruchliwość: Mobility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Obecność rzęski polarnej Polar flagellum	+	+	nd	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Obecność rzęsek lateralnych Lateral flagellum	-	-	nd	+	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-
Typ rzęski; Typ of flagellum	MP	MP	nd	L	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
Opt. temp. wzrostu [°C] Temperature of growth	25–30	30	22–37	30–37	37	37	30	20–37	nd	nd	37±5	nd	nd
Zapotrzebowanie na biotynę The demand for biotin	-	-	-	nd	-	-	-	+	-	-	+	-	nd
3% NaCl	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	nd
2% NaCl	-	-	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	nd
pH	5,0–7,0	5,0–7,0	bd	6,0–8,0	6,5–9,0	6,5–8,5	5,0–9,0	6,0–8,0	5,5–8,5	6,0–8,0	5,5–8,5	nd	nd
Denitryfikacja; Denitrification	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Wzrost i wiązanie N <sub>2</sub> ; Growth and fixing N <sub>2</sub>	-	-	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7,5	-	-	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 6,0	+	+	nd	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Wytwarzanie kwasu bezludenowo; Preparation of acid in anaerobic condition	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
D-glukozy; D-glucose	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
D-fruktozy; D-fructose	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-

# 10 – *A. canadense* DS2<sup>T</sup> (Mehnaz in., 2007a); 11 – *A. zeae* N7<sup>T</sup> (Mehnaz in., 2007b); 12 – *A. rigosum* IMMIB AFH-6<sup>T</sup> (Lin in., 2012); 13 – *A. palatum* ww 10<sup>T</sup> (Zhou in., 2009); 14 – *A. picis* IMMIB TAR-3<sup>T</sup> (Zhou in., 2009); 15 – *A. thioophilum* BV<sub>2</sub>S<sup>T</sup> (Lavrinenko in., 2010); 16 – *A. formosense* CC-Nfb-7<sup>T</sup> (Lin in., 2012); 17 – *A. fermentarium* (Lin in., 2013); 18 – *A. humicireducens* (Zhou in., 2013); 19 – *A. himalayense* pfl-3<sup>T</sup> (Tyagi in., 2014)

+ wynik pozytywny; positive - wynik negatywny; negative nd – nie określono; not determined sl – wartości śladowe; the trace



Tabela 5. Fizjologiczne różnice między gatunkami *Azospirillum*  
 Table 5. Physiological differences between species *Azospirillum*.

Specification	<i>Azospirillum</i> – gatunki; species#																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
13:1 do 12-13	nd	0,7	nd	nd	nd	nd	nd	0,6	nd	nd	0,34	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14:0	0,04	0,7	nd	nd	nd	nd	0,06	0,5	nd	2,3	0,6	1,48	nd	1,32	sl	nd	nd	nd	0,4
15:0	0,30	1,4	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	1,3	0,8	1,96	nd	0,33	nd	nd	nd	nd	nd
16:0	3,39	4,3	nd	nd	nd	nd	6,91	6,9	nd	12,3	5,6	12,40	13,0	19,48	9,7	nd	nd	nd	4,3
17:0	0,10	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	nd	0,5	0,43	nd	0,26	nd	nd	nd	nd	nd
18:0	0,17	0,5	nd	nd	nd	nd	0,28	0,7	nd	2,2	0,4	1,77	3,0	0,56	0,8	nd	nd	nd	0,6
15:0 3-OH	nd	0,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3
16:0 3-OH	38,14	4,3	nd	nd	nd	nd	45,07	4,1	nd	2,2	4,2	3,2	3,1	47,42	0,8	nd	nd	nd	4,4
17:0 3-OH	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18:0 3-OH	1,12	0,5	nd	nd	nd	nd	2,26	0,5	nd	nd	0,4	0,89	1,4	14,07	sl	nd	nd	nd	nd
18:1 2-OH	nd	5,5	nd	nd	nd	nd	nd	5,0	nd	2,2	5,7	nd	nd	nd	4,8	nd	nd	nd	3,6
15:1ω8c	nd	0,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17:1ω8c	nd	3,4	nd	nd	nd	nd	nd	0,8	nd	1,7	2,1	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	1,0
17:1ω6c	nd	7,1	nd	nd	nd	nd	nd	1,4	nd	2,8	3,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,5
18:1ω7c	86,3	53,4	nd	nd	nd	nd	84,50	57,2	nd	54,9	54,9	39,61	35,9	76,8	59,3	nd	nd	nd	60
19:0 cyklo ω8c	nd	1,6	nd	nd	nd	nd	nd	0,8	nd	0,9	nd	nd	32,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Summed feastue 2*	nd	5,9	nd	nd	nd	nd	nd	5,3	nd	0,7	5,5	nd	4,7	nd	nd	nd	nd	nd	5,8
Summed feastue 3*	nd	6,5	nd	nd	nd	nd	nd	14,6	nd	12,0	13,9	nd	0,7	nd	nd	nd	nd	nd	16,3

**Summed feastue 2\*** – 12:0 aldehydy (nieznane), 16:1 iso 1/14:0 3-OH

**Summed feastue 3\*** – 16:1ω7c/16:1ω6c

+ wynik pozytywny; positive - wynik negatywny; negative nd – nie określono; not determined sl – wartości śladowe; the trace\* +, wynik pozytywny; -, wynik negatywny; nd, nie określono; sl, wartości śladowe

# 1 – *A. brasilense* ATCC 29145<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007a); 2 – *A. lipoferum* ATCC 29707<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007a); 3 – *A. amazense* LMG 22237<sup>T</sup> (Magalhaes i in., 1983); 4 – *A. largimobile* (Peng i in., 2006, Xie, Yokota, 2005); 5 – *A. haloprefrens* (Peng i in., 2006); 6 – *A. irakense* (Peng i in., 2006); 7 – *A. doberineriae* (Eckert i in., 2001); 8 – *A. oryzae* IAM 15130<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007a); 9 – *A. melinis* TMCY 0552<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007b); 10 – *A. canadense* DS2<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007a); 11 – *A. zeae* N7<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007b); 12 – *A. rugosum* IMMIB AFH-6<sup>T</sup> (Lin i in., 2012); 13 – *A. palatum* ww 10<sup>T</sup> (Zhou i in., 2009); 14 – *A. pictis* IMMIB TAR-3<sup>T</sup> (Zhou i in., 2009); 15 – *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> (Lavrmenko i in., 2010); 16 – *A. formosense* CC-Nfb-7<sup>T</sup> (Lin i in., 2012); 17 – *A. fermentarium* (Lin i in., 2013); 18 – *A. humicireducens* (Zhou i in., 2013); 19 – *A. himalayense* ptl-3<sup>T</sup> (Tyagi i in., 2014).

Tabela 6. Charakterystyka – wykorzystywane źródło węgla  
Table 6. Characteristics – used carbon source.

Specification	Azospirillum – gatunki; species#																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
N-acetyloglukozamina	-	+	v	+	nd	+	-	-	+	-	-	-	v	+	nd	nd	nd	nd	nd
N-acetylglicosamine	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	-	v	+	+	+	+	+	+
L-arabinoza; L-arabinose	-	+	+	-	nd	+	-	-	-	-	-	nd	+	-	nd	+	+	+	+
D-celobioza; L-cellobiose	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fruktoza; D-fructose	-	+	+	+	nd	+	nd	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
L-fukoza; L-fucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galaktoza; D-galactose	-	+	+	+	-	+	v	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Gentiobioza; Gentiobiose	-	-	+	+	nd	+	-	-	-	-	-	nd	-	-	+	+	+	+	+
D-glukoniary; D-gluconate	+	v	-	-	nd	-	v	nd	+	nd	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-glukoza; D-glucose	-	+	+	+	-	+	v	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol; Glycerol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
myo-inozytol; myo-inositol	-	+	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	+	+	+	+	+
Laktoza; Lactose	-	-	v	-	nd	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoza; Maltose	-	-	+	-	nd	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
D-mannitol; D-mannitol	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D-mannoza; D-mannose	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-rannoza; L-rhamnose	-	-	v	-	nd	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ryboza; D-ribose	-	v	+	+	+	v	-	+	nd	nd	nd	-	+	+	+	+	+	+	+
D-sorbitol; D-sorbitol	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Sacharozę; Saccharose	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-trehaloza; D-trehalose	-	-	+	-	nd	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ksyloza; Xylose	-	v	nd	-	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonat	-	-	nd	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-
Zelatinę; Gelatin	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	+	-	-	-	-	-	-	-
Eskulinę; Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pektynę; Pectin	-	-	-	-	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

# 1 – *A. brasilense* ATCC 29145<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007a); 2 – *A. lipoferum* ATCC 29707<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007a); 3 – *A. amazonense* LMG 22237<sup>T</sup> (Magalhaes i in., 1983); 4 – *A. largimobile* (Peng i in., 2006, Xie, Yokota, 2005); 5 – *A. haloproferens* (Peng i in., 2006); 6 – *A. irakense* (Peng i in., 2006); 7 – *A. doberetterae* (Eckert i in., 2001); 8 – *A. oryzae* IAM 15130<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007a); 9 – *A. melinis* TMCY 0552<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007b); 10 – *A. canadense* DS2<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007a); 11 – *A. zeae* N7<sup>T</sup> (Mehnaz i in., 2007b); 12 – *A. rugosum* IMMIB AFH-6<sup>T</sup> (Lin i in., 2012); 13 – *A. palatum* ww 10<sup>T</sup> (Zhou i in., 2009); 14 – *A. picis* IMMIB TAR-3<sup>T</sup> (Zhou i in., 2009); 15 – *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> (Lavrinenko i in., 2010); 16 – *A. formosense* CC-Nfb-7<sup>T</sup> (Lin i in., 2012); 17 – *A. fermentarium* (Lin i in., 2013); 18 – *A. humitricudens* (Zhou i in., 2013); 19 – *A. himalayense* ptl-3<sup>T</sup> (Tyagi i in., 2014).

wiedzy sondy mają znacznie ograniczoną swoistość. Obecnie analiza filogenetyczna oparta na rybotypowaniu i zastosowaniu sond molekularnych traci na znaczeniu. Postęp w technikach biologii molekularnej prowadzi do zastosowania w analizie genomu bakterii z rodzaju *Azospirillum* metod opartych na genotypowaniu i sekwencjonowaniu genu lub całego genomu bakterii. W publikacjach dotyczących identyfikacji *Azospirillum* można odnaleźć również metody dotyczące określenia polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) oraz metody losowej amplifikacji polimorficznego DNA (*RAPD Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Shime-Hattori i in., 2011; Van Leeuwenhoek, 2011).

Większość genów strukturalnych i regulatorowych opisanych dla *Azospirillum* należy do genów związanych z mechanizmem wiązania azotu należących do grupy genów *nod*. Jednakże mechanizm ich regulacji na poziomie transkrypcji i translacji jest nadal niewyjaśniony. Znanych jest kilka grup badawczych zaangażowanych w poznanie mechanizmu działania m.in. systemu Ntr, Nifa, PII (de Zamaroczy i in., 1996; Araujo i in., 2004; Huergo i in., 2008), jak również genu *NifA-lacZ* (Katupitiya i in., 1995; Potrich i in., 2001), *nifH-gusA* (Van de Broeck i in., 1993; Xie, Yokota 2005) oraz dwufunkcyjnego genu *gfp-gusA* zawierającego mini-Tn5 transposon (Quiviger i in., 1982; Hartmann, Burris, 1987; Reinhardt i in., 2008).

Ponadto większość scharakteryzowanych w genomie *Azospirillum* genów wykazuje funkcje związane z kolonizacją korzeni (chemotaksja, synteza polisacharydów, TAD pili), promowania wzrostu roślin (zwłaszcza biosynteza hormonów) i metabolizmu (katabolizmu związków aromatycznych, wchłaniania żelaza) (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Znane są również geny uczestniczące w transdukcji sygnału chemotaksji (*cheA*, *W*, *Y*, *B* i *R*) (Carreno-Lopez i in., 2009). Gen *chsA* zidentyfikowano u szczepu Tn5 zmutowanego oraz szczepu dzikiego *A. brasilense* typ Sp7. Obecność tego genu w szczepie dzikim potwierdziła charakterystyczny ruch komórek bakterii. Jego brak w szczepie zmutowanym powodował zahamowanie ruchu komórek w podłożach. Ponadto autorzy zaobserwowali, że upośledzenie ruchliwości podczas chemotaksji nie było związane z syntezą wici, ale miało związek z indukcją odpowiedzi na poszczególne związki powodujące u bakterii chemotaksję. Bardzo ważny w uruchomieniu procesu chemotaksji gen *chsA* kodujący białko ChsA zawiera domenę sensoryczną PAS i domeny EAL, białko to bierze bezpośredni udział w indukcji i regulacji systemu sygnalizacji chemotaksji u *Azospirillum* (Carreno-Lopez i in., 2009). Innym bardzo ważnym białkiem w procesie chemotaksji obecnym w błonie komórkowej bakterii z rodzaju *Azospirillum* jest białko kodowane przez gen *amaA* (Burdman i in., 2000).

Genom bakterii z rodzaju *Azospirillum* został po raz pierwszy opisany u szczepu *Azospirillum* sp. B510. Szczep

ten to izolat pochodzący z endoryzosfery korzeni ryżu (Kaneke, Sato, 2010). Genom szczepu B510 składa się z pojedynczego chromosomu (około 3,311 Mbp) oraz sześciu plazmidów oznaczonych symbolem pAB510a, pAB510b, pAB510c, pAB510d, pAB510e i pAB510f. Ogółem opisano 3416 genów kodujących białka w obrębie tegoż genomu, a większość z nich to plazmidy. Natomiast w przypadku około 25% genomu (1559 genów) nie poznano dokładnej funkcji i opisano jako hipotetyczne geny. Duża liczba genów rRNA, w tym dziewięć grup genów *rrms* potwierdzona w genomie *Azospirillum* nie jest charakterystyczna dla typowego genomu *Alphaproteobacteria*. Ponadto szereg genów związanych z asymilacją azotu, m.in. *fixABCX*, *fixNOQP*, *fixHIS*, *fixG* i *fixLJK*, również potwierdzono w genomie szczepu B510 (Yasuda i in., 2009; van Puyvelde i in., 2011).

Trzy geny *phbA*, *phbB*, *phbC* kodujące enzymy, które uczestniczą w metabolicznym cyklu poli- $\beta$ -hydroksymaślanów PHB:  $\beta$ -ketiolaza, reduktaza acetoacetylu CoA i syntetaza PHB, były zidentyfikowane w genomie u *A. brasilense* Sp7, a następnie sklonowane i sekwencjonowane (Martin-Didonet i in., 2000). Ostatnie badania donoszą (Wisniewski-Dye, Mavingui, 2012) o sklonowaniu i sekwencjonowaniu jeszcze dwóch genów u *A. brasilense* Sp7 biorących udział w cyklu PHB, to *hbdH* (dehydrogenaza  $\beta$ -hydroksymaślanu) i *phaZ* (depolimeraza PHB).

W genomie bakterii z rodzaju *Azospirillum* potwierdzono również obecność genów katabolicznego szlaku syntezy IAA (kwas indolo-3-octowy syntetyzowany z tryptofanu), tj.: *ipdC*, *iaaC*, *iaaM* (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Geny kodujące białka tegoż szlaku potwierdzono w genomie szczepu *Azospirillum* B510: *ipdC* (kodujący enzym dekarboksylazy indolo-3- pirogronianowej), *iaaM* (monooksydazę 2-tryptofaanu) i *iaaH* (hydrolazę aldehydu 3-indolowego). W przypadku genomu *Azospirillum* sp. B510 potwierdzono również obecność genu *acdS* kodującego białko promujące wzrost roślin (PGP). Porównanie plazmidów szczepu *Azospirillum brasilense* Sp7 pRhico (plazmid, który jest odpowiedzialny za oddziaływanie z korzeniami roślin – chemotaksja) i pAB510f szczepu B510 odzwierciedliło ewolucyjny rozwój tych bakterii i dostarczyło szeregu nowych informacji dotyczących asocjacji bakterii z rodzaju *Azospirillum* z rośliną (Bar, Okon, 1993). Insercja transpozonu Tn5 w obrębie plazmidu (85 MDa) ma wpływ na obniżenie intensywności w syntezie kwasu indolooctowego (IAA), stąd przypuszczenie, iż geny kodujące enzymy uczestniczące w jego syntezie są zlokalizowane na tym plazmidzie. Plazmid p90 zawiera głównie informację genetyczną dla białek: uczestniczących w adsorpcji bakterii do korzenia, związanych z mobilnością bakterii i morfologią komórek oraz z możliwością wzrostu na podłożach minimalnych (Holguin, Glick, 2003). Plazmid p90 posiada również fragmenty DNA konstytutywnie ulegające transkrypcji, których sekwencja charakteryzuje się dużą homologią do genów kodują-

cych białka odpowiedzialnych za proces brodawkowania występujący u *R. meliloti nodPQ* (Plazinski i in., 1983). Dwa megaplazmidy w ilości jednej kopii w komórce zlokalizowane u *A. lipoferum* jeden o masie: 150 MDa, który podobnie do plazmidu p85 u *A. brasilense* Sp245 koduje enzymy syntetyzujące kwas antranilowy (prekursor tryptofanu), natomiast drugi plazmid o m.c. 300 MDa posiada geny kodujące białka uczestniczące w syntezie melanin. Kado i Liu (1981) określili jeszcze trzy plazmidy o masie cząsteczkowej 100, 90 i 19 MDa u szczepu *A. amazonense* i po dwa plazmidy (o m.c. 14 i 12 MDa) u szczepów *A. halopraeferens* Au4 i *A. irakense* KBC1 (o m.c. 115 i 3 MDa).

Po raz pierwszy występowanie plazmidów (w ilości 1–6) potwierdzono u *A. brasilense* i *A. lipoferum* o masie cząsteczkowej od 4 MDa do 300 MDa. Komórka bakteryjna jest jakby „wypełniona” cząsteczkami plazmidów (Croses i in., 1991). U szczepów bakterii *A. brasilense* znaleziono plazmidy o masie 90 MDa i 85 MDa oraz trzy inne duże p115 i dwa o masie molekularnej większej od 300 MDa (Castro-Guerrero i in., 2012). *Azospirillum brasilense* i *Azospirillum lipoferum* zawierają kilka plazmidów o rozmiarach od 40 do 550 kbp, z których żaden nie hybrydyzuje z sondą zawierającą geny *nif*. Na podstawie analizy z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych i hybrydyzacji DNA zidentyfikowano w plazmidzie *A. brasilense* szczepu Sp7 (90-MDa) pięć loci: *nodH*, *nodN*, *exoB*, oraz jego prawdopodobne miejsce inicjacji replikacji (Acosta-Cruz i in., 2012; Wisniewski-Dye, Mavingui, 2012).

Pomimo wielu prac opisujących obecność plazmidów w *A. brasilense* i *A. lipoferum* (Kaneko, Sato, 2010), informacja o wielkości ich genomu jest nieprecyzyjna. W 1982 roku Wood i in. (1982) przy użyciu zmodyfikowanej metody elektroforezy, opisali obecność wielu dużych pasm DNA o wielkości cząsteczki do 2,8 Mbp, które nazywane są minichromosomami. Oszacowano wówczas, iż wielkość genomu *Azospirillum* jest 1,8 razy większa niż *Escherichia coli*. Ponadto potwierdzono obecność kilku megareplikonów u 10 szczepów z pięciu gatunków *Azospirillum* o masie cząsteczkowej w zakresie od 0,2 do 2,7 Mbp przy użyciu elektroforezy pulsacyjnej (PFGE *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Uzyskany różny obraz elektroforetyczny szczepów w przypadku tych samych gatunków wykazał, iż szczepy różnią się wewnątrz tego samego gatunku, co oznacza, że są one szczepami specyficznymi. We wszystkich badanych szczepach na podstawie 16S rDNA wykryto więcej niż jeden replikon, co sugeruje, że *Azospirillum* zawiera wiele chromosomów, przy czym stwierdzono, iż niektóre z nich mają charakter liniowy. W przypadku genomu szczepu *A. brasilense* Sp245 stwierdzono obecność pięciu stabilnych megareplikonów o rozmiarze od 0,63 do 2,5 Mbp. Ilość i wielkość replikonu zależy ściśle od gatunku *Azospirillum*. Genom *A. lipoferum* Sp59b i JA25 posiadał odpowiednio 8 i 10 replikonów o masie cząsteczkowej w zakresie od 0,15 do 2,6 Mbp. *A. amazonense* szczep Y2 i Y6 posiadał replikony o rozmiarach

wahających się od 0,71 Mbp (Y6) do 2,8 Mbp (Y2). Obecność replikonów potwierdzono również w *A. halopraeferens* i *A. irakense* (Martin-Didonet i in., 2000).

Całkowita wielkość genomu bakterii z rodzaju *Azospirillum* zróżnicowana jest w obrębie gatunku i wynosi od co najmniej 4,8 Mbp u *A. irakense* do 9,7 Mbp (szczep *A. lipoferum* Sp59b) (Martin-Didonet i in., 2000). Wyniki te wskazują, że organizacja genomu *Azospirillum* jest bardzo różnorodna, a informacja genetyczna rozproszona na przynajmniej kilku replikonach. Pionierskie badania wykazały, że genom *Azospirillum* utworzony jest z wielu replikonów, których wielkość waha się w zależności od gatunku od 4,8 do 9,7 Mbp (Fonstein i in., 1992). Genom szczepu *Azospirillum* sp. B510, wyizolowanego z łodygi ryżu siewnego (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) w Japonii ma wielkość 7,6 Mbp i składa się z pojedynczego chromosomu (3,31 Mbp) i sześciu plazmidów (Kaneko, Sato, 2010): pAB510a (1 455 109 bp), pAB510b (723 779 bp), pAB510c (681 723 bp), pAB510d (628 837 bp), pAB510e (537 299 bp), oraz pAB510f (261 596 bp). W genomie tych sześciu plazmidów potwierdzono 3416 genów kodujących białka, siedem zestawów genów *rrns*, 34 tRNA reprezentujących 19 tRNA znanych gatunków *Azospirillum*.

Genom *Azospirillum amazonense* Y2 szczepu wyizolowanego z roślin trawiastych (*Hyparrhenia rufa*) w Brazylii składa się z czterech replikonów wielkości kolejno: 2,7 Mbp, 2,2 Mbp, 1,7 Mbp i 0,75 Mbp (Caballero-Mellado i in., 1999; Gündisch i in., 1993). Genom *Azospirillum lipoferum* 4B, szczepu wyizolowanego z ryżu we Francji, i *Azospirillum brasilense* Sp245, szczepu wyizolowanego z pszenicy w Brazylii, składa się z siedmiu replikonów o wielkości genomu odpowiednio 6,8 i 7,5 Mbp. Genom bakterii *Azospirillum brasilense* CBG497 ma wielkość 7,6 Mbp i składa się z sześciu lub siedmiu replikonów; plazmidy zawierają największą część całkowitej masy genomu (z 55,2% do 59,8%). Zasadniczy rdzeń genomu *Azospirillum* stanowi 2328 białek, stanowiących od 30% do 38% całkowitych białek kodowanych w obrębie genomu. Znajduje się głównie na chromosomie i zawiera 74% genów pochodzenia rodowego (Caballero-Mellado i in., 1999). Pozostała część genomu związana jest z obecnością genów zaangażowanych w indukcję sygnału transdukcji, transportu i metabolizmu węglowodanów, aminokwasów.

Ze względu na dużą masę cząsteczkową replikonów w przypadku bakterii z rodzaju *Azospirillum* przypuszcza się, iż podstawowe geny mogą występować na więcej niż jednym replikonie, co potwierdza obecność tych genów na różnych chromosomach. Wood i in. (1982) potwierdził obecność minichromosomów u szczepów *A. brasilense* i *A. lipoferum* na podstawie wielkości pasm DNA oznaczonego typu elektroforezy w żelu agarozowym pionowym. Operon *nifHDK* jest umieszczony tylko w jednym replikonie, przynajmniej u *A. brasilense* szczepu FP2 oraz Sp7. W przypadku innych szczepów, geny *nifDK* tworzyły kolistą cząsteczkę DNA.

## SIEDLISKO NATURALNE

Ze względu na zdolność większości szczepów *Azospirillum* do kolonizacji zarówno powierzchni, jak i wnętrza korzeni, łodygi i liści, bakterie te zostały zaliczone do tzw. fakultatywnych endofitów, bakterii diazotroficznych. Termin został zaproponowany w celu odróżnienia *Azospirillum* od typowych endofitycznych bakterii, np. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bakterii kolonizującej korzenie trzciny cukrowej (Döbereiner, 1992).

*Azospirillum* najczęściej występuje w glebie ryzosferowej, ponieważ należy do fakultatywnych endofitów zdolnych do kolonizacji zarówno zewnętrznej powierzchni korzeni, jak i wewnętrznej przestrzeni międzykomórkowej tkanek rośliny (Baldani i in., 1997). *Azospirillum* pospolicie występuje w glebach zarówno klimatu tropikalnego, jak i umiarkowanego czy zimnego. Według Baldani i in. (1997) można je znaleźć w 90% gleb obszarów klimatu tropikalnego i w 60% klimatu umiarkowanego. Inni autorzy izolowali je z jeszcze większą częstotliwością. Magalhaes i in. (1983) stwierdzili obecność *Azospirillum* w 94% próbek glebowych pochodzących z Amazonii, a Eckert i in. (2001) donieśli o występowaniu tych bakterii w 81% próbek ryzosfery roślin zbożowych uprawianych w Belgii. Najpowszechniejszymi gatunkami są *Azospirillum brasilense* i *A. lipoferum*, których izolację potwierdzono z ok. 50–90% próbek pobranych na całym świecie pochodzących z gleby, ryzosfery i części różnych roślin (Döbereiner i in., 1976; Faruq i in., 2015).

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* występują głównie w glebach o odczynie obojętnym i lekko zasadowym, ale również są obecne w glebach kwaśnych, zaś dzięki wytwarzaniu cyst wykazują dużą wytrzymałość również na wysuszenie (Eckert i in., 2001; Król, 2006; Sant'Anna i in., 2011). Jednakże temperatura, odczyn i wilgotność gleby, a także zawartość azotu, natlenienie i skład wydzielin korzeniowych wpływają w dużym stopniu na liczebność i aktywność *Azospirillum*. Bakterie te tworzą asocjacje z korzeniami wielu roślin o dużym znaczeniu gospodarczym, tj.: zboża, kukurydza, trawy; rośliny dwuliścienne: pomidor, pietruszka, kapusta. Wyizolowano je z nasion, korzeni, łodyg, liści roślin w różnym stadium rozwojowym (Eckert i in., 2001).

*Azospirillum* stanowią jedną z grup mikroorganizmów endofitycznych, pozytywnie oddziałujących na rośliny i wdrażanych do praktyki rolniczej. Oddziaływanie *Azospirillum* na rośliny jest bardzo złożone i wynika zarówno ze zdolności tych bakterii do wiązania azotu cząsteczkowego, jak też syntetyzowania fitohormonów i innych substancji biologicznie czynnych, co w konsekwencji niewątpliwie wpływa korzystnie na plony roślin uprawnych. Synteza fitohormonów u bakterii z rodzaju *Azospirillum* jest niezbędna do wytwarzania trwałych asocjacji z korzeniami roślin (Michiels i in., 1991; Cecagno i in., 2015). Hormony roślinne powodują podział i różnicowanie komórek

w merystematycznej tkance korzenia; wskutek czego następuje wydłużanie się korzenia, produkowanie większej liczby włośników i rozgałęzianie się ich. Korzystny wpływ tych bakterii na wzrost i rozwój roślin związany jest również z ograniczeniem wzrostu patogenów bakteryjnych, a przy tym indukowaniem odporności na choroby (Gałązka, 2013). Ponadto *Azospirillum* może mieć zastosowanie również w bioremediacji ścieków (zwiększenie wzrostu mikroalg powszechnie stosowanych w tym procesie, jak *Chlorella*) oraz gleb skażonych substancjami ropopochodnymi (Gałązka i in., 2012; Gałązka, Gałązka, 2015).

W oparciu o dotychczas wyizolowane gatunki możemy stwierdzić dużą różnorodność pod względem ich występowania. Najliczniej *Azospirillum* spp. występują w glebie ryzosferowej. Izolowano je z ryzosfery traw paszowych, kukurydzy, zboża, ryżu, drzew kakaowych palm kokosowych, a także z wielu innych roślin plantacyjnych i sadowniczych (Zhao, 2012).

Środowiskiem bytowania tych bakterii jest nie tylko ryzosfera i powierzchnia korzeni roślin uprawnych, ale także ryzosfera i korzenie takich roślin jak: kawa, rośliny owocowe i storczyki. Znane jest również występowanie *Azospirillum* w bardziej ekstremalnych środowiskach – m.in. o wysokiej temperaturze, zasolonych, zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Dziś wiadomo, iż oba gatunki występują powszechnie w ryzosferze wielu traw, głównie na obszarach tropikalnych (trawy pastewne, kukurydza, pszenica, ryż, sorgo, trzcina cukrowa) (Hartmann, Baldani, 2006; Chen i in., 2013), ale również w ryzosferze roślin klimatu umiarkowanego i międzyzwrotnikowego.

Okon (Okon, 1982) i Okon i in. (1976) uzyskali czyste kultury *Azospirillum* z nasion wielu zbóż i traw. Zasadzać roślinę mogą też bakterie z gleby i wówczas kolonizacja zachodzi przez wierzchołek korzenia, a także miejsca odgałęzień bocznych. W glebach i ryzosferze roślin klimatu tropikalnego ich liczebność jest dużo wyższa niż w naszej strefie klimatycznej i wynosi od  $10^4$  do  $10^7$  komórek w jednym gramie suchej masy gleby (Baldani i in., 1983; Kulińska, 1983; Król, 2006). W klimacie umiarkowanym bakterie z rodzaju *Azospirillum* nie są głównym składnikiem populacji diazotroficznych bakterii glebowych, ponieważ dominują gatunki *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* i inne, które przeciętnie osiągają liczebność rzędu  $10^5$  komórek na 1 g suchej masy gleby. Liczebność *Azospirillum* jest znacznie niższa. Jaśkowska (1989) prowadziła w latach 1982–1992 badania mikrobiologiczne dotyczące ekologii *Azospirillum* w ryzopłanie różnych roślin zbożowych i przebadła 160 próbek z terenu Polski. Badania jej wykazały powszechność występowania bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzopłanie żyta, pszenicy, jęczmienia i kukurydzy.

W ekosystemach rolniczych występowanie, liczebność i aktywność bakterii wiążących azot może zależeć od poziomu i systemu nawożenia azotowego. Stosowanie wysokich dawek mineralnych nawozów azotowych nie

tylko hamuje aktywność nitrogenazy, ale także powoduje zmniejszenie liczebności bakterii diazotroficznyc. Okon i in. (1982) stwierdzili, że na wysokie dawki N najbardziej są wrażliwe bakterie z rodzajów *Azotobacter* i *Azospirillum*, dawka 150 kg N·ha<sup>-1</sup> powodowała stukrotne obniżenie liczebności populacji bakterii z rodzaju *Azospirillum*.

## PIŚMIENNICTWO

- Acosta-Cruz E., Wisniewski-Dyé F., Rouy Z., Barbe V., Valdes M., Mavingui P., 2012.** Insights into the 1.59-Mbp largest plasmid of *Azospirillum brasilense* CBG497. *Archives of Microbiology*, 194: 725-736.
- Araújo L.M., Monteiro R.A., Souza E.M., Steffens M.B.R., Rigo L.U., Pedrosa F.O., Chubatsu L.S., 2004.** GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 155: 491-495.
- Assmus B., Schloter M., Kirchhof G., Hutzler P., Hartmann A., 1997.** Improved *in situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbial Ecology*, 33: 32-40.
- Bachhawat A.K., Ghosh S., 1987.** Isolation and characterisation of the outer membrane proteins of *A. brasilense*. *Journal of General Microbiology*, 133: 1751.
- Baldani J.I., Caruso L., Baldani V.L.D., Goi S. R., Döbereiner J., 1997.** Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 911-922.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J., 1983.** Effect of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 924-929.
- Bar T., Okon Y., 1993.** Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 294-298.
- Bashan Y., Holguin G., de Bashan L.E., 2004.** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 521-577.
- Becking J.H., 1963.** Fixation of molecular nitrogen by an aerobic vibrio or spirillum. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology*, 29: 326-332.
- Beijerinck M.W., 1925.** Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann? *Centralbl. Bakt. II Abt.*, 63: 353-357.
- Burdman S., Jurkevitch E., De Mot R., Vanderleyden J., Okon Y., 2000.** Identification and characterization of the *omaA* gene encoding the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*. *DNA Sequence*, 11: 225-237.
- Caballero-Mellado J., Lopez-Reyes L., Bustillos-Cristales R., 1999.** Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 178: 283-288.
- Carreno-Lopez R., Sa'nchez A., Camargo N., Elmerich C., Baca B.E., 2009.** Characterization of *chsA*, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Archives of Microbiology*, 191: 501-507.
- Castellanos T., Ascencio F., Bashan Y., 1998.** Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. *Current Microbiology*, 36: 241-244.
- Castro-Guerrero J., Romero A., Aguilar J.J., Xiqui M.L., Sandoval J.O., Baca B.E., 2012.** The *hisC1* gene, encoding aromatic amino acid aminotransferase-1 in *Azospirillum brasilense* Sp7, expressed in wheat. *Plant and Soil*, 356: 139-150.
- Cecagno R., Fritsch T.E., Schrank I.S., 2015.** The Plant Growth-Promoting Bacteria *Azospirillum amazonense*: Genomic Versatility and Phytohormone Pathway. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. ID 898592, ss. 1-7.
- Chen L., Dodd I.C., Theobald J.C., Belimov A.A., Davies W.J., 2013.** The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. *Journal of Experimental Botany*, 64(6): 1565-1573.
- Croes C., Van Bastelaere E., DeClercq E., Eyers M., Vanderleyden J., Michielis K., 1991.** Identification and mapping of loci involved in motility, adsorption to wheat roots, colony morphology, and growth in minimal medium on the *Azospirillum brasilense* Sp7 90-Mda plasmid. *Plasmid*, 26: 83-93.
- De Zamaroczy M., Paquelin A., Peltre G., Forchhammer K., Elmerich C., 1996.** Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 178: 4143-4149.
- 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. *System Applied Microbiology*, 20: 72-77.
- Del Gallo M., Negi M., Neyra C.A., 1989.** Calcofluorand lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 171: 3504-3510.
- Döbereiner J., 1990.** The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. ss. 2236-2253. W: *The Prokaryotes*, red. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Döbereiner J., 1992.** History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, 13: 1-13.
- Döbereiner J., Baldani V.L.D., 1979.** Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 25: 264-269.
- Döbereiner J., Day J. M., 1976.** Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. ss. 518-538. W: *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*, red. Newton W. E., Nyman C. J. Washington State University Press, Pullman.
- Döbereiner J., Magalhães F. M., Baldani J. I., Souto S. M., 1984.** *Azospirillum amazonense* sp. nov., a new root associated diazotroph bacterium. *Advances in Agricultural Sciences*, 4: 125-128.
- Döbereiner J., Marriell I. E., Nery M., 1976.** Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22: 1464-1473.
- Eckert B., Weber O. B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M., Hartmann A., 2001.** *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 17-26.

- Falk E.C., Johnson J.L., Baldani V.L.D., Döbereiner J., Krieg N.R., 1986. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36: 80-85.
- Faruq G., Shamsuddin Z., Nezhadahmadi A., Prodhon Z.H., Rahman M., 2015. Potentials of *Azospirillum* spp. for Improving Shoot and Root of a Malaysian Sweet Corn Variety (J 58) under In Vitro Condition. *International Journal of Agriculture & Biology*, ISSN Print: 1560-8530; ISSN Online: 1814-9596 12-993/2015/17-2-395-398.
- Fonstein M., Zheng S., Haselkorn R., 1992. Physical map of the genome of *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *Journal of Bacteriology*, 174: 4070-4077.
- Gałązka A., 2013. Przemiany związków fenolowych a rola amoniakolizacji L-feniloalaninowej (PAL) w indukcji mechanizmów obronnych rośliny. *Polish Journal of Agronomy*, 15: 83-88.
- Gałązka A., Gałązka R., 2015. Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *Dactylis glomerata* as the bioremediation plant. *Polish Journal of Microbiology*, 64(3): 239-250.
- Gałązka A., Król M., Perzyński A., 2012. The Efficiency of rhizosphere bioremediation with *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas stutzeri* in soils freshly contaminated with PAHs and diesel fuel. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21: 343-351.
- Gündisch C., Kirchof G., Baur M., Bode W., Hartmann A., 1993. Identification of *Azospirillum* species by RFLP and pulsed-field gel electrophoresis. *Microbial Releases*, 2: 41-45.
- Hall P.G., Krieg N.R., 1983. Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 1592-1594.
- Hall P.G., Krieg N.R., 1984. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 4533-4548.
- Hartmann A., Baldani J.I., 2006. The genus *Azospirillum*. ss. 115-140. W: The prokaryotes, red. Dworkin M., Flaknow S., Rosemberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. Springer, New York.
- Hartmann A., Burris R.H., 1987. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 169: 944-948.
- Hartmann A., Zimmer W., 1994. Physiology of *Azospirillum*. ss. 15-39. W: *Azospirillum/Plant Associations*, red. Okon Y. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Holguin G., Glick B.R., 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the *tetr* gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microbial Ecology*, 46: 122-133.
- Huergo L.F., Merrick M., Monteiro R.A., Chubatsu L.S., Steffens M.B.R., Pedrosa F.O., Souza E.M., 2008. *In vitro* interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 6674-6682.
- Jaśkowska H., 1989. *Azospirillum* – asocjacyjne bakterie wiążące azot cząsteczkowy. *Postępy Mikrobiologii*, 28: 77-86.
- Kado C.I., Liu S.T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145: 1365-1373.
- Kaneko T., Sato S., 2010. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Research*, 17: 37-50.
- Katupitiya S., New P.B., Elmerich C., Kennedy I.R., 1995. Improved N<sub>2</sub> fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum*: studies of colonization using reporting genes. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 447-452.
- Kawasaki H., Hoshino Y., Kuraishi H., Yamasato K., 1992. *Rhodocista centenaria* gen. nov., sp. nov., a cystforming anoxygenic photosynthetic bacterium and its phylogenetic position in the *Proteobacteria* alpha group. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 38: 541-551.
- Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.A.D., Kaiser P., 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*, 140: 679-693.
- Kirchof G., Hartmann A., 1992. Development of geneproboscopes for *Azospirillum* based on 23S-rRNA sequences. *Symbiosis*, 13: 27-35.
- Kirchof G., Schloter M., Aßmus B., Hartmann A., 1997. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 853-862.
- Krieg N.R., Döbereiner J., 1984. Genus *Azospirillum*. ss. 94-104. W: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, red. Holt J. G., Krieg N. R. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Król M., 2006. *Azospirillum* – asocjacyjne bakterie wiążące azot. Monografie i rozprawy naukowe. IUNG – PIB, Puławy, 15: 45-55.
- Kulińska D., 1983. Occurrence of *Azospirillum* in Polish soils. *Acta Microbiologica Polonica*, 32: 265-273.
- Lam R.B., Neyra C.A., 1981. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from to assay grasses growing in New Jersey and New York. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 1320-1325.
- Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M., 2010. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology Letters*, 178: 283-288.
- Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.M., Lai W.A., Shen F.T., Rekha P.D., Yassin A.F., 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology Letters*, 59: 761-765.
- Lin S.Y., Liu Y.Ch., Hameed A., Hsu Y.H., Lai W.A., Shen F.T., Young Ch., 2013. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology Letters*, 63: 3762-3768.
- Lin S.Y., Shen F.T., Ng L.S., Zhu Z.L., Chen W.M., Young Ch., 2012. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology Letters*, 62: 1185-1190.

- List No. 39., 1991. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 580-581.
- Magalhaes F.M.M., Baldani J.I., Souto S.M., Kuykendall J.R., Döbereiner J., 1983.** A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Academia Brasileira de Ciências*, 55: 417-430.
- Martin-Didonet C.C.G., Chubatsu L.S., Souza E.M., Kleina M., Rego F.G.M., Rigo L.U., Yates M.G., Pedrosa F.O., 2000.** Genome structure of the genus *Azospirillum*. *Journal of Bacteriology*, 182: 4113-4116.
- Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G., 2007a.** *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 620-624.
- Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G., 2007b.** *Azospirillum zea* sp. nov., diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Letters*, 57: 2805-2809.
- Michiels K., Croes C.L., Vanderleyden J., 1991.** Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Journal of General Microbiology*, 137: 2241-2246.
- Okon Y., 1982.** *Azospirillum*: Physiology, properties, mode of association with roots and its application for the benefit of cereal and forage grass crops. *Israel Journal of Botany*, 31: 214-220.
- Okon Y., Albrecht S.L., Burris R.H., 1976.** Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 127: 1248-1254.
- Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y., Wang E.T., Tan Z., 2006.** *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Letters*, 56: 1263-1271.
- Plazinski J., Dart P.J., Rolfe B.G., 1983.** Plasmid visualization and *nif* gene location in nitrogen-fixing *Azospirillum* strains. *Journal of Bacteriology*, 155: 1429-1433.
- Potrich D.P., Passaglia L.M.P., Schrank I.S., 2001.** Partial Characterization of *nif* genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 1105-1113.
- Quiviger B., Franche C., Lutfalla G., Rice D., Haselkorn R., Elmerich C., 1982.** Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. *Biochimie*, 64: 495-502.
- Reinhardt E.L., Ramos P.L., Manfio G.P., Barbosa H.R., Pavan C., Moreira-Filho C.A., 2008.** Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at Sao Paulo State. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 414-422.
- Reinhold B., Hurek T., Gillis M., Hoste B., Vancanneyt M., Kersters K., De Ley J., 1993.** *Azoarcus* gen.nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth], and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp.nov.and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43: 574-584.
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans S., De Ley J., 1987.** *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 43-51.
- Sadasivan L., Neyra C.A., 1987.** Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *Journal of Bacteriology*, 4: 1670-1677.
- Sant'Anna F.H., Almeida L.G.P., Cecagno R., Reolon L.A., Siqueira F.M., Machado M.R.S., Vasconcelos A.T.R., Schrank I.S., 2011.** Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics*, vol. 12: 409-416.
- Schlöter M., Hartmann A., 1998.** Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*, 25: 159-179.
- Schröder M., 1932.** Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene*, 85: 178-212.
- Shime-Hattori A., Kobayashi S., Ikeda S., Asano R., Shime H., Shinano T., 2011.** A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 915-924.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33: 300-308.
- Skvortsov I.M., Ignatov V.V., 1998.** Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: Properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiology Letters*, 165: 223-229.
- 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*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 541-544.
- Steenhoudt O., Vanderleyden J., 2000.** *Azospirillum*, a free living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemistry and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 487-506.
- Stoffels M., Castellanos T., Hartmann A., 2001.** Design and application of new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-Cluster. *Systematic Applied Microbiology*, 24: 83-97.
- Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J., 1978.** A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) com nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 967-980.
- Tyagi S., Singh D.K., 2014.** *Azospirillum himalayense* sp. nov., a *nifH* bacterium isolated from Himalayan valley soil. *Indian Annual of Microbiology*, 64: 259-266.
- Van Leeuwenhoek, 2011.** Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. DOI 10.1007/s10482-011-9558-1, 99: 837-844.
- van Puyvelde S., Cloots L., Engelen K., 2011.** Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. *Microbial Ecology*, 61(4): 723-728.
- Vande Broeck A., Michiels J., Van Gool A., Vanderleyden J., 1993.** Spatial, temporal colonization pattern of *Azospirillum*



*brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 6: 592-600.

- Wisniewski-Dyé F., Mavingui P., 2012.** Genome Sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and Comparative Analyses of *Azospirillum* Core and Accessory Genomes provide Insight into Niche Adaptation. *Genes*, 3: 576-602.
- Wood A.G., Menezes E.M., Dykstra C., Duggan D.E., 1982.** Methods to demonstrate the megaplasmids (or minichromosomes) in *Azospirillum*. ss. 18-21. W: *Azospirillum* I: genetics, physiology, ecology, red. Klingmüller W. Burkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Xie C., Yokota A., 2005.** *Azospirillum oryzae* sp.nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*, 55: 1435-1438.
- Yasuda M., Isawa T., Shinozaki S., Minamisawa K., Nakashita H., 2009.** Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp.B510, on disease resistance in rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73: 2595-2599.
- Young C.C., Yassin A.F., 2008.** *Azospirillum rugosum* sp.nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*, 58: 959-963.
- Zhao Y., 2012.** Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic acid in plants. *Molecular Plant*, 5(2): 334-338.
- Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L., Hu P., 2013.** *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* I, 63: 2618-2624.
- Zhou Y., Wei W., Wang X., Xu L., Lai R., 2009.** *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. *Journal of General and Applied Microbiology*, 55: 1-7.

A. Gałazka, J. Bigos, S. Siebielec

#### SYSTEMATICS, GENETICS AND BIOLOGY OF BACTERIA FROM GENUS *AZOSPIRILLUM*

##### Summary

Bacteria of the genus *Azospirillum* ( $\alpha$ -subclass of *Proteobacteria*) have been known for many years as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Azospirillum* species are plant-associated diazotrophs, Gram-negative, nitrogen fixing rhizosphere bacteria. Currently, 19 species of *Azospirillum* are known. They were isolated from the rhizosphere of many grasses and cereals all over the world, in tropical as well as in temperate climates. They occur in association with roots, stems and leaves of a large variety of gramineous and non-gramineous plants, e.g. numerous wild and cultivated grasses and cereals, legumes, vegetables and fruit trees. Bacteria of the genus *Azospirillum* were described in the mid 1970s as heterotrophic  $N_2$ -fixing bacteria. They display a versatile C- and N metabolism, which makes them well adapted to establish in the competitive environment of the rhizosphere. Ammonium, nitrate, nitrite, amino acids and molecular nitrogen can serve as N-sources. In unfavorable conditions, such as desiccation and nutrient limitation, azospirilla can convert into enlarged cyst-like forms. This morphological change is accompanied by the development of an outer coat of polysaccharides and by the accumulation of abundant poly-L-hydroxybutyrate granules, which can serve as C- and energy sources under conditions of stress and starvation. Bacteria belonging to the genus *Azospirillum* are highly motile. *A. brasilense*, *A. lipoferum* and *A. irakense* display a mixed pattern of flagellation. The core genome of *Azospirillum* was established and consists of 2,328 protein-coding genes, representing between 30% to 38% of the total encoded proteins within a genome. *Azospirillum* strains possessed several megareplicons, some probably linear, and 16S ribosomal DNA hybridization indicated multiple chromosomes in genomes ranging in size from 4.8 to 9.7 Mbp.

**key words:** *Azospirillum*, endophytic diazotroph, genome structure, morphology, natural habitat