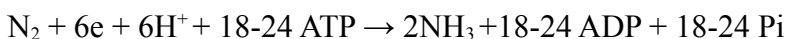
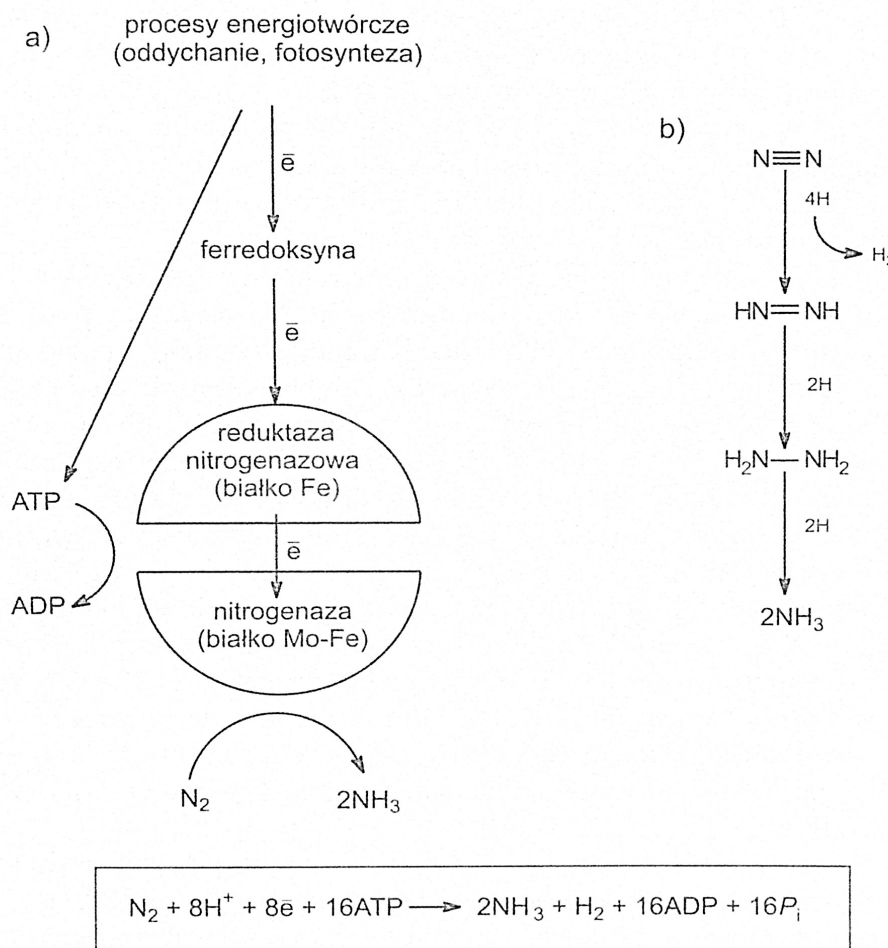


Wiązanie azotu cząsteczkowego

- produkowany przez nitrogenazę amon nie hamuje jej aktywności, ponieważ szybko jest włączany do organicznych form i wykorzystywany w procesach biosyntezy komórkowych.
- Bezwzględne tlenowce z rodzaju *Azotobacteraceae* w czasie wiązania azotu zużywają bardzo duże ilości tlenu celem obniżenia ciśnienia parcjalnego w komórce, co wydaje się być dobrym zabezpieczeniem wrażliwej na tlen nitrogenazy.
- Pewne sztuczne substraty, jak acetylen i cyjanid mogą być również wykorzystywane jako akceptory elektronów przez nitrogenazę. Redukcja acetyleny do etylenu jest powszechnie używanym testem do określenia aktywności wiązania N_2 przez nitrogenazę.

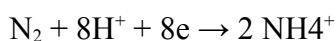
Schemat wiązania azotu cząsteczkowego



1. Bezpośrednim donorem elektronów do redukcji N_2 jest ferredoksyna (białko FeS). Elektrony i ATP pochodzą w zależności od metabolizmu danej bakterii z:
 - procesów oddechowych
 - fermentacji
 - fotosyntezy
2. Reduktaza nitrogenazy (białko Fe, białko żelazowe) dostarcza elektronów o dużym potencjale redukcyjnym.

- Nitrogenaza (białko FeMo) wykorzystuje elektrony do redukcji N₂ do NH₃. Enzym jest jednak niedoskonały i w tej reakcji dodatkowe 2 elektrony zostają przeniesione na dwa protony, które zostają zredukowane do wodoru (dlatego różne reakcje sumaryczne).
- Potrójne wiązanie w N₂ jest niezwykle stabilne.
- Redukcja wymaga więc dużego wydatku ATP.
- Wiązanie azotu zostaje zahamowane jeśli dostępne jest inne jego źródło.
- Wydajność wzrostu w warunkach gdzie komórka zmuszana jest do wiązania azotu jest znacznie niższa niż w obecności NH₄⁺.

Efektywność wiązania N₂



System wiązania azotu	Wiązanie azotu w kg N/ha
Rhizobium	200-300
Anabaena-Azolla	100-120
Cyanobacteria	30-40
Asocjacje w ryzosferze	2-25
wolnożyjące	1-2

Endofity to mikroorganizmy występujące wewnątrz organizmów roślinnych, nie wywołujące objawów chorobowych, a często wpływające korzystnie na wzrost i rozwój roślin.

Bakterie są znajdowane w tkankach korzeni łądyg i liści następujących roślin:

cytryna, sorgo, świerk, lucerna, kawa, trawa kameruńska, kukurydza, sosna, ziemniaki, koniczyna czerwona, ryż, burak cukrowy, trzcina cukrowa, bawełna, ogórki, winorośl, trawa kallar.

Zasiedlanie roślin

Bakterie wnikają przez:

- miejsca zranienia,
- szparki i pory w epidermie,
- przestrzenie międzykomórkowe,
- kwiaty,
- zasiedlają nasiona

Przyciąganie na drodze chemotaksji (flawonoidy), elektrotaksji, lub przypadkowo znajdują się w danym miejscu.

Endofity bakteryjne

(bardzo długa lista mająca uzasadnić, że znajdują się endofity na każdej literę alfabetu. Wymieniam tylko te na czerwono):

Acetobacter, Actinomyces, Azorhizobium, Bacillus, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Pseudomonas, Rhizobium, Serratia, Yersinia.

Liczebność komórek endofitów

- korzenie koniczyny czerwonej w 1g zawierają często ponad 10⁷ cfu, liczba bakterii jest kontrolowana przez roślinę .
- Kolonizacja bakterii dotyczy głównie przestrzeni międzykomórkowej korzeni oraz tkanek przewodzących i kory pierwotnej
- **Uwaga! Kolonizacja wewnątrzkomórkowa przez bakterie jest stosunkowo rzadka.**

Bakterie diazotroficzne – wiążące azot cząsteczkowy

- bakterie diazotroficzne kolonizują najczęściej głęboko położone tkanki korzenia oraz komórki systemów przewodzących roślin, ponieważ panuje tam środowisko ubogie w tlen.
- Do diazotroficznych bakterii endofitycznych należą m.in. bakterie z rodzaju *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*.

Szukujące fakty:

- trzcina cukrowa w pewnych obszarach Brazylii rośnie od 100 lat bez nawożenia azotowego,
- eksperymenty z ¹⁵N wykazywały, że 50-80% azotu w trzcinie cukrowej pochodzi z atmosfery,
- dla porównania szybkość wiązania azotu w ryzosferze jest dwukrotnie niższa niż ta stwierdzona w trzcinie cukrowej.

W roku 1988 Cavalcante i Dobereiner wewnątrz korzeni i łodyg trzcinie cukrowej stwierdzili obecność zdolnych do wiązania azotu atm. bakterii. *Azotobacter diazotrophicus*.

Jest to bakteria gram-, mikroaerofilna, produkująca kwas octowy, toleruje wysokie stężenia sacharozy (10-30%), może rosnąć i wiązać azot przy pH 2.2 (optimum 5.5). obecność azotu azotanowego nie inhibuje wiązania azotu. Jest ono hamowane częściowo przez amoniak i aminokwasy.

Azotobacter diazotrophicus – kolonizacja trzcinie cukrowej

skolonizowana bakteriami trzcina cukrowa zawiera 104-106 cfu/g korzenia, łodygi, liści.

Są one obligatoryjnymi endofitami. Infekcja rośliny odbywa się przez włósniki. Trzcina może wchodzić w interakcje z grzybami mikoryzowymi a nawet owadami! (olaboga!)

Tabela z diazotrofami i ich gospodarzami

Bakteria endofityczna	Gospodarz roślinny
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Panicum miliaceum</i> (proso zwyczajne), <i>Sorghum</i> sp. (sorgo), <i>Triticum aestivum</i> (pszenica zwyczajna), <i>Zea mays</i> (kukurydza zwyczajna)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Panicum miliaceum</i> (proso zwyczajne), <i>Triticum aestivum</i> (pszenica zwyczajna), <i>Zea mays</i> (kukurydza zwyczajna), <i>Pennisetum americanum</i> (proso perłowe)
<i>Azospirillum amazonense</i>	<i>Triticum aestivum</i> (pszenica zwyczajna)
<i>Azospirillum doebereinerae</i>	<i>Miscanthus</i> (miskant)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>Triticum aestivum</i> (pszenica zwyczajna), <i>Zea mays</i> (kukurydza zwyczajna), <i>Saccharum</i> sp. (trzcina), <i>Oryza sativa</i> (ryż siewny), Gramineae (trawy), Palmae (palmy)
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	<i>Saccharum</i> sp. (trzcina), <i>Oryza sativa</i> (ryż siewny)
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	<i>Pennisetum purpureum</i> (proso purpurowe), <i>Miscanthus</i> (miskant)
<i>Herbaspirillum</i> sp. szczep B501gfp1	<i>Oryza officinalis</i> (ryż)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (<i>Acetobacter diazotrophicus</i>)	<i>Saccharum</i> sp. (trzcina), <i>Ipomoea batatas</i> (wilec ziemniaczany = batat), <i>Pennisetum purpureum</i> (proso purpurowe), <i>Triticum aestivum</i> (pszenica zwyczajna), <i>Zea mays</i> (kukurydza zwyczajna)
<i>Azotobacter paspali</i>	<i>Paspalum notatum</i> (trawa paspalum)

Związki wytwarzane i dostarczane przez bakterie endofityczne:

- antybiotyki i substancje antynowotworowe,
- enzymy
- biosyntetyki
- siderofory
- roślinne hormony wzrostu

wytwarzają wtórne metabolity mające właściwości antybiotyków, lub będących substancjami: antynowotworowymi, antywirusowymi, antygrzybowymi, insektycydami, immunosupresantami, a także wiele enzymów i substancji zapasowych.

Mikroorganizm	Gospodarz roślinny	Wytwarzana substancja aktywna	Działanie substancji	Literatura
<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Taxus</i> sp. (cis)	Taxol	Antynowotworowa	Caruso i wsp. (2000)
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Gramineae (trawy)	Ekomicyny B i C	Antybakteryjna	Miller i wsp. (1998)
<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Kandelia candel</i>	Kwasy p – aminoacetofenonowe	Antybakteryjna	Guan i wsp. (2005)
<i>Streptomyces</i> NRRL 30562	<i>Kennedia nigriscans</i>	Munumbicyny	Antybiotyk	Castillo i wsp. (2002)
<i>Streptomyces</i> NRRL 30566	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Munumbicyna D	Antymalaryczna	Castillo i wsp. (2003)
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Monstera</i> sp. (filodendron)	Kakadumycyny	Antybiotyk	Castillo i wsp. (2003)
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Rhyncholacis penicillata</i>	Koronamycyna	Antymalaryczna, Antygrzybowa	Ezra i wsp. (2004)
		Oocydyna A	Antygrzybowa	Strobel i wsp. (2004)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Triticum</i> sp. (pszenica)	Fusaricydyny A - D	Antygrzybowa	Beck i wsp. (2003)
	<i>Pinus</i> sp. (sosna), <i>Phaseolus</i> sp. (fasola), <i>Arabidopsis thaliana</i> ,			Li i wsp. (2007)
	<i>Brassica napus</i> (kapusta rzepek)			Beatty i Jensen (2002)
<i>Cytospora</i> sp.	<i>Quercus</i> sp. (dąb)	Kwasy cytonikowe A i D	Antywirusowa	Guo i wsp. (2000)

Taksol – substancja antynowotworowa, produkowana m. in. przez *Streptomyces* spp., wyizolowany został z *Taxus* sp. i wykazano, że powoduje zahamowanie polimeryzacji mikrotubul w dzielących się komórkach nowotworowych. Ma także właściwości antygrzybowe.

Enzymy hydrolityczne – wytwarza je wiele gatunków endofitów, wykorzystywane są do degradacji ścian komórkowych podczas procesu wnikania do wnętrza rośliny, lub też do degradacji ścian komórkowych patogenów tych roślin. Są to m.in. celulazy, hemicelulazy, chitynazy, amylazy czy glukonazy.

Biosyntetyki – w największych ilościach produkowany jest PHB (dla ciekawskich: poli-beta-hydroksymaślan) i PHA (poli-beta-hydroksyalkanian).

Herbaspirillum seropedicae – diazotroficzny endofit zdolny do kolonizacji wielu roślin wyższych, może akumulować dużo PHB. (PHA i PHB są wykorzystywane do produkcji plastików).

Siderofory – związki produkowane przez endofity bakteryjne, charakteryzujące się wyższym

powinowactwem do żelaza niż substancje wytwarzane przez chorobotwórcze mikroorganizmy działające szkodliwie na rośliny.

Znaczenie: ograniczenie dostępności żelaza patogenom roślinnym powoduje zahamowanie ich rozwoju, co wpływa korzystnie na stymulację wzrostu roślin.

Roślinne hormony wzrostu (auksyny, gibereliny, cytokininy, etylen) – produkowane są przez *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*.

Znaczenie zależności endofitycznych

korzyści dla mikroorganizmów:

- zmniejszenie zewnętrznych stresów środowiskowych
- uzyskiwanie pokarmu i wody

korzyści dla roślin:

- dostęp azotu
- biologiczna kontrola patogenów roślin i rozkład pestycydów
- intensyfikacja pobierania substratów pokarmowych i wody

Endofity jako czynniki kontroli biologicznej roślin:

- Wytwarzają siderofory i antybiotyki,
- produkują enzymy degradujące ściany komórkowe patogenów,
- wytwarzają kwas cyjanowodorowy hamujący rozwój patogenów grzybowych,
- namnażają się w miejscach wnikania patogenów – konkurencja o składniki pokarmowe i wodę,
- wytwarzają ochronne biopolimery – lignifikacja komórek roślinnych a więc ochrona przed patogenami,
- wytwarzają alkaloidy chroniące przed nicieniami i insektami
- zwiększają infekcję roślin grzybami mikoryzowymi.

Bakterie endofityczne a proces fitoremediacji

Bakterie endofityczne wspomagają proces fitoremediacji dzięki zdolności do degradacji lub akumulacji zanieczyszczeń w swoich komórkach.

Bakterie endofityczne wytwarzają enzymy biorące udział np. w procesie rozkładu ksenobiotyków mogą więc degradować zanieczyszczenia, które rośliny akumulują w swoich tkankach lub które krążą w systemie tkanek przewodzących, a zatem rośliny prowadzą sprawniej proces fitoremediacji, mogą przez cały czas pobierać z gleby i akumulować w swoich tkankach nowe pokłady zanieczyszczeń, które następnie degradowane są przez endofity bakteryjne!! (tu naprawdę były dwa wykrzykniki).

Geny odpowiedzialne za degradację zanieczyszczeń przenoszone przez horyzontalny transfer genów (HGT)

Tabela – zanieczyszczenia i bakterie endofityczne zdolne do ich rozkładu

Substancja	Roślina	Bakteria endofityczna	Literatura
2,4-D* ¹	<i>Populus</i> sp. (topola), <i>Salix</i> sp. (wierzba)	<i>Pseudomonas putida</i> VM1450	<i>Germaine i wsp.</i> , 2006
Metan	<i>Populus deltoidesnigra</i> DN34 (topola czarna)	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	<i>Van Aken i wsp.</i> , 2004
TNT* ² , RDX* ³ , HMX* ⁴	<i>Populus deltoidesnigra</i> DN34 (topola czarna)	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	<i>Van Aken i wsp.</i> , 2004
MTBE* ⁵ , BTEX* ⁶ , TCE* ⁷	<i>Populus</i> cv. <i>Hazedans</i> i cv. <i>Hoogvorst</i> (topola)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Germaine i wsp.</i> , 2004; <i>Porteous-Moore i wsp.</i> , 2006
Toluen	<i>Populus</i> sp. (topola)	<i>Burkholderia cepacia</i> Bu61 (pTOM-Bu61)	<i>Taghavi i wsp.</i> , 2005

*1 - 2,4-D - kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowego; 2 - TNT - 2,4,6-trinitrotoluen; 3 - RDX - heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazyna; 4 - HMX - oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazyna; 5 - MTBE - eter metylo-tert-butylowy; 6 - BTEX - benzen, toluen, etylobenzen, ksylen; 7 - TCE-trichloroetylen

Zastosowanie bakterii endofitycznych i substancji przez nie produkowanych

Rolnictwo:

- wytwarzanie środków ochrony roślin (np. antybiotyków) – rośliny odporne na choroby i pasożyty
- endofity wiążące azot cząsteczkowy – zboża nie wymagające nawożenia azotem.

Przemysł:

- produkcja bioplastików z wykorzystaniem PHB
- produkcja oprysków – endofity wytwarzają liczne fungicydy i pestycydy

Przemysł farmaceutyczny i medycyna:

Leki antybakteryjne, antygrzybowe, antywirusowe, antymalaryczne, antynowotworowe.

Podsumowanie

- bardzo wiele gatunków jest kolonizowanych przez endofity należące do różnych grup systematycznych Prokariota.
- pewne endofity bakteryjne stymulują wzrost roślin przez wiązanie azotu, biokontrolę patogenów, lub wzmożony pobór substratów pokarmowych
- endofityczne bakterie są bardziej aktywne niż kolonizujące wewnętrzne tkanki korzeni.