



## TOKAT YÖRESİ TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN AZOSPIRILLUM SUŞLARININ MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ<sup>1</sup>

Mehmet ÖĞÜT<sup>2,3</sup>

Fatih ER<sup>2</sup>

Necdet KANDEMİR<sup>4</sup>

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi, Çumra Meslek Yüksekokulu, Konya/Türkiye

<sup>4</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tokat/Türkiye

(Geliş Tarihi: 04.02.2008, Kabul Tarihi:12.04.2008)

### ÖZET

*Azospirillum* cinsi bakteriler, bitki köklerinde azot ( $N_2$ ) fiksasyonu ve bitki büyümesini hızlandıran fitohormonlar salgılayarak bitki gelişimini artırmaktadır. Ülkemizde, *Azospirillum* suşlarının izolasyonu hakkında çalışma yok denecek kadar azdır. Bu amaçla, Tokat yöresinde bir karayolu üzerinde 5 km aralıklarla 21 toprak örneği alınmıştır. Bu toprakları içeren saksılarda yetiştirilmiş buğday ve mısır bitkilerinin rizosfer toprağından olası 346 adet *Azospirillum* suşları izole edilmiştir. Ortalama, buğday rizosferinden elde edilen izolat sayısı (2.69), yüzey sterilize edilmiş buğday kökünden izole edilen suş sayısından (2.28) istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) derecede daha fazladır. Benzer şekilde, hem rizosfer hemde kök bağlamında, buğday bitkisinden mısır bitkisine göre daha fazla izolat elde edilmiştir. İzole edilen suşların, % 73.5'lik kısmı Gram Negatif, % 24'lük kısmı Gram Pozitif ve % 2.5'lik kısmı ise Gram Değişken olarak tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların % 55'lik kısmı spiral, % 9'luk kısmı çubuk, % 7'lik kısmı kok ve % 29'luk kısmı ise vibroid olarak belirlenmiştir. Pleomorfik hücre oranı % 37 olarak tespit edilmiştir. İzolatların % 14'lük kısmı hareketsiz, % 43'lük kısmı az hareketli ve % 43'lük kısmı çok hareketlidir. İzole edilen suşların % 35.5'i glukozu tek karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Bu bulgulara göre, *Azospirillum* cinsi Tokat yöresi topraklarında, amanjman yöntemi, iklim ve bitki gibi belirleyici özelliklere bakılmaksızın geniş bir yayılış göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** İzolat; morfolojik özellikler; Tokat; *Azospirillum*; Tokat.

### MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF THE AZOSPIRILLUM STRAINS ISOLATED FROM TOKAT REGION'S SOILS

#### ABSTRACT

*Azospirillum* strains enhance the plant growth by means of nitrogen ( $N_2$ ) fixation and production of phytohormones. There is almost no work in the isolation of *Azospirillum* strain in TURKEY. Twenty-one soil samples along a highway with 5 km intervals in Northern Turkey were collected for this reason. A total of 346 putative *Azospirillum* strains were isolated from the rhizospheric soil and surface sterilized roots of the wheat and maize grown in pots containing these soils. On an average, the number of isolates obtained from wheat-rhizosphere (2.69) was statistically ( $P<0.05$ ) higher than the number of strains isolated from wheat-roots (2.28). Similarly, in terms of both rhizosphere and root, there was more strains in the wheat than maize. The percent Gram Negative strains was 73.5%, the Gram Positive 24%, and Gram Variable 2.5%. The percent spiral isolates was 55%, rod 9%, cocci 7%, and vibroid 29%. The percent pleomorphic cells were 37%. The percent of the non-motile strains was 14%, the percent of the strains with low-motility 43%, and the percent of the strains with high motility 43%. Approximately 35% of the strains isolated could use glucose as the sole source of carbon. According to our study, the genus *Azospirillum*, has a great distribution in Tokat soils, regardless of the management system, climate and vegetation.

**Keywords:** Isolate; morphological characteristics; *Azospirillum*; Tokat..

### GİRİŞ

*Azospirillum* cinsi bakteriler "bitki büyümesini hızlandıran mikroorganizmalar" (BBHM) arasında yer almaktadır (Bashan ve Holguin, 1998). Bu mikroorganizma, "rizosfer (mikrobiyal aktivitenin kök salgılarından dolayı yoğun olduğu, köke bitişik olan bölge) bakterisi" ya da "ilişkili azot ( $N_2$ ) fiske edicisi" olarak da sınıflandırılmaktadır. *Azospirillum*'un, *Rhizobium* gibi "simbiyotik azot fiske etme" özelliği yoktur ve *Pseudomonas* ve *Trichoderma* gibi "biyokontrol" özellikleri sınırlıdır. Pek çok kültür bitkisine aşılabilir-

<sup>1</sup>Bu proje Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (Proje No:2004-8) desteklenmiştir.

<sup>3</sup>Sorumlu Yazar: [mogut@selcuk.edu.tr](mailto:mogut@selcuk.edu.tr)

len bakterisi, 1990'a kadar yapılan tarla çalışmalarının % 70'inde verim artışlarına neden olmuştur (Okon ve Labandera-Gonzales, 1994). Bu çalışmalardan elde edilen olumlu verilerin bir sonucu olarak *Azospirillum* ticari olarak, Brezilya, Meksika, Hindistan, Pakistan gibi gelişmekte olan ve Fransa, ABD gibi gelişmiş ülkelerde üretilmektedir.

*Azospirillum*'un bitki üzerindeki ileri sürülen etki mekanizmaları çok değişiktir. Önceleri, *Azospirillum*'un bitki büyümesine ana katkısının azot fiksasyonu yoluyla olduğu düşünülmüştü. Genelde, azot fiksasyonunun bitki kütle artışındaki payı küçüktür; Bu oran, % 5 ile % 18 arasında değişmekle birlikte, genelde % 5'in altındadır (Bashan ve Levanony, 1990). Dahası, azot fiske etmeyen (Nif-) *Azospirillum* mutantları, azot fikse edenler (Nif+) kadar bitki bü-

yüme artışına neden olmuştur. Bir diğer mekanizma fitohormon üretimidir. *Azospirillum in vitro* indol asetik asit (IAA), giberilin ve sitokinin üretebilmektedir ve *Azospirillum*'dan saflaştırılmış hormonlar bitki köklerinde *Azospirillum*'a benzer etkiler göstermiştir. *Azospirillum*'un bitkinin mineral alımını artırdığı yönündeki hipotezler 1980'lerde öne sürülmüş ve halen bu hipotezi çürütecek net bir bulgu yoktur (Bashan ve Holguin, 1997). *Azospirillum* ya nitrat respirasyonu sonucu ya da direk olarak bitkiye verdiği nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) lateral kök oluşumunu belirgin ölçüde artırmıştır. *Azospirillum* bitki hücre duvarlarını geçen ve bitki membranları tarafından algılanan bir takım sinyal molekülleri göndererek bitki metabolizmasında değişikliklere neden olur. Fakat, bu sinyal moleküllerinin tabiatı bilinmemektedir. 1970'lerde, *Azospirillum*'un bitki kök gelişmesini artırmak yoluyla bitki büyümesinde genel bir iyileşmeye neden olduğu varsayılmıştır. Son olarak, *Azospirillum*-bitki ilişkisinde yukarıdaki mekanizmalardan birden fazlasının eşgüdümlü olarak söz konusu olduğu ileri sürülmüştür (Bashan ve Holguin, 1997).

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Toprak Örneklerinin Alınması

Toprak örnekleri, Tokat ilinin yoğun tarım yapılan bölgeleri arasından geçen Turhal-Tokat ve Tokat-Erbaa karayolları boyunca alınmıştır. Her örnek alma noktasında, taşıta bulunan küresel konumlandırma sistemi (GPS) aletiyle, enlem-boylam ve deniz seviyesinden yükseklik kaydedilmiştir. Turhal-Tokat karayolunun başlangıcı 0 km olarak kabul edilmiş ve bu noktada karayoluna yaklaşık 15 m mesafeden toprak örneği alınmıştır. Yaklaşık 15 cm derinlikten alınan 15-25 kg arasındaki bozulmuş toprak örneği kürek yardımıyla alınarak siyah plastik torba içine konulmuştur. Bu noktada, ulaşım aracının "km göstergesi" sıfırlanmış ve ulaşım aracının anılan güzergah boyunca seyahat esnasında, yaklaşık olarak her 5 km mesafede bir durularak toprak örneği belirtilen yöntemle alınmıştır. Örneklem noktaları arasında bulaşmayı önlemek amacıyla kürek her örneklem başlangıcında saf suyla iyice yıkanmış ve çamaşır suyuyla muamele edilerek kurulanmıştır. Toplam 21 adet toprak örneği, 24 s içinde denemenin yapılacağı Selçuk Üniversitesi Çumra Meslek Yüksekokulu'na getirilmiştir. Toprak örnekleri, getirildikleri yerde, eleme ve kurutma gibi herhangi bir ön işleme tabii tutulmamıştır. Sadece bir miktar toprak örneği, rutin toprak analizleri için ayrılarak havada kurutulmuş ve 2 mm elekten geçirilmiştir.

### Toprak Örneklerinde Analizlerin Yapılması

Toprak örneklerinde yapılan analizler yarayışlı fosfor, toplam azot, organik madde, % kireç, pH, elektriksel iletkenlik, mikroelementler (Fe, Mn, Zn, Cu), ve tekstürdür. Topraklarda yarayışlı fosfor miktarı Olsen metoduna (Olsen and Sommers, 1982); toplam azot içeriği tayini için modifiye edilmiş Kjeldahl metodu (Bremner and Mulvaney, 1982); organik

madde tayini Walkley-Black yöntemine (Nelson ve Sommers, 1982); kireç tayini kalsimetrede (Nelson, 1982); pH ve elektriksel iletkenlik (EC) 1:2.5 oranında toprak-su karışımında; mikroelement tayini (Fe, Mn, Zn, Cu), DTPA-ekstraksiyon sonucu elde edilen süzüklerde (Lindsay ve Norwell, 1978), ICP-Atomik Emisyon Spektrofotometresiyle (Varian Vista Model); tekstür, hidrometre yöntemiyle (Day, 1965) yapılmıştır.

### Buğday ve Mısır Bitkilerinin Saksılarda Yetiştirilmesi

Mısır (*Zea mays*) ve buğday (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* L. cv Bezostaja-I) tohumları yüzey sterilizasyonuna tabii tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonu, % 95'lik etil alkolde 2 dak ve % 1'lik sodyum hipokloritte (NaOCl) bir dak tutulmadan sonra steril saf su ile 6 kere durulamak yoluyla gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tohumlar, petri kutularında steril agar (% 1.5) üzerinde 28 °C'de 4 gün boyunca çimlendirilmiştir. Nemli toprak örnekleri herhangi bir işleme tabii tutulmadan 2 L'lik saksıların içine aktarılmıştır. Çimlenmiş tohumlar cam sera içine yerleştirilmiş saksılara aseptik yolla ekilmiştir. Saksıda bitki sayısı, buğday için 3 mısır için 1'dir. Her bir uygulamadaki tekrar sayısı ikidir. Saksılara herhangi bir pestisit ya da gübre uygulaması yapılmamıştır. Bitkiler gerektiğinde saksı tablalarından yada spreyleme yoluyla saf su ile sulanmıştır. Bitkiler bu şekilde sera içinde 21 gün büyütülmüştür.

### *Azospirillum* Suşlarının İzolasyonu

Üç haftanın sonunda saksılar seradan alınarak laboratuvara getirilmiştir. Burada, saksı içeriği dikkatli bir şekilde yere serilmiş bir naylon üzerine boşaltılmıştır. Buğday için, her bir saksıdan rasgele bir bitki seçilmiştir. Bitki kökleri, zayıf bir şekilde sallanarak, köklere zayıf bir şekilde tutunan toprak parçacıklarının ayrılması sağlanmıştır. Kökler, toprak üstü aksamından steril bir makasla ayrılmıştır. Kökler ve köklerle sıkı bir şekilde tutunmuş toprak parçacıkları (rizosfer toprağı) dikkatli bir şekilde steril plastik torbanın içine alınmış ve +4 °C'deki soğutucuya yerleştirilmiştir. Örneklerin soğutucuda bekleme süresi en fazla 5 saat olmuştur.

Daha sonra, her bir bitkiden elde edilen kök, 25 ml steril tuz çözeltisi (8.5 g NaCl 1,000 ml<sup>-1</sup>) içeren 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Tüpler, çalkalayıcıda 30 dak 200 dev dak<sup>-1</sup> çalkalanmıştır. Çalkalama esnasında çözeltiliye geçen toprak, rizosfer olarak değerlendirilmiştir. Bu süspansiyondan 1 ml alınarak, 4 ml steril azot fikse eden besiyeri (Afb) içeren deney tüplerine verilmiştir. Tüpler, 37 °C'de 72 s boyunca inkübe edilmiştir. Santrifüj tüplerinin içinde kalan kökten bir kaç ufak parça steril makasla kesilerek, yüzey sterilizasyonuna (daha önce anılan metoda göre) tabii tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonuna tabii tutulan kökler, aynı şekilde Afb içeren deney tüplerine alınmış ve inkübe edilmiştir. Bu tüplerdeki mikroorganizmalar, kökler yüzey sterilizasyonu yapıldığı için,

kök içini kolonize eden (endofit) *Azospirillum* suşlarını içermektedir.

Tüplerdeki gelişmeler daha sonra Kongo Kırmızısı Agarı (KKA) (Rodriguez-Caceres, 1982) içeren petri kutularına aseptik koşullarda çizilmiştir. Petri kutuları, 37 °C'de 72 s boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, birbirinden ayrılmış ve çok açık pembeden-koyu kırmızıya kadar değişik kızılılık gösteren koloniler, muhtemel *Azospirillum* kolonileri olarak değerlendirilmiştir. Bu tür teksel koloniler, tekrardan KKA içeren petri kutularına çizilmiş ve +4 °C'deki soğutucuya alınmıştır. Öte yandan, uzun dönemli saklamak için izolatlar yatık Nutrient Agar'da geliştirilen mikrobiyal kültür, 1 ml % 20'lik gliserol solüsyonu içeren kryoviallere alınmış ve kryovialler – 24 °C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir.

### **İzolatlarda Gram Reaksiyonu ve Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi**

Bir damla su lamın üzerine konduktan sonra, bakteri kültüründen öze ucuyla çok az bir miktar alınarak lam üzerindeki su ile sürüntü yapılmıştır. Sürüntü, steril kabinde kurutulduktan sonra lama fikse olması için Bunsen Alevi'nden 3-4 kez hızlıca geçirilmiştir. Lam soğuduktan sonra, kristal violetle üzeri kaplanmış ve bu halde 60 sn bekletilmiştir. Saf su ile yıkanıldıktan sonra, Gram İodin Çözeltisi damlatılmış ve 60 sn bekletilmiştir. Suyla yıkanıp, aseton-alkol karışımıyla 30 sn dekolorize edildikten sonra, safranin uygulanmış ve 60 sn bekletilip saf suyla yıkanmıştır. Lam kurutma kağıdında kurutulduktan sonra, ışık mikroskopunda  $\times 1,000$  büyütmede gözlenmiştir. Kristal violet-iodin kompleksi yıkanarak safraninle boyandığı için pembe renkli gözükten mikroorganizmalar Gram negatif, kristal violeti tuttuğu için mavi/mor renkli gözükten mikroorganizmalar Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, hücreler morfolojik olarak kok, çubuk, vibroid yada spiral olmak üzere 4 grupta incelenmiştir.

### **İzolatlarda Pleomorfizm Oluşumunun Gözlenmesi**

Pleomorfizm, Kreig ve Döbereiner'e (1984) göre gerçekleştirilmiştir. İzolatlar, sıvı kültürde 24 s boyunca geliştirilmiştir. Steril öze yardımıyla, 24 s'lik kültür steril Afb içeren deney tüplerine aktarılmıştır. Deney tüpleri, 37 °C'de 48 s inkübe edildikten sonra, büyüyen mikroorganizmalar ışık mikroskopunda incelenmiştir. *Azospirillum brasilense* türü genelde vibroid formda gözükmektedir. Öte yandan, *Azospirillum lipoferum* türünde uzun spiral formların yanında, büyük ovoid ve deforme olmuş involusyon formlarında hücrelerde görmek mümkündür. Pleomorfizm, *Azospirillum lipoferum* türünün önemli bir karakteristiğidir.

### **İzolatlarda Hareketlilik Testi**

Hareketlilik testi, Yarı Katı Nutrient Agar (YKNA) Tüpleri'nde gerçekleştirilmiştir. Steril kürdan, mikroorganizma kültürüne dokundurulduktan sonra, YKNA içeren tüplerin ortasından agar boyunca

aşağı doğru batırılmıştır. Tüpler, 35 °C'de 48 s inkübe edilmiştir. Mikroorganizma gelişmesi sadece kürdanın batırıldığı çizgi boyunca olmuşsa, bu durumda izolat 'hareketsiz' olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan, mikrobiyal büyümenin çizgiden uzaklaşması ve tüpün yanlarına doğru uzaması söz konusuysa, izolat 'hareketli' olarak kaydedilmiştir. Hareketlilik, inokulasyon çizgisinden kısmen uzaklaşma söz konusuysa 'az hareketli', inokulasyon çizgisi boyunca lateral olarak cam tüpe kadar yayılma söz konusuysa 'çok hareketli' olarak nitelendirilmiştir.

### **İzolatlarda Glukozda Büyümenin Belirlenmesi**

İzolatlara, tek karbon kaynağı olarak malat içeren sıvı Afb tüplerinde 28 °C'de 24 s inkübe edilmiştir. Daha sonra, 24 s geliştirilmiş kültürlerden 50 mikrolitrelik bir kısım, tek karbon kaynağı olarak glukoz içeren yarı katı Afb tüplerine alınmış ve tüpler 37 °C'de 72 s inkübe edilmiştir. *Azospirillum lipoferum* türü, tüpün derinliklerine kadar gelişebilmektedir; daha sonra gelişme besiyerinin yüzeyine yakın bir noktada yoğunlaşmaktadır. Öte yandan, *Azospirillum brasilense* türü, glukozda büyüemekte ya da çok az bir büyüme göstermektedir. Büyümedeki farklılıklar, kültürlerde oluşan pH ile de kontrol edilmiştir. Bromotimol blue, asit reaksiyonlarda sarı, nötr reaksiyonlarda yeşil, alkalik reaksiyonlarda mavi renk almaktadır. Mikrobiyal yolla glukozun oksidasyonu, kültürlerde asitleşmeye (bromotimol blue ile etkileşimde sarı renk) neden olmaktadır. Öte yandan, glukozun mikrobiyal yolla okside olmaması, kültürün başlangıçtaki nötr reaksiyonunu (bromotimol blue ile etkileşimde yeşil renk) korumasını sonuçlamaktadır. Bromotimol blue, izolatların bu kimyasal karbon kaynağı olarak kullanılabileceği dikkate alınarak, inkübasyondan sonra tüplere verilmiştir.

### **ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA**

#### **Toprakların Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri**

Toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

#### **İzolaların Toprak, İzole Edildiği Bitki ve Bölgeye Göre Dağılımı**

İzole edilen suşların, toprak, izole edildiği bitki ve bölgeye göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir. Ortalama en fazla izolat, nadasa bırakılmış olan 6 ve 9 nolu toprak örneklerinden (sırasıyla, 3.00 ve 2.75) elde edilmiştir. Öte yandan tarımdışı üç adet araziden (8, 19, ve 21 no'lu) elde edilen izolat sayısı nispeten az (sırasıyla, 1.75, 1.50 ve 1.62) olmuştur. 6 ve 9 no'lu topraklardan elde edilen izolat sayısı, 19 ve 21 no'lu topraklardan elde edilen izolat sayısından istatistiksel olarak fazladır ( $P < 0.05$ ). Öte yandan, buğday rizosferinden elde edilen izolat sayısı (2.69), buğday kökü (2.28), mısır rizosferi (1.59) ve kökünden (1.97) elde edilen izolat sayılarından istatistiksel olarak, % 5 önem seviyesinde, daha fazladır (Tablo 2). Yaklaşık olarak, buğday bitkisinden elde edilen izolat sayısı,

mısır bitkisinden elde edilen izolat sayısından % 40 daha fazladır.

Tablo 1. Toprakların bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri.

Örnek No	Kullanım Şekli	Organik madde (%)	Kireç (%)	pH	EC (dS m <sup>-1</sup> )	P (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Kum (%)	Silt (%)	Kil (%)
01	Buğday (1)	2,2	8,4	8,0	0.232	2,9	3,1	10,4	0,06	0,57	33	39	28
02	Buğday (2)	1,7	7,9	7,7	1.625	8,9	1,1	4,7	0,03	0,44	34	50	16
03	Meyve Bahçesi (1)	1,0	3,1	8,2	0.220	8,5	1,7	9,8	0,09	0,62	41	29	30
04	Buğday (3)	1,5	5,6	7,8	0.564	2,6	2,0	5,5	0,09	0,46	46	27	27
05	Çayır-mera (1)	7,9	8,3	7,9	0.420	2,2	2,1	12,3	0,05	0,56	37	34	29
06	Nadas (1)	2,0	14,4	8,1	0.294	1,6	7,7	12,4	0,03	0,74	40	31	29
07	Kavaklık	1,7	7,2	8,1	0.222	0,4	1,5	10,7	0,04	0,40	40	30	30
08	Tarımdışı (1)	0,9	52,1	8,7	0.146	0,2	0,4	1,8	0,00	0,05	44	31	25
09	Nadas (2)	0,7	7,2	7,9	0.597	4,1	1,9	4,1	0,03	0,33	55	23	22
10	Meyve Bahçesi (2)	1,0	3,8	8,0	0.228	2,1	0,9	3,8	0,01	0,27	68	6	26
11	Tarımdışı (2)	0,5	0,7	7,7	0.545	2,8	1,0	2,6	0,01	0,23	62	16	22
12	Çayır-mera (2)	1,8	5,7	7,8	0.359	2,8	1,8	8,4	0,19	0,23	64	22	14
13	Nadas (3)	2,7	1,1	8,0	0.157	11,7	2,9	11,8	0,15	0,49	41	28	31
14	Nadas (4)	2,9	3,0	8,0	0.207	2,6	3,2	10,1	0,07	0,39	54	26	20
15	Buğday (4)	2,9	1,1	7,6	0.221	1,3	5,5	15,0	0,05	0,59	30	38	32
16	Buğday (5)	0,9	1,3	7,5	0.128	1,5	3,4	8,8	0,00	0,21	62	25	13
17	Çayır-mera (3)	2,0	1,1	6,2	0.131	2,1	8,4	10,8	0,09	0,29	62	24	14
18	Çayır-mera (4)	7,9	1,1	6,6	0.474		17,2	21,5	0,40	0,31	61	31	8
19	Tarımdışı (3)	0,3	1,6	6,9	0.122	10,2	5,2	18,7	0,03	0,15	58	24	18
20	Sebze	0,9	6,6	8,0	0.212	2,8	2,3	9,7	0,03	0,34	58	27	15
21	Tarımdışı (4)	2,0	14,8	8,0	1.002	0,9	3,6	9,9	0,01	0,70	24	26	50

pH ve EC (1:5) saturasyon ekstraktında yapılmıştır. Tarımdışı araziler üzerinde herhangi bir tarımsal faaliyet yapılmamaktadır ve 6. sınıf arazi olarak değerlendirilebilir.

Tablo 2. Toprak örneklerinin alınma noktalarına göre ortalama izolat sayıları

Toprak	Kullanım Şekli	İzolat Sayısı	Bitki-Bölge	İzolat Sayısı
1	Buğday	2.00 <sup>abcde</sup>		
2	Buğday	2.00 <sup>abcde</sup>		
3	Meyve Bahçesi	2.50 <sup>abcd</sup>		
4	Buğday	2.12 <sup>abcde</sup>		
5	Çayır-mera	2.00 <sup>abcde</sup>		
6	Nadas	3.00 <sup>a</sup>		
7	Kavaklık	2.62 <sup>abc</sup>		
8	Tarımdışı	1.75 <sup>bcd</sup>	Buğday-Rizosfer	2.69 <sup>a</sup>
9	Nadas	2.75 <sup>ab</sup>	Buğday-Kök	2.28 <sup>b</sup>
10	Meyve Bahçesi	2.37 <sup>abcde</sup>	Mısır-Rizosfer	1.59 <sup>c</sup>
11	Tarımdışı	2.12 <sup>abcde</sup>	Mısır-Kök	1.97 <sup>b</sup>
12	Çayır-mera	2.12 <sup>abcde</sup>		
13	Nadas	2.00 <sup>abcde</sup>		
14	Nadas	2.00 <sup>abcde</sup>		
15	Buğday	1.37 <sup>c</sup>		
16	Buğday	1.87 <sup>bcd</sup>		
17	Çayır-mera	2.25 <sup>abcde</sup>		
18	Çayır-mera	2.50 <sup>abcd</sup>		
19	Tarımdışı	1.50 <sup>de</sup>		
20	Sebze	2.37 <sup>abcde</sup>		
21	Tarımdışı	1.62 <sup>cde</sup>		

Aynı harfi bulunduran ortalamalar, Duncan Testi'ne göre istatistiksel olarak ( $p > 0.05$ ) farklı değildir.

### İzolatlarda Gram Reaksiyonu

İzole edilen suşların % 73.5'lik kısmı Gram Negatif, % 24'lük kısmı Gram Değişken ve % 2.5'lük kısmı Gram Pozitif reaksiyon vermiştir (Tablo 3). Buğ-

day bitkisinden elde edilen izolatların 156 adedi Gram Negatif, 42 adedi Gram Değişken ve 6 adedi Gram Pozitif reaksiyon vermiştir. Buğday bitkisinde, Gram negatif suşlar kökteğine göre rizosfer bölgesinde daha fazla iken (1.6 kat), Gram Değişken suşlar kökte daha

fazladır. Öte yandan, mısır bitkisinden elde edilen suşların 99 adedi Gram negatif, 41 adedi Gram Değişken ve 2 adedi Gram Pozitif olarak belirlenmiştir. Mısırdaki Gram Negatif suşlar kökte rizosferdekine göre daha fazladır.

### İzolatlarda Hücre Morfolojisi

*Azospirillum* izolatlarının % 55'lik kısmı spiral, % 9'luk kısmı çubuk, % 7'lik kısmı kok ve % 29'luk kısmı vibroid morfolojiye sahiptir (Tablo 4). Buğday bitkisinden izole edilen suşların, 127 adedi spiral, 55 adedi vibroid, 14 adedi çubuk ve 8 adedi koktur. Buğdayda, rizosferden izole edilen spiral suşların sayısı, kökten elde edilen spiral suşların sayısından daha fazladır. Fakat, buğday izolatlarının diğer formlarında, rizosfer ve kökteki sayılar birbirine yakındır. Mısır bitkisinden izole edilen suşların 64 adedi spiral, 46 adedi vibroid, 17 adedi çubuk ve 15 adedi koktur. Mısırdaki spiral ve vibroid morfolojiye sahip izolatlar, kökte rizosferdekine göre daha fazladır. Öte yandan, mısır bitkisinden çubuk ve kok morfolojisine sahip izolatlar, rizosfer ve kök arasında birbirine yakın dağılmıştır.

Tablo 3. İzolatlarda gram reaksiyonu

Toprak	Gram Negatif		Gram Pozitif		Gram Değişken							
	Buğday	Mısır	Buğday	Mısır	Buğday	Mısır						
	R	K	R	K	R	K						
1	6	2	0	3	1	0	0	0	0	0	0	1
2	3	1	1	6	2	0	0	0	0	1	0	1
3	8	0	4	2	0	1	0	0	2	2	0	1
4	5	1	2	4	0	0	0	0	0	2	1	1
5	3	4	4	2	0	0	0	0	0	0	1	2
6	6	3	4	8	0	0	0	0	0	0	1	0
7	4	3	5	3	0	0	0	0	1	4	0	1
8	4	4	1	1	0	0	0	0	0	0	2	1
9	8	4	2	6	0	0	0	0	0	0	2	0
10	5	7	2	4	0	0	0	0	0	1	1	0
11	5	3	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0
12	2	2	1	2	0	0	0	0	5	1	3	1
13	3	5	3	3	0	0	0	0	0	0	1	0
14	5	5	2	1	0	0	0	2	0	2	2	0
15	3	2	2	3	0	0	0	0	1	0	0	0
16	5	4	1	1	0	0	0	0	0	3	0	0
17	5	4	2	1	0	0	0	0	0	0	3	3
18	3	4	2	2	0	0	0	0	2	4	1	2
19	6	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1
20	1	2	2	2	0	0	0	0	3	2	2	3
21	3	2	1	1	0	2	0	0	1	1	1	1
Toplam	93	63	42	57	3	3	0	2	16	26	22	19
	156		99		6		2		42		41	
%	73,7				2,3				24,0			

R: Rizosfer, K: Kök.

### İzolatlarda Pleomorfizm Oluşumu

İzole edilen mikroorganizmalarda gözlemlenen pleomorfizm durumları Tablo 5'te verilmiştir. Rizosferden elde edilen izolatların yaklaşık olarak % 39'u pleomorfik ve % 61'lik kısmı pleomorfik değildir. Kökten izole edilen suşlarda rizosferdekine benzer şekilde % 37'lik kısmı pleomorfik ve % 63'lük kısmı pleomorfik değildir. Buğdaydan izole edilmiş *Azospirillum* suşlarının yaklaşık % 41'i pleomorfik iken bu oran mısırdaki yaklaşık % 33'tür.

Tablo 4. İzolatlarda hücre morfolojisi

Toprak	Spiral		Çubuk		Kok		Vibroid									
	Buğday	Mısır	Buğday	Mısır	Buğday	Mısır	Buğday	Mısır								
	R	K	R	K	R	K	R	K								
1	6	2	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2	2	2	0	4	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	1	2
3	8	1	3	2	2	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0
4	4	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	2	4
5	2	1	2	1	0	2	0	0	0	0	2	0	1	1	1	3
6	6	3	2	7	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
7	2	4	2	1	0	1	3	0	0	0	0	1	3	2	0	2
8	2	3	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1
9	6	2	1	6	1	0	1	0	0	0	0	0	1	2	2	0
10	3	5	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1
11	3	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	3	0	0	0
12	2	2	3	1	0	0	1	1	0	1	0	1	5	0	0	0
13	3	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
14	3	2	3	3	0	2	1	0	0	1	0	0	2	2	0	0
15	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	2	2	2
16	4	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0
17	2	3	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	1	0	4
18	4	5	1	0	0	0	0	2	0	1	0	1	1	2	2	1
19	6	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
20	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	3	2
21	3	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Toplam	73	54	28	36	7	7	11	6	3	5	6	9	29	26	19	27
	127		64		14		17		8		15		55		46	
%	55,2				9,0				6,6				29,2			

### İzolatların Hareket Yetenekleri

Elde edilen izolatların, % 14'lük kısmı hareketsiz, % 43'lük kısmı az hareketli ve % 43'lük kısmı çok hareketlidir (Tablo 6). Köklerden izole edilen mikroorganizmaların hareketlilik yüzdeleri ile, rizosferden elde edilen mikroorganizmaların hareketlilik değerleri birbirine yakındır. Kök mikroorganizmalarının % 11'i hareketsiz, %44.5'i az hareketli ve %44.5'i çok hareketli iken, rizosfer mikroorganizmalarının % 17'si hareketsiz, % 41'i az hareketli ve % 42'si çok hareketlidir. Benzer durum, mikroorganizmalar, buğday ve mısır bitkilerine göre değerlendirildiğinde de söz konusudur. Buğday bitkisinden elde edilen izolatların % 15'i hareketsiz, % 44'ü az hareketli ve % 41'i çok hareketli iken, mısır bitkisinden izole edilen mikroorganizmaların % 13'ü hareketsiz, % 41'i az hareketli ve % 46'sı çok hareketlidir.

### İzolatların glukozda büyüme yetenekleri

İzole edilen suşların, % 35.5'i glukozu tek karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir (Tablo 7). Köklerden izole edilen glukoz (+) mikroorganizma sayısı, rizosferden izole edilen glukoz (+) mikroorganizma sayısı birbirine yakındır. Öte yandan, buğday kökünden, mısır köküne oranla daha fazla glukoz'da büyüeyebilen *Azospirillum* suşu izole edilmiştir. Buğday bitkisinden izole edilen suşların yaklaşık % 38'i, mısırdan elde edilen izolatların % 32'si glukozda büyüeyebilmektedir.

*Azospirillum* suşlarının bitki büyümesine iki önemli katkısı vardır: (i) indol-asetik asit, gibberillin ve sitokininin gibi fitohormon üretimi (Iosipenko ve Ignatov, 1995; Patten ve Glick, 1996; Rademacher, 1994); (ii) bazı sinyal molekülleri üretimi sonucu bitki

köklerinden proton salınımının artması (Bashan, 1991; Bashan ve Levanony, 1991).

Tablo 5. İzolatlarda pleomorfizm oluşumu

Toprak	Pozitif				Negatif			
	Buğday		Mısır		Buğday		Mısır	
	R	K	R	K	R	K	R	K
1	4	1	0	1	3	1	0	3
2	2	2	1	2	3	0	0	5
3	6	2	2	1	4	1	2	2
4	3	1	1	1	2	2	2	4
5	1	1	1	3	2	3	4	1
6	1	3	0	4	5	0	5	4
7	2	1	1	2	3	6	4	2
8	1	2	1	0	3	2	2	2
9	1	2	0	0	7	2	4	6
10	1	3	1	0	4	5	2	4
11	0	0	0	1	6	3	1	1
12	6	1	0	2	1	2	4	1
13	2	2	2	2	1	3	2	1
14	3	3	2	2	2	4	2	1
15	4	1	2	3	0	1	0	0
16	3	2	1	1	2	5	0	0
17	2	1	0	2	3	3	5	2
18	3	1	1	2	2	7	2	2
19	0	1	0	1	6	3	1	0
20	3	0	1	0	1	4	3	5
21	3	3	0	0	1	2	2	2
Toplam	51	33	17	30	61	59	47	48
%	23,1		12,9		33,0		26,1	

Tablo 6. İzolatların hareket yetenekleri

Toprak	Hareketsiz				Az Hareketli				Çok Hareketli			
	Buğday		Mısır		Buğday		Mısır		Buğday		Mısır	
	R	K	R	K	R	K	R	K	R	K	R	K
1	0	0	0	0	0	1	0	4	7	1	0	0
2	0	0	0	5	3	1	1	2	2	1	0	0
3	1	0	0	0	9	1	0	3	0	2	4	0
4	1	0	0	0	3	3	0	4	1	0	3	1
5	0	0	0	3	2	3	5	0	1	1	0	1
6	3	0	1	6	2	2	2	2	1	1	2	0
7	5	0	0	0	0	7	5	2	0	0	0	2
8	3	1	0	0	1	3	1	1	0	0	2	1
9	6	1	0	0	2	2	2	3	0	1	2	3
10	0	1	0	0	5	3	3	2	0	4	0	2
11	1	0	0	1	5	2	0	1	0	1	1	0
12	1	0	0	0	4	0	0	2	2	3	4	1
13	0	0	0	0	2	1	2	0	1	4	2	3
14	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7	4	3
15	0	0	0	0	1	0	0	1	3	2	2	2
16	3	0	0	0	2	2	0	0	0	5	1	1
17	2	0	2	0	3	2	0	1	0	2	3	3
18	1	0	0	0	0	2	1	1	4	6	2	3
19	0	0	0	0	2	1	0	0	4	3	1	1
20	0	0	0	0	0	1	1	4	4	3	3	1
21	0	0	0	0	3	4	0	2	1	1	2	0
Toplam	27	3	3	15	49	41	23	35	36	48	38	28
%	13,9		42,8		43,4							

Bu çalışmada kullanılan toprak örnekleri, çok farklı şekilde değerlendirilen (buğday, meyve bahçesi, çayır-mera, nadas, kavaklık, tarım dışı) arazilerden alınmış ve her bir toprakta olası *Azospirillum* suşları bulunmuştur. Dünya çapında bölgesel olarak çok geniş bir yayılım gösteren *Azospirillum* cinsi, topraktan, buğdaygil olan ya da olmayan pek çok bitki kökün-

den, ve rizosfer toprağından izole edilmiştir. Aynı toprakta, buğdaydan, mısırdakine göre daha fazla suş izole edilmiştir. Benzer şekilde, glukozu okside eden suşların toplam içindeki oranı, buğday bitkisinde % 38 iken mısırdaki % 32 olmuştur.

*Azospirillum* cinsi Gram-negatif ile Gram-değişken olarak bilinen reaksiyonlar vermektedir. Hareketsiz, büyük ve pleomorfik formda (C-formu) *Azospirillum* hücreleri yaşlı kültürlerde ortaya çıkabilmektedir (Tarrand et al., 1978). Dış hücre zarlarının etrafında bir kapsül oluşan C-formları, *Azotobacter* cinsinde görülen cystlere çok benzemektedir. Bu kapsül, yetersiz su, ağır metallerin varlığı ya da kültürün zamanla yaşlanması gibi olumsuz koşullara dayanıklılığı artırmaktadır (Sadasivan ve Neyra, 1987). C-formları, Gram-boyama işlemi sırasında alkolle yapılan dekolorizasyon (kristal violetin yıkanması) işlemine dayanıklılık gösterdikleri için, kristal violetin mor rengini kaybetmemekte ve mikroskopta Gram-pozitif hücre gibi gözükabilmektedir. Bu durum, *Azospirillum* suşlarında Gram-değişkenliğe neden olabilmektedir.

Tablo 7. İzolatların glukozda büyüme yetenekleri.

Toprak	Pozitif				Negatif			
	Buğday		Mısır		Buğday		Mısır	
	R	K	R	K	R	K	R	K
1	3	1	0	1	4	1	0	3
2	2	2	0	1	3	0	1	6
3	5	2	2	2	5	1	2	1
4	2	1	0	1	3	2	3	4
5	0	1	1	2	3	3	4	2
6	1	3	0	3	5	0	5	5
7	3	0	1	3	2	7	4	1
8	1	1	1	0	3	3	2	2
9	2	1	0	0	6	3	4	6
10	1	1	1	0	4	7	2	4
11	1	0	0	1	5	3	1	1
12	5	1	0	2	2	2	4	1
13	2	2	2	2	1	3	2	1
14	4	3	2	2	1	4	2	1
15	4	1	2	3	0	1	0	0
16	3	2	1	1	2	5	0	0
17	2	2	0	2	3	2	5	2
18	3	1	1	2	2	7	2	2
19	0	1	0	1	6	3	1	0
20	3	0	1	0	1	4	3	5
21	2	3	0	1	2	2	2	1
Toplam	49	29	15	30	63	63	49	48
%	22,5		13,0		36,4		28,0	

*Azospirillum*, yarıkatı, azot-olmayan besiyeri içeren tüplerde, besiyeri yüzeyinin yaklaşık 10 mm altında büyümeye başlamaktadır. Mikrobiyal büyüme daha sonra bu noktadan aşağı doğru balon şeklinde olmaktadır. Büyümenin aşağı doğru olması, bakterinin düşük oksijen (O<sub>2</sub>) konsantrasyonunda azot (N<sub>2</sub>) fikse etmesiyle ilişkilidir. *Azospirillum*, tek karbon kaynağı olarak malat içeren minimal besiyerinin pH'sını alkalileştirmektedir. Bromotimol blue içeren besiyeri renginin yeşilden maviye dönmesi, alkalileşmenin göstergesi olmaktadır. Bu çalışmada elde edilen bütün

izolatlar, *Azospirillum* cinsine ait büyüme özelliklerini göstermiştir.

*Azospirillum* cinsine ait hücreler, genelde, hafifçe kıvrılan (spiral) çubuk şeklindedir. *A. lipoferum* türü, malat içeren azotsuz besiyerinde, zaman içinde, pleomorfik hücrelere dönüşmektedir. Pleomorfizm, uzun-S ve yumurtamsı formlar şeklinde kendini göstermektedir. Öte yandan, *A. brasilense*, vibroid hücreler halinde büyümektedir. Bu çalışmada elde edilen izolatların % 55'i spiral (S-şekilli) ve % 29'u vibroid'tir. Glukozu okside eden suşların yaklaşık % 55'i, mikroskop incelenmesinde S-şekilli hücreler halinde görünürken, % 74'ü pleomorfizm göstermiştir.

*Azospirillum* sıvı besiyeri içinde tek polar flagellum bulunduran hareketli bir türdür. Öte yandan katı besiyerinde pek çok lateral flagelle bulundurur. Bu çalışmada elde edilen izolatların % 86'sı hareketlidir. *A. lipoferum*'a ait hücreler zaman içinde hareket-siz uzun-S formunda hücrelere dönüşebilmektedir. *A. brasilense*, genelde hareketli ve vibroid formda hücreler oluşturur. Öte yandan, eski kültürlerde, hareketsiz, büyük C-formunda (enkapsüle olmuş, hücre içinde fazla miktarda polihidroksibütirat tanecikleri bulunduran hücre tipi) hücreler gözlenmektedir. Hareketlilik, bakteri hücrelerinin kökte kolonize olmasının gerekliliği düşünüldüğünde, bitki-büyümesini-hızlandıran mikroorganizmalar için oldukça önemli bir özellik olarak ortaya çıkmaktadır. *Azospirillum*, önce bitki kök salgılarına doğru kemotaktik bir hareket yapmaktadır (Broek ve ark., 1998). Bakteriler, kök yüzeylerine ilkönce zayıf sonra da oldukça güçlü bir şekilde tutunmaktadır (de Oliveira-Pinheiro ve ark., 2002). Hareket sonucu, kök büyüme noktaları, kılcal kökler ve kök yüzeyleri kolonize olmaktadır. Bakteri hücreleri yine hareketle, kılcal kök hücrelerinin içini de kolonize eder.

Bugüne kadar 7 adet *Azospirillum* türü keşfedilmiştir: (i) *A. lipoferum* (Tarrand et al., 1978); (ii) *A. brasilense* (Tarrand, et al., 1978); (iii) *A. amazonense* (Magalhães ve ark., 1984); (iv) *A. halopraeferens* (Reinhold ve ark., 1987); (v) *A. irakense* (Khammas ve Kaiser, 1991); (vi) *A. largimobile* (Dekhil ve ark., 1997); (vii) *A. doebereinae* (Eckert ve ark., 2001). *A. brasilense* ve *A. halopraeferens* glukozu kullanamazken, *A. doebereinae* suşları glukozu kullanma açısından değişken reaksiyonlar vermiştir. Bu çalışmada, glukozu tek karbon kaynağı olarak kullanabilen izolatlar, kesin olmamak koşuluyla *A. lipoferum* türünde sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada elde ettiğimiz suşların kesin tanıları, 16S rDNA, metabolik özellikler (BIOLOG© ya da VITEK©) ve yağ asitleri metil ester yöntemlerinden biri ya da bir kaçını kullanarak yapılmalıdır. Ayrıca, sonraki aşamalarda, bu izolatların, bitki yetişmesine etkileri, değişik iklim ve toprak koşullarında belirlenmelidir.

#### KAYNAKLAR

Bashan, Y., Holguin, G., de\_Bashan, L.E., 2004. "*Azospirillum*-plant relationships: physiological,

molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003)." Can. J. Microbiol. 50: 521-577.

- Bashan Y. 1991., "Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone cells induced by *Azospirillum brasilense*." Can. J. Microbiol. 37:958-963.
- Bashan Y., Holguin G., 1997. "*Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances." Can. J. Microbiol. 43:103-121.
- Bashan Y, Holguin G., 1998. "Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (Plant growth-promoting bacteria) and PGPB." Soil. Biol. Biochem. 30: 1225-1228.
- Bashan Y, Levanony H., 1990. "Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture." Can. J. Microbiol. 36: 591-608.
- Bashan Y., Levanony H., 1991. "Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*." Plant Soil 137: 99-103.
- Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., 1982. "Total nitrogen. p. 595-622. In A. L. Page et al. (ed.) Methods of Soil Analysis, Part II: Chemical and Microbiological Properties." SSSA Inc., Madison, WI.
- Broek A.V., Lambrecht M., Vanderleyden J., 1998. "Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*." Microbiology 144: 2599-2606.
- Day, P.R., 1965. "Particle fractionation and particle-size analysis. In: CA Black (ed.) Methods of soil analysis, Part I, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 547-565."
- Dekhil S.B., Cahil M., Stackbrandt E., Sly L.I., 1997. "Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov." Syst. Appl. Microbiol. 20: 72-77.
- de-Oliveira-Pinheiro R., Boddey L.H., James E.K., Sprent J.I., Boddey R.M., 2002. "Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings." Plant Soil 246:151-166.
- Eckert B, Weber OB, Kirchhoff G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A., 2001. "*Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*." Int J Syst Evol Microbiol. 51:17-26.
- Iospenko A, Ignatov V., 1995. "Physiological aspects of phytohormon production by *Azospirillum brasilense* Sp7." NATO ASI Ser. G. 37: 307-312.

- Khamnas, K.M., Kaiser, P., 1991. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. Plant and Soil 137: 75-79.
- Kreig N.R., Döbereiner J., 1984. "Genus *Azospirillum*, Tarrand, Kreig ve Döbereiner, 1979, (Effective publication: Tarrand, Kreig ve Döbereiner, 1978, 948), pp.94-104." In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed. Williams, V. And Wilkins, Baltimore.
- Lindsay, W.L., Norwell, W.A., 1978. "Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper." Soil Sci. Soc. Am. J. 42: 421-428.
- Magalhaes, F.M., Baldani, J.I., Souto, S.M., Kuykendall, J.R., Döbereiner, J., 1984. "A new acid tolerant *Azospirillum* species." An. Acad. Bras. Cienc. 55: 417-430.
- Nelson, R.E., 1982. "Carbonate and gypsum. In: Page AL et al. (eds) Methods of Soil Analysis, Part II: Chemical and Microbiological Properties." SSSA Inc., Madison, WI, 181-196.
- Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1982. "Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Page AL et al. (eds) Methods of Soil Analysis, Part II: Chemical and Microbiological Properties. SSSA Inc., Madison, WI, pp. 539-577."
- Okon Y., Labandera-Gonzales C.A., 1994. "Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years world-wide field inoculation." Soil. Biol. Biochem. 26:1591-1601.
- Olsen S.R., Sommers L.E., 1982. "Phosphorus. In: Page AL et al. (eds) Methods of Soil Analysis, Part II: Chemical and Microbiological Properties." SSSA Inc., Madison, WI, pp. 403 - 430.
- Patten C.L., Glick B.R., 1996. "Bacterial bio-synthesis of indole-3-acetic acid." Can. J. Microbiol. 42: 207-220.
- Rademacher W., 1994. "Gibberrillin formation in microorganisms." Plant Growth Regul. 15:303-314.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fenrick, 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 (*Lepthochloa fusca* L. Kunth.)" Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 43-51.
- Rodriguez Caceres E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44: 990-991.
- Sadasivan, L., Neyra, C.A., 1987. "Flocculation of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Exopolysaccharides and cyst formation." J. Bacteriol., 163: 716-723.
- Tarrand, J.J., Kreig, N.R., Döbereiner, J., 1978. "A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov." Can. J. Microbiol. 24:967-980.