جداسازی و گروه بندی جدایه های *Azospirillum* بومی برخی خاک های ایران

محمد حسین ارزانش،[۱]* حشمت الله رحیمیان، حسینعلی علیخانی و کاظم خاوازی

دانشجوی دکتری گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ **mharzanesh@yahoo.com**

استادگروه گیاهپزشکی مجتمع آموزشی دانشگاه مازندران؛ **h.rahimian@gmail.com**

استادیار گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ **halikhan@ut.ac.ir**

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ **kkhavazi@yahoo.com**

چکیده

به منظور جداسازی و شناسایی باکتری های *Azospirillum* بومی خاک های ایران تعداد ۴۰۴ نمونه خاک و گیاه از ۱۲ استان جمع آوری و اقدام به جداسازی *Azospirillum* از آنها شد. یکصد و پنجاه جدایه باکتری که قادر به تشکیل هاله در محیط نیمه جامد فاقد نیتروژن و دارای برموتیمول بلو (NFB) بودند، جدا گردیده و تحت آزمون های مقدماتی شناسایی قرار گرفتند. تعداد ۷۶ جدایه که براساس رشد در محیط حاوی ۳ درصد کلرور سدیم، نیاز به بیوتین،مصرف و تولید اسید از گلوکز، تولید سلول های چند شکلی (پلئومرف) در محیط NFB نیمه جامد، به چهار گونه ی بالقوه تفکیک شدند. ویژگی های فنوتیپی جدایه های بومی با چهار گونه استاندارد جنس *Azospirillum* که شامل، *A.lipoferum*، *A.brasillense*، *A.irakense* و *A.halopraeferense* مقایسه گردیدند. بیشترین تعداد جدایه ها از استان گلستان (۲۵ جدایه) بدست آمد و استان های فارس و خوزستان در مقام های بعدی از لحاظ تعداد جدایه ها بودند. علیرغم وسعت بیشتر سطح و تعداد نمونه برداری ها، کمترین تعداد جدایه از استان خراسان به دست آمد. این یافته می تواند ناشی از سطح پایین مواد آلی و شرایط نامناسب زراعی در خاک های استان خراسان باشد. اکثر جدایه های به دست آمده (۸۰٪) مربوط به ناحیه ریزوسفر گیاهان گرامینه به ویژه گندم بود. در بین جدایه های شناسایی شده جدایه های منتسب به *A. lipoferum* دارای بیشترین فراوانی و گونه های *A.brasillense* و *A.irakense* در مقام های بعدی قرارگرفتند. تنها یک جدایه بالاترین شباهت مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی را با *A.halopraeferense* داشت.

واژه های کلیدی: *Azospirillum*، خاکهای ایران، جداسازی و گروه بندی

مقدمه

باکتری *Azospirillum* در سال ۱۹۲۲ توسط بیجرینک[۲] جداسازی و *Azotobacter spirillum* نامیده شد. در سال ۱۹۲۵ نام این باکتری به *Spirillum lipoferum* تغییر یافت و در سال ۱۹۶۳ نیز توانایی تثبیت نیتروژن آن توسط بکینگ[۳] و با استفاده از روش ایزوتوپی N^{15} مشخص شد. نهایتاً در سال ۱۹۷۸ توسط ترند و همکاران در جنس جدیدی تحت عنوان *Azospirillum* جای داده شد (Dobereiner، ۱۹۹۲).

از ویژگی های مفید این باکتری می توان به تثبیت نیتروژن، تولید هورمونهای محرک رشد گیاه (Michiels و همکاران، ۱۹۸۹؛ Bottini و همکاران، ۱۹۸۹؛ Bartel، ۱۹۹۷) و در نتیجه بهبود جذب آب و عناصر غذایی (Michiels و همکاران، ۱۹۹۱؛ German و همکاران، ۲۰۰۰)، افزایش حلالیت فسفات های

۱- نویسنده مسئول، ادرس: گرگان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، بخش خاک وآب، کد پستی ۵۵۵۷۷- ۴۹۱۵۶

* دریافت: ۸۵/۱۲/۷ و پذیرش: ۸۷/۵/۳

2- Beijerinck
3- Becking

نامحلول (Seshadri و همکاران، ۲۰۰۰)، تولید سیدروفور (Shah و همکاران، ۱۹۹۳)، تولید ویتامین (Dahm و همکاران، ۱۹۹۳)، کنترل عوامل بیماریزا (Bashan و Holguin ، ۱۹۹۷)، رابطه سینرژیستی با سایر باکتری های مفید خاکزی (Bashan و همکاران ۲۰۰۴؛ Burdman و همکاران، ۱۹۹۶)، تولید نیتریت (Bashan و Holguin، ۱۹۹۷)، تولید محصولات صنعتی، زیست پالایی فاضلاب ها (de-Bashan و همکاران، ۲۰۰۴؛ de-Bashan و همکاران، ۲۰۰۲) و تجزیه بقایای سمی (Bashan و Holguin، ۱۹۹۷) اشاره کرد.

جنس *Azospirillum* متعلق به زیر خانواده α-Proteobacteria و از خانوده Spirillaceae می‌باشد. جنس‌های دیگر این خانواده *Aquaspirillum*، *Herbaspirillum* و *Campylobacter* می‌باشند. در همه این جنس‌ها، گونه‌هایی وجود دارند که قادر به تثبیت نیتروژن ملکولی هستند. جنس *Aquaspirillum* از لحاظ شکل (s شکل)، اندازه کوچکتر، داشتن تاژکهای بیشتر و زیستگاه، تفاوتهای اساسی با *Azospirillum* دارد. هم چنین جنس *Herbaspirillum* از لحاظ داشتن ویژگی هایی مثل اندازه کوچکتر، تاژک بیشتر و محل قرارگیری تاژکها و رنگ کلنی (قهوه ای رنگ) روی محیط سیب زمینی آگار (PDA)[1] از جنس *Azospirillum* متمایز می شود. جنس Campylobacter با اندازه کوچکتر، نداشتن رشد در شرایط هوازی، توانایی رشد در شرایط میکروآئروفیلیک، بدون توان تثبیت نیتروژن و داشتن زیستگاه در بدن انسان و حیوانات خونگرم از جنس *Azospriillum* متمایز می شود. از طرفی جنس *Azospirillum* با جنس های دیگر باکتری های تثبیت کننده نیتروژن یک سری شباهت ها و تفاوت هایی دارد.

تاکنون ۹ گونه از این باکتری به نام های *A. brasilense*، *A. lipoferum* (Tarrand و همکاران، ۱۹۷۸)، *A. amazonense* (Magalhaes و همکاران، ۱۹۸۳)، *A. halopraeferens* (Reinhold و همکاران،۱۹۸۷)، *A.irakense* (Khammas و همکاران ۱۹۸۹)، *A.largimobile* (Eckert و همکاران، ۲۰۰۱)، *A.doebereinerae* (Holguin و همکاران، ۱۹۹۹)، *A.oryzae* (Xie و Yokota، ۲۰۰۵) و *A.melinis* (Peng و همکاران، ۲۰۰۶) شناسایی شده اند.

دو گونه *A.lipoferum* و *A.brasiliense* در ۳۰ تا ۹۰ درصد از نمونه های خاک نقاط مختلف دنیا جدا سازی شده اند. اکثر داده های بدست آمده مربوط به گراس ها و گرامینه هاست. این دو اساساً از ریشه غلات اصلی مثل گندم، ذرت، سورگوم و برنج جداسازی شده اند (Dobereiner، ۱۹۹۲). اما روی ریشه گیاهان دیگر نیز یافت می شوند. از مهمترین ویژگی های گونه *A.lipoferum* تولید سلول های چند شکلی (پلئومورف) در محیط قلیایی مالئات، توانایی استفاده از گلوکز و نیاز به بیوتین برای رشد است. کلنی های گونه مزبور روی محیط PDA بعد از ۴۸ ساعت به رنگ خاکستری، صاف و کوچک قابل مشاهده است. بعد از یک هفته این کلنی ها به رنگ صورتی روشن در آمده و سطح آن خشک و موجدار می شود (Dobereiner، ۱۹۹۲). گونه *A.brasilense* با صفاتی همچون عدم رشد روی محیط دارای گلوکز و دارا بودن سلول های متحرک حتی در کشت های کهنه و قلیایی محیط NFB[2] از گونه *A.lipoferum* متمایز می شود. روی محیط کشت های PDA و NFB جامد این گونه قابل تفکیک از گونه *A.lipoferum* نمی باشد (Dobereiner، ۱۹۹۲).

گونه *A. amazonense* از ریشه گیاهان علوفه ای، ریشه درخت خرما در ناحیه آمازون، ریشه بسیاری از گیاهان علوفه ای، ذرت، سورگوم، گندم و برنج در آرژانتین و از ریشه های نیشکر در برزیل، هاوایی و تایلند نیز جدا شده است (Magalhaes و همکاران، ۱۹۸۳). گونه *A.amazonese* از دو گونه *A.lipoferum* و *A.brasilense* کوچکتر بوده و در محیط های کشت حاوی نیتروژن، دانه های پلی بتا هیدروکسی بوتیرات (PHB)[3] بیشتری دارد. هیچ حرکتی روی محیط نوترینت آگار (NA)[4] ندارد (Magalhaes و همکاران، ۱۹۸۳).در محیط کشت NFB نیمه جامد (Dobereiner، ۱۹۹۲) بعد از ۳ تا ۵ روز انکوباسیون در ۳۵ درجه سانتی گراد هاله ای در زیر سطح دیده می شود که بعد از مدتی در اثر تغییر pH از بین می رود. در محیط کشت نیمه جامد LGI[5] (محیط نیمه جامد NFB دارای ۵گرم در لیتر سوکروز به جای اسید مالیک) (Dobereiner، ۱۹۹۲) هاله ای ضخیم در سطح تشکیل داده و رنگ محیط نیز سبز باقی می ماند. در اثر گستردن روی محیط LGI جامد کلنی های کوچک، سفید و حلزونی شبیه به دیگر گونه های *Azospirillum* دیده می شود. روی محیط PDA، کلنی های سفید با قطر ۵ میلی متر با حاشیه برآمده ایجاد می کنند و قادر به تولید

1- Potato Dextrose Agar

2- Nitrogen Free Blue
3- Poly Hydroxy Butirate
4- Nutrient Agar
5- Semi-solid Sucrose Medium

اسید روی محیط PDA (Debereiner، ۱۹۹۲) حاوی مالئات و سوکروز نیست (Magalhaes و همکاران، ۱۹۸۳).

گونه *A.halopraeferens* (Reinhold و همکاران، ۱۹۸۷)، همان طور که از نام آن نیز پیداست با شرایط خاکهای شور سازش یافته است، اما تاکنون فقط از ریشه علف کالار Kallar grass *(Leptochloa fusca L.)* در ایالت پنجاب پاکستان جداسازی شده و کوشش هایی که به منظور جداسازی آن از ریشه های چندین گیاه علفی متأثر از شوری در برزیل صورت گرفت ناموفق بود (Mertens و Hess، ۱۹۸۴؛ Coninck و همکاران، ۱۹۹۸؛ Han و New، ۱۹۹۸). گونه *A.halopraferans* به گونه *A.amazonese* شباهت بیشتری دارد، ولی به دلیل تحمل حرارتی بالاتر و انجام فعالیت نیتروژناری در دمای بالاتر و نیاز به نمک، از این گونه متمایز می شود. pH مناسب برای رشد گونه مذکور ۸ و دمای مناسب رشد آن ۴۱ درجه سانتی گراد است. برای جدا سازی این گونه از محیط اصلاح شده فاقد نیتروژن دارای برموتیمول بلو MNFB[1] (Rehinhold و همکاران ۱۹۸۷; Dobereiner، ۱۹۹۲) استفاده می شود.

گونه A.irakense (Khammas و همکاران، ۱۹۸۹) از ریشه برنج در ناحیه دجله عراق جدا شد. سلول های گونه مذکور به شکل S با یک تاژک قطبی در محیط مایع و تاژک های جانبی روی محیط نوترینت آگاراست. توانایی تثبیت نیتروژن در شرایط میکروآئروفیلی را داشته و از لحاظ مرفولوژیکی خیلی شبیه به گونه *A.amazonese* است. قادر به مصرف ترکیبات قندی مختلف مثل گلوکز، مالتوز، گالاکتوز و آرابینوز است، اما برخلاف *A.amazonese* قادر به استفاده از مانیتول و Myo-inositol نیست. توانایی رشد در محلول ۱ تا ۳ درصد کلرید سدیم را داشته و در pH ۵/۵ تا ۸/۵ نیز رشد می کند. توانایی هیدورلیز آرام پکتین و حرکت روی محیط نوترینت آگار نرم را در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد دارد.

گونه *A.largimobile* بر اساس مطالعه توالی بخش 16s rDNA و هیبریداسیون DNA–DNA، زیر گونه largomobilis از گونه Conglomermonas largomoblilis جدا و به جنس Azospirillum انتقال یافت. نام *A.largomobile* در سال ۱۹۹۷ و متعاقباً با نام اصلاح شده A.largimobile توسط Sly و Stackebrandt در سال ۱۹۹۹ پیشنهاد شد (Eckert و همکاران، ۲۰۰۱).

Kirchhof و همکاران (۱۹۹۷) بعد از آنالیز مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی و مقایسه توالی بخش 16s rRNA گونه جدیدی از *Azospirillum* را بر روی ریشه ها و ریزوسفر دو گونه *Miscanthus senesis* و *Miscanthus Sacchariflorus* جدا سازی کردند. همانند سایر گونه های *Azospirillum*، کلنی های رویش یافته این گونه در محیط دارای معرف کنگوی قرمز[2] (RC) به رنگ قرمز تند بود. در محیط کشت مالئات نیمه جامد فاقد نیتروژن دارای هاله ای[3] در عمق چند میلی متری از سطح که بعداً تا نزدیکی سطح حرکت می کرد، تشکیل می داد. این گونه هیچ رشدی در محیط NFB دارای ۳ درصد کلرید سدیم نداشت و به افتخار خانم دابرنیر *A.doebereinerae* نامیده شد (Eckert و همکاران، ۲۰۰۱).

گونه A. oryzae از ریشه برنج (Oryza sativa L.) توسط Xie و Yokota (۲۰۰۵) جداسازی و به عنوان یک گونه جدید معرفی شد. این گونه براساس آنالیز پلی ژنی و آنالیز توالی بخش 16s rRNA و نیز ویژگی های تاکسونومیکی مانند درصد مولی گوانین و سیتوزین و اسید چرب اصلی متعلق به جنس *Azospirillum* بوده و بر اساس ویژگی های فیزیولوژیکی از گونه های دیگر این جنس متمایز گردید (Xie و Yokota، ۲۰۰۵).

گونه *A.melinis* به عنوان یک باکتری تثبیت کننده نیتروژن ملکولی به وسیله روش احیای استیلن و تکثیر PCR قطعات ژن nif H از ریشه علفی به نام Molasses grass (*Melinis minutiflora* L.) توسط Peng و همکاران (۲۰۰۶) جداسازی شد و بر اساس الگوی نقوش پروتئینی، هیبریداسیون DNA، توالی ژن 16s rRNA و ویژگی های مرفولوژیکی در جنس *Azospirillum* قرار گرفت. آنالیز پلی ژنی توالی ژن16s rRNA نشان داد که این باکتری تثبیت کننده نیتروژن متعلق به جنس *Azospirillum* بوده و بیشترین تشابه را با گونه *A.lipoferum* داشت. در ادامه براساس ویژگی های فنوتیپی با استفاده از پلیت های Biolog Micro و مقایسه اسیدهای چرب مشخص شد که این جدایه با گونه *A.lipoferum* تفاوت دارد و بر این اساس نام *A.melinis* برای آن پیشنهاد شد (Peng و همکاران، ۲۰۰۶).

اولین قدم برای بهره گیری از این باکتری مفید، جداسازی و شناسایی گونه های مختلف آن از گیاهان میزبان مورد نظر می باشد. در این تحقیق، سعی گردید تا جدایه های منسوب به این باکتری از اراضی زیر کشت گندم (در صورت عدم حضور میزبان از گیاهان دیگر خانواده گرامینه نمونه برداری شد)، در اقلیم های مختلف جدا شده و با مقایسه صفات

1- Modified Nitrogen Free Blue

2- Congo Red

3- Veil –like Pellicle

مرفولوژیکی آنها با جدایه های مرجع، گونه یا گروه آنها از نظر طبقه بندی مشخص شود.

مواد وروش ها

نمونه برداری خاک و ریشه

ابتدا با توجه به سطح زیر کشت گندم و میزان تولید گندم در استانهای مختلف کشور، استان های هدف، مشخص و براساس رده خاک، توپوگرافی و توزیع مناسب نمونه‌ها، محدوده نقاط نمونه برداری روی نقشه علامت گذاری شدند. سپس با استفاده از نقشه و دستگاه GPS[1] منطقه نمونه‌برداری تعیین شد. در هر منطقه مزرعه‌ای را انتخاب و با استفاده از GPS طول و عرض جغرافیایی محل‌های نمونه‌برداری ثبت گردید. اکثر نمونه برداری ها در فصل بهار (بجزء استان اردبیل) که فعالیت جامعه میکروبی در خاک بالاست، صورت گرفت.

در هر نمونه برداری از قسمت های مختلف یک مزرعه بوته‌های شاداب و سالم گیاه (گندم) انتخاب و ریشه همراه با خاک اطراف آن از خاک خارج شد. پس از تکان‌های ملایم، ریشه به همراه خاکهای چسبیده به آن در یک پلاستیک قرارداده شد (حدود یک کیلوگرم) و کیسه ها تا انتقال به آزمایشگاه درون یخچال صحرایی نگهداری شدند. بدین ترتیب ۴۰۴ نمونه خاک و گیاه از ۱۲ استان شامل۴۳ نمونه از اردبیل، ۵۵ نمونه از خراسان، ۵۳ نمونه از خوزستان، ۴۰ نمونه از گلستان، ۵۴ نمونه از فارس، ۷ نمونه از تهران، ۲۱ نمونه از قزوین، ۱۶ نمونه از زنجان، ۲۵ نمونه از کردستان، ۱۲ نمونه از آذربایجان شرقی، ۲۸ نمونه از آذربایجان غربی و۵۰ نمونه از همدان جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال یافت.

این نمونه ها از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری از سطح خاک بصورت تصادفی و بصورت زیگزاگ برداشته شدند. در صورت عدم حضور میزبان اصلی (گندم) از دیگر گیاهان خانواده گرامینه برداشت شد.

جدا سازی و شناسایی مقدماتی جدایه های *Azospirillum*

ده گرم از هر نمونه خاک ریزوسفری به همراه ریشه به ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری حاوی۲۰۰ میلی لیترآب مقطر استریل منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه توسط شیکر با دوران ۱۰۰ دور در دقیقه تکان داده شد. با استفاده از آب مقطر استریل، محتویات ارلن تا 10^{-4}برابر رقیق گردید. مقدار ۰/۱ میلی لیتر از رقت های فوق به لوله های NFB (Dobereiner و Day، ۱۹۷۶؛ Coninck و همکاران، ۱۹۹۸) منتقل و به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از آن لوله هایی که در عمق ۱ تا ۵ میلی متری از سطح محیط کشت دارای یک پرده یا هاله شفاف بودند، برای ادامه آزمایش انتخاب شدند (انتقال ۰/۱ میلی لیتر از باکتری های ناحیه هاله به لوله های حاوی محیط NFB برحسب نمونه تا ۵ بار تکرارشد). سپس یک لوپ پر از هاله به پتری دیش حاوی محیط RC[2] (Caceres، ۱۹۸۲) منتقل و بصورت خطی کشت گردید. پتری دیش های کشت شده برای مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس کلنی های قرمز با حاشیه نامنظم و قوام خشک و چروکیده انتخاب و بر روی محیط PDA (Dobereiner، ۱۹۹۲) و سپس در محیط NFB جامد دارای ۰/۰۲ گرم در لیتر عصاره مخمر بصورت خطی کشت گردیدند (Debereiner، ۱۹۹۲). کلنی های سفید و کوچک در زمینه ای آبی رنگ، حاصل از تغییر pH در ناحیه رشد کرده کلنی، در محیط NFB جامد و همچنین تشکیل کلنی های با اندازه کوچک تا متوسط و به رنگ صورتی تا صورتی کم رنگ و بسیار کمرنگ، سفید متمایل به صورتی (بژرنگ) و سفید مات که از نظر قوام خشک تا موکوئیدی بودند، به عنوان کلنی های *Azospirillum* تلقی شدند (Dobereiner، ۱۹۹۲). از کلنی های رویش یافته روی محیط PDA نمونه های لام میکروسکوپی تهیه و مرفولوژی، آزمون گرم و تحرک آنها (در محیط مایع و نیمه جامدNFB) بررسی شد. جدایه های با توان تشکیل هاله در محیط نیمه جامد NFB، تولید کلنی های کوچک و سفید رنگ روی محیط جامد NFB، ایجاد کلنی های صورتی و سفید روی محیط PDA، حرکت مارپیچی در محیط نیمه جامد و مایع NFB، عدم تشکیل اسپور، شکل میله ای خمیده و واکنش گرم منفی برای مرحله بعد انتخاب شدند (Holt و همکاران، ۱۹۹۴).

ویژگی های فنوتیپی و مرفولوژیکی جدایه های *Azospirillum*

برای این منظور جدایه ها براساس رشد در محیط ۳ درصد کلرور سدیم (Eckert و همکاران، ۲۰۰۱)، نیازمندی به بیوتین، اسیدی کردن محیط کشت پپتون به اضافه گلوکز، توان استفاده از گلوکز (ایجاد هاله در محیط نیمه جامد NFB حاوی ۱۰گرم در لیتر گلوکز به جای اسید مالیک)، تولید اشکال پلئو مرفیک (شکل های مختلط از باسیل وکوکوسی) در محیط NFB نیمه جامد، به چندین گونه تفکیک شدند (Tarrand و همکاران، ۱۹۷۸؛ Holt و

1- Global Positioning System

2- RC medium: K_2HPO_4, 0.5 g; $MgSO_4,7H_2O$, 0.2 g , NaCl, 0.1 g; Yeast extract, 0.5; $FeCl_3.6H_2O$, 0.015; DL-Malic acid , 5.0 g , KOH , 4.8 g; Agar 20 g; The pH was adjusted to 7.0 with 0.1 N KOH , 15 ml of a 1:400 aqueous solution Congo Red ; Distilled water,1000ml.

همکاران، ۱۹۹۴). از بین جدایه های مرحله قبل ۵۰ جدایه که پراکنش بین نمونه ای مناسبی داشتند برای مرحله بعدی انتخاب شدند. گونه های استاندارد از کلکسیون بخش بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب که از مرکز نگهداری میکروارگانیسم ها و کشت های سلولی آلمان (DSMZ)[1] خریداری گردیده بودند تهیه و در این تحقیق استفاده گردیدند.

نتایج و بحث

از مجموع ۴۰۴ نمونه برداشته شده ۳۴۳ نمونه مربوط به مزارع زیر کشت گندم و ۶۱ نمونه مربوط به دیگر خانواده گرامینه بود (جدول۱).

اولین مرحله از انتقال سوسپانسیون خاک ریزوسفری به لوله های حاوی محیط کشت NFB نیمه جامد منجر به تشکیل ۲۰۰ هاله شد. در طی انتقال های بعدی تعداد لوله های دارای هاله به ۱۵۰ لوله تقلیل یافت که ۹۸ لوله مربوط به خاک ریزوسفر گندم و ۵۲ لوله مربوط به خاک های ریزوسفر سایر گیاهان گرامینه بود. این هاله ها عمدتاً در عمق ۳ میلی متری و بعضی از جدایه ها در عمق ۵ میلی متری تشکیل می شدند. هاله های مذکور حاوی مجموعه ای از باکتری های میکروآئروفیلیک تثبیت کننده نیتروژن بودند که می بایستی در مرحله بعدی از یکدیگر تفکیک می شدند.

روش جدا سازی *Azospirillum* در محیط نیمه جامد فاقد نیتروژن دارای معرف رنگی برموتیمول بلو (NFB) روشی ساده و موثر برای جدا سازی باکتری های جنس *Azospirillum* از ریشه و ریزوسفر گیاهان مختلف است (Bashan، ۲۰۰۴، Coninck و همکاران، ۱۹۹۸). این روش برای اولین بار توسط Dobereiner و Day (۱۹۷۶) برای جداسازی باکتری های دی ازتروف همیار پیشنهاد شد. این محیط که دارای مکانیسم حفاظتی ضعیف از آنزیم نیتروژناز، در برابر اکسیژن است، به باکتری های میکروآئرفیلیک اجازه رشد و استفاده از نیتروژن ملکولی را می دهد. آنها در این محیط غشای نازک و پرده مانندی را تشکیل می دهند که در این ناحیه سرعت تنفس با میزان انتشار اکسیژن برابر است. تحت این شرایط قادر به تثبیت نیتروژن ملکولی و رشد هستند. در محیط NFB نیمه جامد هاله به صورت ورقه سفید یا غشای موجدار در زیر سطح تشکیل می شود (Dobereiner، ۱۹۹۲).

طبق نظر Dobereiner و همکاران (۱۹۷۶) جداسازی و تهیه کشت های خالص *Azospirillum* از خاک های نواحی معتدله مشکل بود. Vlassak و Reynders (۱۹۷۸) گزارش کردند که در بسیاری از حالات باکتری های تثبیت کننده به همراه دیگر باکتری ها وجود دارند در نتیجه تهیه جدایه های خالص ساده نبود (Caceres، ۱۹۸۲).این در حالی بود که استفاده از معرف Congo Red برای تشخیص ریزوبیوم ها و دیگر باکتری ها بخوبی شناخته شده بود. لذا محیط کشت RC برای جدا سازی سویه های *Azospirillum* اولین بار توسط Caceres (۱۹۸۲) پیشنهاد شد. این محیط که از لحاظ ترکیب بسیار شبیه به محیط NFB بود، اما به دلیل داشتن عصاره مخمر و معرف رنگی Congo Red با آن تفاوت داشت. کلنی های A.lipoferum و A.brasilense روی محیط مذکور بعد از ۹۶ ساعت به رنگ سرخ، قوام خشک و اندازه کلنی ها بین ۱/۵ تا ۲میلی متر با حاشیه گرد، نامنظم یا موجدار و سطح چروکیده با شیارهای شعاعی از مرکز به راحتی از دیگر باکتری های همیار ریشه (*Bacillus Enterobacter, klebsiella* و *Pseudomonas*) که واجد کلنی های گرد، محدب، شفاف و با حاشیه صاف و یکنواخت جدا می شدند (شکل ۱– الف).

در این تحقیق انتقال سوسپانسیون باکتری از ناحیه هاله به محیط RC باعث تشکیل کلنی به اشکال و ابعاد مختلف شد. در مجموع، پخش ۱۵۰ هاله بر روی محیط کشت RC منجر به تشکیل ۷۶ کلنی قرمز رنگ، با سطح چروکیده و حاشیه موجدار شد. با این وجود علاوه بر *Azospirillum* باکتری های دیگر مانند *Herbaspirillum* (اندازه کوچکتر، تاژک بیشتر و محل قرارگیری تاژکها و تشکیل کلنی قهوه ای رنگ روی محیط سیب زمینی آگار) (Baldani و همکاران، ۱۹۹۵) نیز به صورت کلنی های سرخ رنگ روی محیط RC ظاهر می شدند. برای تفکیک این باکتری ها از جنس *Azospirillum* از محیط کشت های NFB جامد و سیب زمینی آگار استفاده شد.

محیط سیب زمینی آگار (PDA) از مدتها قبل به عنوان یکی از محیط های تفکیکی برای شناسایی باکتری های جنس *Azospirillum* استفاده می شد (Tarrand و همکاران، ۱۹۷۸). بعد از ۴۸ ساعت روی محیط PDA باکتری های *Azospirillum* به رنگ سفید و بصورت صاف و بعد از یک هفته رنگ کلنی ها از سفید به صورتی روشن، قوام خشک و دندانه دار [2] یا کنگره دار دیده می شدند.

در صورتی که به جای اسید مالیک از فروکتوز یا گلوکز به عنوان منبع قندی استفاده می شد،

1- Deutsche van Sammlung van Mikroorganismen and Zellkulturen (German Collection of Mhcroorganisms and Cell Cultures)

2- Wrinkled

کلنی های *Azospirillum* به رنگ سفید، درشت و چسبنده ظاهر می شدند.

نتایج حاصله از آزمایش کشت جدایه ها روی محیط PDA نشان داد که سه نوع کلنی با رنگ های صورتی، سفید، کرم و زرد قادر به رشد روی آن محیط بودند. درصد فراوانی جدایه هایی که در محیط PDA کلنی های صورتی، سفید، کرم وزرد تشکیل داده بودند به ترتیب فراوانی مربوط به استانهای گلستان، فارس، خراسان و خوزستان بودند (جدول ۱).

جدایه های انتخابی به محیط کشت NFB جامد حاوی ۰/۰۲ درصد عصاره مخمر انتقال داده شدند (Dobereiner ،۱۹۸۸). مقدار نیتروژن موجود در این محیط کشت بسیار پایین بود در نتیجه باکتری هایی چون *Azospirillum* که در شرایط هوازی قادر به تثبیت نیتروژن نباشند کلنی ریزی (قطر کلنی از کمتر از ۱ میلی متر تا ۲ میلی متر) را روی این محیط تشکیل می دادند، ولی باکترهای دیگر همچون *Azotobacter* می توانست روی این محیط به دلیل داشتن توان تثبیت هوازی نیتروژن کلنی های بزرگی (قطر کلنی بیشتر از ۳میلی متر) را تشکیل دهد. با استفاده از این محیط باکتری های *Azospirillum* از باکتری های دیگر تفکیک می شدند. نتایج کشت ۷۶ جدایه انتخابی روی این محیط نشان داد که تمام ۷۶ جدایه، کلنی های ریزی را روی محیط NFB جامد تشکیل دادند و با رشد کلنی ها رنگ محیط کشت اطراف کلنی از سبز به آبی تغییر یافت.

نتایج بررسی های میکروسکوپی نشان داد که تمام جدایه های انتخابی گرم منفی و متحرک بوده و از لحاظ مرفولوژی قابل تقسیم در سه گروه کلی بودند. گروه اول شامل ۲۶ جدایه و به شکل ویروگول مانند (ویبروئیدی)، گروه دوم با ۴۰ جدایه به شکل میله ای خمیده بلند (S بلند) و گروه سوم با ۱۰جدایه به شکل میله ای خمیده کوتاه (S کوتاه) در زیر میکروسکوپ قابل شناسایی بودند. از لحاظ فراوانی در استان های مختلف بیشترین تعداد جدایه های ویبروئیدی، میله ای بلند خمیده ومیله ای کوتاه خمیده به ترتیب مربوط به استانهای قزوین، گلستان و گلستان بود (جدول ۱). لذا بر اساس شکل باکتری و رنگ کلنی روی محیط PDA این ۷۶ جدایه در سه گروه مختلف تقسیم بندی شدند که ویژگی های دیگر این جدایه ها در جدول ۲ آورده شده است.

استان های گلستان، فارس، خراسان، خوزستان و قزوین، اردبیل و همدان، آذربایجان شرقی، آذربایجان شرقی و تهران و در نهایت استان کردستان به ترتیب ۳۲/۸۹، ۱۳/۸۶، ۱۰/۵۳، ۵/۲۶ و ۲/۶۳ و صفر درصد از *Azospirillum* های خاک ریزوسفری را به خود اختصاص دادند.

کم بودن در صد جداسازی *Azospirillum* از خاک برخی مناطق می تواند به کمی مواد آلی و شرایط نامناسب زراعی مناطق نمونه برداری شده نسبت داده شود. به طور مثال باشان و همکاران (۱۹۹۵) نیز تعداد باکتری های *Azospirillum* را در خاک های مناطق معتدله و خشک همچون مکزیک، اسرائیل و آمریکا کم گزارش کردند. آنها مقدار رس، نیتروژن، ماده آلی و ظرفیت نگهداری آب خاک را از عوامل موثر بر بقاء *Azospirillum* اعلام کردند (Bashan، ۱۹۹۵).

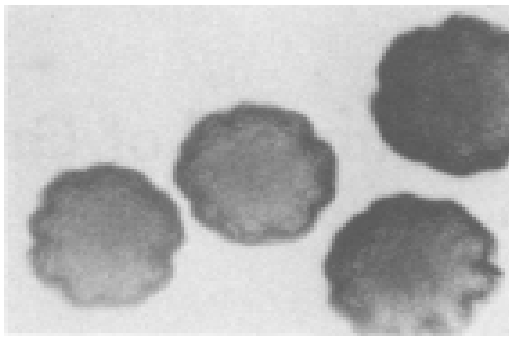
آزمون های تکمیلی که به منظور شناسایی گونه های *Azospirillum* روی جدایه ها صورت گرفت، نشان داد که۱۴ جدایه توانایی رشد در محیط NFB نیمه جامد حاوی ۳ درصد کلرید سدیم را داشته و ۴۹ جدایه توانایی استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربنی را دارا بودند و ۲۸ جدایه نیازی به بیوتین برای رشد خود نداشتند (جدول ۳). براساس این ویژگی ها جدایه های مزبور قابل تفکیک به چهار گروه متفاوت بودند. تعداد گونه های منسوب به *A.brasilense*، *A.lipoferum*، *A.irakense* و *A.halopraeferense* برابر با ۳۴، ۲۸، ۱۳ و ۱ جدایه به ترتیب بود (جدول ۳).

بیشترین تنوع گونه ای مربوط به استانهای خراسان، گلستان، فارس، خوزستان و قزوین بود. همچنین جدایه AZ53 بیشترین شباهت از لحاظ خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی با گونه *A.halopraeferense* را نشان داد. این جدایه از ریزوسفر گندم و از استان خراسان جداسازی شد. بررسی های بیشتر و آزمایشات ملکولی برای تأیید صحت گونه مذکور پیشنهاد می شود.

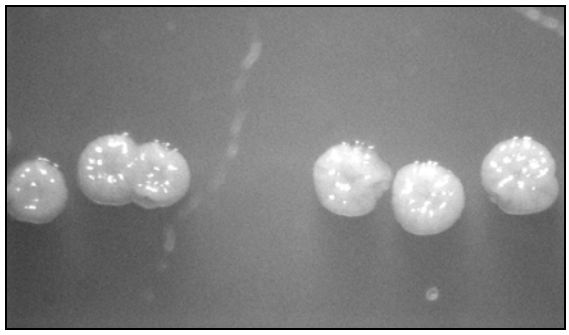
جدول۱ - استانهای نمونه برداری شده، تعداد نمونه های برداشت شده از هراستان، زمان نمونه برداری و خلاصه بعضی از آزمایشات مربوط به شناسایی جنس *Azospirillum*

استان های نمونه برداری شده	زمان نمونه برداری	تعداد نمونه های گیاهی			تشکیل هاله در لوله های نیمه جامد			تشکیل کلنی قرمز رنگ روی محیطRC			شکل میکروسکوپی سلول ها درمحیط NFB نیمه جامد[3]			رنگ کلنی روی محیط PDA		
		گندم	گیاهان دیگر	کل	گندم	گیاهان دیگر	کل	گندم	گیاهان دیگر	کل	ویبروئیدی	میله ای خمیده بلند	میله ای خمیده کوتاه	صورتی	سفید	کرم وزرد	درصدفراوانی جدایه ها[2]
اردبیل	اسفند	۲۰	۲۳	۴۳	۲	۶	۸	۲	۲	۴	۳	۰	۱	۴	۰	۰	۵/۲۶
خراسان	خرداد	۵۲	۳	۵۵	۸	۴	۱۲	۸	۱	۹	۱	۶	۲	۷	۱	۱	۹/۲۱
خوزستان	اردیبهشت	۵۳	۰	۵۳	۱۲	۳	۱۵	۷	۱	۸	۲	۶	۰	۷	۱	۰	۹/۲۱
گلستان	خرداد	۳۰	۱۰	۴۰	۱۴	۷	۲۱	۱۶	۹	۲۵	۵	۱۶	۴	۲۱	۱	۳	۲۷/۶۳
فارس	خرداد	۳۷	۱۷	۵۴	۵	۵	۱۰	۵	۴	۱۰	۳	۵	۲	۱۰	۰	۰	۱۳/۱۶
تهران	خرداد	۴	۳	۷	۱۰	۳	۱۳	۲	۰	۲	۲	۰	۰	۲	۰	۰	۲/۶۳
قزوین	خرداد	۱۷	۴	۲۱	۷	۳	۱۰	۷	۱	۸	۶	۲	۰	۴	۲	۲	۵/۲۶
زنجان	خرداد	۱۶	۰	۱۶	۸	۲	۱۰	۲	۰	۲	۱	۱	۰	۲	۰	۰	۲/۶۳
کردستان [1]	خرداد	۲۵	۰	۲۵	۸	۲	۱۰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
آذربایجان غربی	خرداد	۱۲	۰	۲۸	۸	۵	۱۳	۲	۰	۲	۱	۱	۰	۲	۰	۰	۲/۶۳
آذربایجان شرقی	خرداد	۲۷	۱	۱۲	۹	۸	۱۷	۱	۱	۲	۱		۱	۲	۰	۰	۲/۶۳
همدان	خرداد	۵۰	۰	۵۰	۹	۴	۱۳	۴	۰	۴	۱	۳	۰	۲	۲	۱	۲/۶۳
جمع	–	۳۴۳	۶۱	۴۰۴	۹۸	۵۲	۱۵۰	۵۷	۱۹	۷۶	۲۶	۴۰	۱۰	۶۲	۷	۷	۸۲/۸۸
درصد فراوانی [4]	–	۸۴/۹	۱۵/۱	۱۰۰	۶۵/۳	۳۴/۷	۱۰۰	۷۵	۲۵	۱۰۰	۳۴/۲۱	۵۲/۶۳	۱۳/۱۶	۸۱/۵۸	۱۸/۴۲	۱۸/۴۲	–

۱- نمونه های خاک وریشه کردستان درلولهNFB نیمه جامد هاله تشکیل دادند، اما به دلیل آلودگی زیاد از جداسازی آنها صرفنظر شد. ۲- درصد فراوانی جدایه ها از تقسیم تعداد کلنی های صورتی رنگ روی محیط PDA بر کل کلنی های جدا شده روی محیط RC. ضربدر ۱۰۰ حاصل شده است. ۳- شکل سلول در محیط NFB نیمه جامد بعد از تشکیل کلنی ها روی محیط RC تعیین شد. ۴- درصد فراوانی از تقسیم مجموع تعداد هر ستون بر ستون کل بدست آمده است.



الف- عکس گرفته شده توسط Caceres ، ۱۹۸۲



ب - شکل کلنی جدایه شماره AZ10 در بررسی حاضر

شکل۱- کلنی های *Azospirillum* بعد از ۹۶ ساعت رشد روی محیط RC

جدول ۲- ویژگیهای فنوتیپی و مرفولوژیکی جدایه های *Azospirillum* بومی خاک های ایران

ویژگیهای فنوتیپی ومرفولوژیکی	جدایه ها							
	گروه اول			گروه دوم		گروه سوم		
ایجاد هاله در محیط NFB نیمه جامد	AZ64	AZ46 AZ63	AZ2 AZ8 AZ9 AZ10 AZ21 AZ26 AZ32 AZ33 AZ36 AZ37 AZ41 AZ42 AZ43 AZ44 AZ47 AZ48 AZ50 AZ58 AZ65 AZ66 AZ67 AZ70 AZ75	AZ7	AZ11 AZ23 AZ29 AZ34 AZ45 AZ56 AZ60 AZ61 AZ68	AZ51 AZ53 AZ38 AZ22 AZ2	AZ61 AZ49 AZ52 AZ69	AZ1 AZ3 AZ4 AZ5 AZ6 AZ12 AZ13 AZ14 AZ16 AZ18 AZ19 AZ21 AZ24 AZ25 AZ27 AZ28 AZ30 AZ31 AZ39 AZ54 AZ55 AZ57 AZ59 AZ62 AZ71 AZ72 AZ73 AZ74 AZ76
تشکیل کلنی ها روی محیط کشت RC:								
قرمز تند	+	+	+	+	+	+	+	+
دیگر رنگها	−	−	−	−	−	−	−	−
تولید کلنی های سفیدروی محیط NFBجامد :								
ریز(۱-۲میلی متر)	+	+	+	+	+	+	+	+
متوسط تا درشت (بیش از ۲ میلی متر)	−	−	−	−	−	−	−	−
شکل باکتری درزیرمیکروسکوب :								
ویبروئیدی	+	+	+	−	−	−	−	−
میله ای کوتاه خمیده (S کوتاه)	−	−	−	+	+	−	−	−
میله ای بلند خمیده (Sبلند)	−	−	−	−	−	+	+	+
تشکیل کلنی روی محیط PDA به رنگ :								
صورتی	−	−	+	−	+	−	−	+
سفید	−	+	−	−	−	+	−	−
کرم تا زرد	+	−	−	+	−	−	+	−

AZ77* (*A.lipoferum*),AZ78**(*A.brasillense*),AZ79 ***(*A.irakense*),AZ80****(*A.halopraeferense*)

جدول ۳- آزمون های تکمیلی برای شناسایی گونه های جنس *Azospirillum*

ویژگیهای فیزیولوژیکی	جدایه ها			
	گروه اول	گروه دوم	گروه سوم	گروه چهارم
	AZ1 AZ7 AZ15 AZ20 AZ21 AZ27 AZ34 AZ41 AZ42 AZ44 AZ55 AZ63 AZ67 AZ79*	AZ4 AZ5 AZ6 AZ9 AZ10 AZ13 AZ18 AZ22 AZ24 AZ25 AZ26 AZ28 AZ30 AZ31 AZ38 AZ39 AZ40 AZ45 AZ48 AZ51 AZ52 AZ54 AZ56 AZ57 AZ59 AZ60 AZ61 AZ62 AZ69 AZ71 AZ72 AZ73 AZ74 AZ76 AZ77**	AZ2 AZ3 AZ8 AZ11 AZ12 AZ14 AZ16 AZ17 AZ19 AZ23 AZ29 AZ32 AZ33 AZ35 AZ36 AZ37 AZ43 AZ46 AZ47 AZ49 AZ50 AZ58 AZ64 AZ65 AZ66 AZ68 AZ70 AZ75 AZ78***	AZ53 AZ80****
رشد در محیط NFB نیمه جامد بعلاوه۳ درصد کلرید سدیم	+	−	−/+	+
توانایی استفاده از گلوکز	+	+	−	−
اسیدی کردن محیط ۰/۲٪ پپتون حاوی۱٪ گلوکز	−	+	−	−
نیاز به بیوتین برای رشد	_/+	+	−	+
تولید سلولهای پلئومرف در محیط NFB نیمه جامد	+	+	−	−

AZ77 (A.lipoferum),AZ78**(A.brasillense),AZ79 ***(A.irakense),AZ80****(A.halopraeferense)*

جدول ۴- پراکنش گونه های *Azospirillum* در استان های مختلف

استان	جدایه ها			
	A.irakense	***A.brasilense***	***A.lipoferum***	***A.halopraeferense***
اردبیل	AZ42-AZ44	AZ43	AZ45	
خراسان	AZ55	AZ58	AZ54 AZ56 AZ57 AZ59 AZ60 AZ61	AZ53
خوزستان	−	AZ70 AZ75	AZ69 AZ71 AZ72 AZ73 AZ74 AZ76	
گلستان	AZ1 AZ7 AZ15 AZ18 AZ-20 AZ21	AZ2 AZ3 AZ8 AZ11 AZ12 AZ14 AZ16 AZ19 AZ23	AZ4 AZ5 AZ6 AZ9 AZ10 AZ13 AZ22 AZ24 AZ25	
فارس	AZ27 AZ34	AZ29 AZ32 AZ33 AZ35	AZ26 AZ28 AZ30 AZ31	
تهران	AZ41	AZ36	−	
قزوین	AZ63	AZ37 AZ46 AZ64 AZ65	AZ38 AZ62	
زنجان	−	AZ47	AZ39	
آذربایجان غربی	−	−	AZ40 AZ48	
آذربایجانشرقی	AZ67	AZ68	−	
همدان	−	AZ45 AZ50	AZ51 AZ52	

فهرست منابع:

1. Baldani, V. L. D., Olivares, F. & Dobereiner, J. 1995. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with ^{15}N-labelled fertilizer. In International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Nitrogen Fixation, pp. 202-203. Edited by R. M. Boddey & A. S. de Resende. Rio de Janeiro: EMBRAPDA.
2. Bartel, B. 1997. Auxin biosynthesis. Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.48:51-66.
3. 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.
4. Bashan, Y., and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). Can. J. Microbiol. 43: 103–121.
5. Bashan, Y., Puente, M.E., Rodriguez-Mendoza, M.N., Toledo, G., Holguin, G. , Ferrera-Cerrato, R., and Pedrin, S.1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1938-1945.
6. Bashan, Y., and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990–1996). Can. J. Microbiol. 43: 103–121.
7. Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R.P. 1989. Identification of gibberellins A1, A3 and iso A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol. 90:45–47.
8. Burdman, S., Kigel, J., Okon, Y. 1996. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol. Biochem. 29:923–929.
9. Caceres, E. A. R. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44: 990–991.
10. Coninck, K. D., Horemans, S., Randombage, S. and Vlassak, K.1998. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. Plant Soil 110: 213-218.
11. Dahm, H., Róz˙ycki, H., Strzelczyk, E, Li, C.Y. 1993. Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures. Z. Mikrobiol. 148:195–203.
12. de-Bashan ,L.E., Moreno, M., Hernandez, J.P., and Bashan, Y. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Water Res. 36: 2941–2948.
13. de-Bashan, L.E., Hernández, J.P., Morey, T., and Bashan, Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: A novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Res. 38: 466–474.
14. Dobereiner, J. 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum. In:* The Prokaryotes. Eds. A. Balows, H G Truper, M Dworkin, W Harger and K-H Schleifer. pp. 2236–2253. Springer Verlag, New York.
15. Döbereiner, J., and Day, J.M. 1976. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. *In* Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation. *Edited by* W.E. Newton and C.J. Nyman. Washington State University Press, Pullman, Wash. pp. 518.538.
16. Eckert B, Weber O M, Kirchhof G, Halbritter A, Stoffels M and Hartmann A .2001. *Azospirillum doebereinerae* sp. nov., a new nitrogen fixing bacteria associated with the C4-grass *Miscanthus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:17–26.
17. German, M.A., Burdman, S., Okon, Y., Kigel, J. 2000. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. Biol. Fertil. Soils 32: 259–264.
18. Han, S. O. and New, P. B. 1998. Isolation of *Azospirillum* spp. From natural soils by immunomagentic separation. Soil. Biol. Biochem. 30: 975-981.

19. Holguin, G., Patten, C.L., and Glick, B.R. 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. Biol. Fertil. Soils 29: 10–23.
20. Holt, J. G., Krieg, N R, Sheath , P. H. A., Staley, J .T., Williams, S. T.1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.William and Wilkins. Baltimore
21. Khammas, K.M., Ageron, E., Grimont, P.A.D., and Kaiser, P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140: 679–693.
22. Kirchhof, G., Reis, V. M., Baldani, J. I., Eckert, B., Do$ bereiner, J. & Hartmann, A. 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant Soil* 194, 45±55.
23. Magalhães, F.M., Baldani, J.I., Souto, S.M., Kuykendall, J.R., Döbereiner, J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. Ann. Acad. Braz. Cienc. 55:417-430.
24. Mertens, T. and Hess, D.1984. Yield increase in spring wheat (*Triticum asetivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. Plant Soil 82: 87-99.
25. Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Gool, A. 1989. *Azospirillum* plant root association: A review. Biol. Fertil. Soils 8:356–368.
26. Michiels, K.W., Croes, C.L., and Vanderleyden, J. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137: 2241-2246.
27. 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. .Int J Syst Evol Microbiol .56: 1263-1271.
28. Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielemans S, De Ley J .1987. *Azospirillum halopraeferense* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.). Int. J. Syst. Bacteriol. 37:43-51.
29. Seshadri, S., Muthukumarasamy, R., Lakshminarasimhan, C., and Ignacimuthu, S. 2000. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. Curr. Sci. 79: 565–567.
30. Shah, S., Rao, K.K., Desai, A.1993. Production of catecholate type of siderophores by *Azospirillum lipoferum* M. Indian J. Exp. Biol.31:41–44.
31. Tarrand, J.J., Kreig, N.R., Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with a descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerink) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24:967-980.
32. Vlassak, K., Reynders, L.1978. Associative dinitrogen fixation in temperate regions, p. 71. In Isotopes in biological dinitrogen fixation (Proceedings of the Advisory Group, Vienna, November 1977). International Atomic Energy Agency, Vienna.
33. Xie, C.H., Yokota, A. 2005. *Azospirillum oryza* sp.nov. , a nitrogen–fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1435-1438.