บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

การบ่งเอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 3LSO1 พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน มีทั้งที่อยู่เดี่ยวๆ และเป็นกลุ่ม ไม่สร้างสปอร์ ให้ผล catalase และ oxidase เป็นลบ เจริญบนอาหาร MacConkey agar เฟอร์เมนต์น้ำตาลแลคโตส และจากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการร่วมกับการใช้ชุดวิเคราะห์ API-20E พบว่าตรงกับเชื้อ *Citrobacter* sp. จากรายงานการวิจัยพบว่าเชื้อ *Citrobacter* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ในดิน มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ Magnani *et al.* (2010) สามารถคัดแยกเชื้อ *Citrobacter* sp. ได้จากส่วนของลำต้นของอ้อยในบราซิล จัดเป็น endophyte ที่อยู่ในกลุ่ม Gammaproteobacteria (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006) นอกจากนี้ยังคัดแยกได้จากกล้วย

สุวรรณา และคณะ (2553) รายงานการใช้เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (NFB) ในรูปสารแขวนลอยเชื้อ 5 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อไอโซเลท 1LS6pH7w, 5LSO2, 3LSO1, 1LSO1 และ 2LApH7 เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในกระถาง โดยเก็บผลเมื่ออ้อยอายุ 2 เดือน พบว่าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 โดยพบว่าเมื่อปลูกอ้อยในกระถางร่วมกับการใส่เชื้อแต่ไม่ใส่ปุ๋ยยูเรีย (N0) จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดีที่สุด ใกล้เคียงกับการปลูกอ้อยที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ยยูเรียในปริมาณครึ่งอัตรา (N1/2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Suman *et al* (2005) ที่รายงานว่าการเติม NFB ในดินที่มีธาตุไนโตรเจนเพียงครึ่งอัตรา (N1/2) จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดีกว่าการปลูกอ้อยที่ใส่เชื้อและเติมธาตุไนโตรเจนเต็มอัตรา (N1) ทั้งการงอกของต้น ความสูง และน้ำหนักต้นและรากแห้ง ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของตำรับกล้าเชื้อ NFB ในงานวิจัยนี้จึงใช้ตำรับการปลูกที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการไม่ใส่ปุ๋ยยูเรีย (N0) และใส่ในปริมาณครึ่งอัตรา (ในรายงานวิจัยนี้จะใช้สัญลักษณ์ N เพื่อความสะดวก) แต่เนื่องจากการใช้สารแขวนลอย NFB โดยตรงเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยไม่สะดวกในการนำไปใช้จริงในสภาพการปลูกอ้อย งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนารูปแบบการผลิตและขยายกล้าเชื้อ NFB เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยภายใต้สภาวะเรือนทดลอง โดยใช้วัสดุทางการเกษตร 2 ชนิด ได้แก่ พีท (P) และเวอร์มิคูไลท์ (V) เพื่อเป็นวัสดุยึดเกาะ (carrier material) ของเชื้อ NFB และเปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีส่วนประกอบของไนโตรเจนได้แก่ LB medium และ LGIP medium ตามลำดับ เป็นแหล่งของธาตุอาหารในการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งเปรียบเทียบสภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อ NFB ที่ห้องเย็น (10°C) และอุณหภูมิห้อง (25-30°C) เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในวัสดุการเกษตรแต่ละชนิดพบว่า พีทมีความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารมากกว่าเวอร์มิคูไลท์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณอินทรียวัตถุและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่ง

Weiss *et al*. (1987) รายงานว่า การใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเชื้อแบคทีเรียเจริญจะส่งผลให้สารอินทรียวัตถุในพีทเปลี่ยนรูปเป็นสารพิษที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้มากกว่าเวอร์มิคูไลท์ ในส่วนของงานวิจัยครั้งนี้ การผลิตกล้าเชื้อ NFB ด้วยวัสดุการเกษตรและเก็บที่อุณหภูมิแตกต่างกันในเวลาที่กำหนด ตรวจพบปริมาณเชื้อ NFB ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นจากวันเริ่มต้นซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ NFB มีความสามารถอยู่รอดและเชื้อเพิ่มปริมาณได้ดีในทั้ง 2 อุณหภูมิที่ศึกษา แสดงว่าเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้แม้จะอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำ (10°C) การที่เชื้อเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังจากเก็บไว้ 30 DAF และ 60 DAF อาจเป็นเพราะการเตรียมกล้าเชื้อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ LGIP ซึ่งมีสารอาหารที่เพียงพอที่จะทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนในวัสดุการเกษตรได้ดี

การทดสอบการคงประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ NFB ที่เตรียมจากตำรับการเตรียมและเก็บกล้าเชื้อตำรับต่าง ๆ ทั้งหมด 8 ตำรับ ที่เก็บเป็นเวลา 30 และ 60 วัน (30 DAF และ 60 DAF) เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยทดสอบโดยใช้อ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 ปลูกในดินที่มีคุณภาพต่ำโดยเฉพาะปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมดที่ตรวจพบเพียง 0.028% โดยปลูกร่วมกับการใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 0 และ 75 kg N/ha (N0 และ N ตามลำดับ) เป็นเวลา 120 วันแล้วตรวจสอบการเจริญเติบโตของอ้อยเปรียบเทียบกับการทดลองกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่กล้าเชื้อ NFB แต่ใส่วัสดุการเกษตรแทนการใส่กล้าเชื้อ NFB โดยการทดลองแบ่งเป็น 2 ครั้งที่มีความแตกต่างกันของฤดูการปลูก ดังนี้ การปลูกครั้งที่ 1 ใช้ตำรับกล้าเชื้อ NFB ที่ 30 DAF ซึ่งปลูกอ้อยในช่วงหน้าแล้ง เริ่มปลูกในฤดูหนาวและเก็บเกี่ยวในฤดูร้อน (23 ธันวาคม 2554 -23 เมษายน 2555) และการปลูกครั้งที่ 2 ใช้ตำรับกล้าเชื้อ NFB ที่ 60 DAF (เชื้อที่เก็บต่อจาก 30 DAF) ซึ่งเริ่มปลูกอ้อยในช่วงปลายฤดูหนาวและเก็บเกี่ยวปลายฤดูร้อน (14 มกราคม 2554 -14 พฤษภาคม 2555) สภาพอากาศจะมีฝนตกในช่วงเก็บเกี่ยวเดือนพฤษภาคม ส่งผลให้การปลูกครั้งแรกมีปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศต่ำกว่าการปลูกอ้อยครั้งที่ 2 แต่การทดลองทั้ง 2 ครั้ง มีอุณหภูมิเฉลี่ยภายใต้เรือนทดลองไม่แตกต่างกัน (40-45°C) การปลูกอ้อยในระยะเวลาที่แตกต่างกันนี้พบว่าอ้อยมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันนัก โดยการใส่กล้าเชื้อ NFB แต่ละตำรับมีการเจริญเติบโตของอ้อยทางด้านการแตกกอ ความสูง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของต้นและรากอ้อยมากกว่าการทดลองกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่กล้าเชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ยยูเรียระดับเดียวกัน โดยเฉพาะการปลูกอ้อยที่ใส่กล้าเชื้อ NFB จากตำรับที่เตรียมโดยใช้อาหาร LGIP เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (G-RT) ไม่ว่าจะใช้พีท (P) หรือเวอร์มิคูไลท์ (V) และไม่ใส่ปุ๋ยยูเรีย (N0) ทั้งในเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยมากที่สุด ซึ่งเชื้อสามารถเพิ่มการสะสมปริมาณธาตุหลัก N P K ในลำต้น รากอ้อย และดินปลูกได้ดีที่สุด อาจเป็นเพราะอาหาร LGIP เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี N เป็นองค์ประกอบ แต่เชื้อสามารถเจริญได้ดีตั้งแต่ช่วงที่มีการเตรียมกล้าเชื้อและเก็บรักษาเชื้อไว้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถตรึง N จากอากาศมาใช้ในการเพิ่มจำนวนได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในพีท (P) หรือเวอร์มิคูไลท์ (V) ก็อาจมี N ปนอยู่บ้าง การใช้อาหาร LGIP ในการเตรียมเชื้อเปรียบเทียบกับการใช้อาหาร LB นั้น ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อจะสูญเสียคุณสมบัติในการตรึง N หรือไม่หากเตรียมเชื้อโดยใช้อาหารสูตรอุดมที่มี N เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในการเตรียมกล้าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทนี้จึงใช้อาหาร 2 ชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าอ้อยที่ปลูกโดยการเตรียม

เชื้อโดยใช้อาหาร LGIP จะทำให้อ้อยมีการเจริญเติบโตมากที่สุด แต่การใช้อาหาร LB ก็สามารถทำให้อ้อยมีการเจริญเติบโตที่ดีได้เช่นกัน รวมทั้งมีจำนวนกอมากเช่นกัน ซึ่งบางตำรับการทดลองก็ไม่แตกต่างกันมากนัก เพื่อความสะดวกจึงอาจไม่จำเป็นที่จะต้องเตรียมกล้าเชื้อในอาหาร LGIP ซึ่งมีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยากกว่าอาหาร LB จากการนับปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจพบในดินที่ใช้ปลูกอ้อย ลำต้น และรากอ้อย พบว่าในอ้อยที่ปลูกโดยมีการใส่เชื้อ NFB จะมีปริมาณเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมากกับอ้อยที่ปลูกโดยไม่ใส่เชื้อ โดยพบเชื้อ NFB ในอ้อยที่ปลูกโดยใส่เชื้อ NFB จะมีปริมาณเชื้อ NFB ในดินที่ใช้ปลูกอ้อย ลำต้น และรากอ้อยอยู่ระหว่าง 7.0-8.13, 4.13-6.57 และ 3.11-5.07 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อตรวจพบเชื้อ NFB ในดิน ลำต้นและรากเฉลี่ย 1.0.-1.7 log cfu/ml จึงเป็นไปได้ว่าการปลูกในระยะเวลานานขึ้น เชื้อจะยังคงตรึง N จากอากาศมาให้อ้อยได้ตลอดระยะเวลาการปลูก มากกว่าตำรับการทดลองที่ไม่ใส่กล้าเชื้อ NFB ซึ่งในแต่ละการทดลองที่ใส่กล่าเชื้อ NFB ตรวจพบการสะสมธาตุไนโตรเจนทั้งหมดในส่วนของดินปลูกและลำต้นมากที่สุด จากการศึกษาเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และ *Citrobacter* sp. 3LSO1 โดยสุวรรณา และคณะ (2552) พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทนี้เป็นเชื้อ NFB ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีความสามารถในการผลิตสาร indole 3-acetic acid (IAA) ปริมาณ 31.36 และ 23.07 (µg/ml) ตามลำดับ สาร IAA เป็น auxin ที่เป็นฮอร์โมนที่พืชต้องการในการเจริญเติบโต (Govindarajan *et al*., 2007) ดังนั้นนอกการตรึง N จากอากาศแล้ว เชื้อยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยโดยนอกจากการสร้าง IAA แล้ว เชื้อยังอาจช่วยละลายฟอสเฟตและโปแทสเซียมที่มีอยู่ในปริมาณมากในดินแต่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำให้ละลายน้ำทำให้พืชสามารถนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดี ซึ่ง Suman *et al*. (2005) รายงานผลการทดลองใส่เชื้อ NFB ในอ้อยที่ปลูกร่วมกับการใส่ปุ๋ยยูเรีย 3 ระดับ 0, 75 และ 151 kg N/ha พบว่าการใส่เชื้อ NFB ในดินที่มีใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 75 kg N/ha จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดีกว่าการใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 151 kg N/ha ทั้งการงอกของต้น ความสูง และน้ำหนักต้นและรากแห้ง แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) โดยตรึงไนโตรเจนจากอากาศที่มี 3 พันธะให้กลายเป็นแอมโมเนียเพื่อให้อ้อยสามารถนำไปใช้ได้ (Koomnok *et al*, 2007) โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่พบในแบคทีเรียที่อยู่แบบพึ่งพาที่ปมรากจะอาศัยพลังงานจากปมรากเพื่อการเจริญ แต่ในกรณีที่เป็นแบคทีเรียที่ไม่ได้อยู่แบบพึ่งพาที่ปมรากคือพวกที่อยู่เป็นอิสระจะอาศัยพลังงานจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่ในดินหรือจากธรรมชาติ ดังนั้นในดินที่มีธาตุไนโตรเจนต่ำเชื้อจึงสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ดีกว่าในดินที่มีธาตุไนโตรเจนมากเพียงพอเพื่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นพืชที่อยู่ในบริเวณนั้นหรือในกรณีที่เชื้อเป็น endophyte จึงได้รับแอมโมเนียจากการตรึงไนโตรเจนด้วย (Vadakattu and Paterson, 2006) การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ NFB ในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับที่ Oliveira *et al*. (2006) ได้ศึกษาไว้ว่าการปลูกอ้อยโดยใส่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดินที่มีธาตุอาอาหารต่ำจะทำให้อ้อยเจริญได้ดีกว่าการปลูกในดินที่มีธาตุอาหารสูง ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าการใส่กล้าเชื้อ NFB ร่วมกับไม่ใส่ปุ๋ยยูเรีย (N0) มีการเจริญเติบโตของอ้อยมากกว่าการปลูกอ้อยที่ใส่กล้าเชื้อ NFB ร่วมกับปุ๋ยยูเรีย (N) แต่ไม่แตกต่างกันมากนักในบางตำรับการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการปลูกอ้อยในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ มีปริมาณ N ในดิน

น้อยหรือมีปริมาณ N ปานกลาง ร่วมกับการใส่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และหรือเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 จะสารถเพิ่มปริมาณ N ทั้งหมดในดิน ลำต้น และรากอ้อยได้ ดังนั้นการผลิตกล้าเชื้อ NFB ด้วยตำรับต่างๆ ยังคงประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยกระถางได้มากกว่าการทดลองที่ไม่มีการใส่กล้าเชื้อ NFB อีกทั้งเพิ่มความสะดวกในการนำเชื้อ NFB เพื่อใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ในสภาพการปลูกอ้อยได้จริงเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนในการทำเกษตรที่ยั่งยืนในอนาคต

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (NFB) ไอโซเลท 3LSO1 เป็นเชื้อ *Citrobacter* sp.

2. การพัฒนาตำรับ (Formulation) กล้าเชื้อ NFB ทั้ง 8 ตำรับ ได้แก่ การเตรียมกล้าเชื้อในอาหาร LB และ LGIP โดยใช้พีท (Peat) และเวอร์มิคูไลท์ (Vermiculite) เป็นวัสดุยึดเกาะ (carrier materials) เก็บรักษาที่ห้องเย็น (10°C) และอุณหภูมิห้อง (25-30°C) เป็นเวลา 30 และ 60 วัน พบว่าเชื้อ NFB ทั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp., 5LSO2 และ *Citrobacter* sp., 3LSO1 มีปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่าวันที่ 0 ระหว่าง 1-2 log cfu/ml

3. การทดสอบประสิทธิภาพกล้าเชื้อ NFB แต่ละตำรับการเตรียมเชื้อในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ปลูกในดินที่มีคุณภาพต่ำ ร่วมกับการใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 0 และ 0.075 kg N/kg soil (N0, N ตามลำดับ) ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน 2 ช่วง โดยใช้เชื้อที่มีอายุ 30 วัน หลังการพัฒนาเชื้อ (30 DAF) และ 60 DAF ภายใต้สภาวะเรือนทดลองเป็นเวลา 120 วัน หลังจากปลูกอ้อย พบว่าทุกตำรับวิธีการปลูกอ้อยที่ใส่เชื้อ NFB มีการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดีกว่าตำรับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่กล้าเชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ยยูเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทำให้อ้อยมีจำนวนกอ ความสูงเพิ่มขึ้น น้ำหนักสดและแห้งต้น และราก ปริมาณเชื้อ NFB ที่ตรวจพบในดินที่ปลูก ในต้นและราก รวมทั้งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด และโปแทสเซียมทั้งหมดที่ตรวจพบในต้น ราก และในดิน เพิ่มมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ยยูเรียอย่างมีนับสำคัญทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

จักรินทร์ ศรัทธาพร, ปรีชา พราหมณีย์, สุรวิทย์ สุริยพันธุ์ และประสงค์ สิทธิไทย. 2535. ศึกษาผลตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยพันธุ์ 81-1-026 และ 80-1-128, น. 305-313. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2535 อ้อย ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี, สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2549. รายงานผลการสำรวจพื้นที่ปลูกอ้อยด้วยข้อมูลดาวเทียมปีการผลิต 2548/49 (110 หน้า).

สุวรรณา เนียมสนิท, นิภา มิลินทวิสมัย และ ประสิทธิ์ ใจศิล. (2553). การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร่อ้อย. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (35 หน้า).

สุวรรณา เนียมสนิท, นิภา มิลินทวิสมัย และ ประสิทธิ์ ใจศิล. (2553). การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร่อ้อย. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (33 หน้า).

หนึ่ง เตียอำรุง, กมลลักษณ์ เทียมไธสง และ นันทกร บุญเกิด. 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) ว. เทคโนโลยีสุรนารี. 12: 252-261.

Boddey, R.M. and J. Döbereiner 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. Plant and Soil 108: 53-65.

Cattelan, A.J., P.G. Hartel and J.J. Fuhrmann. 1999. Screening for plant-growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J. 63: 1670-1680.

Cavalcante, V.A. and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil 108: 23-31.

Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement and E.A. Barka. 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant deiseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4951-4959.

Govindarajan, M., S.W. Kwon and H.Y. Weon. 2007. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 9971006.

Idris, H. A., N. Labuschagne and L. Korsten. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* rootand crown rot of sorghum in Etiopia. Biological Control. 40: 97-106.

Khalid, A., M. Arshad and Z.A. Zahir. 2004. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. J. APpl. Microbiol. 96: 473-480.

Koomnok C., N. Teaumroong, B. Rerkasem and S. Lumyong. 2007. Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. ScienceAsia. 33: 429-435.

Loiret, F.G., E. Ortega, D. Kleiner, P. Ortega-Rodés, R. Rodés and Z. Dong. 2004. A putative endophyte nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. J. Appl. Microbiol. 97: 504-511.

Magnani, G.S., C.M. Didonet, L.M. Cruz, C.F. Picheth, F.O. Pedrosa and E.M. Souza. 2010. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. Genet. Mol. Res. 9 (1): 250-258.

Mirza, M.S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand and K.A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro.* Plant and Soil. 237: 47–54.

Oliveira, A.L.M., E.L. Canuto, S. Urquiaga, V.M. Reis and J.I. Baldani. 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrphic bacteria. Plant Soil. 284: 23-32.

Reis, V.M., F.L. Olivares and J. Döbereiner. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 401-405.

Reis, V.M., P. E. Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon and J. Caballero-Mellado. 2004. Burkholderia tropica sp. Nov., a novel nitrogen-fixing, plant associated bacterium. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 54: 2155-2162.

Rosenblueth, M. and E. Martínez-Romero. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molec. Plant-Microbe Interactions. 19: 827–837.

Sevilla, M., R.H. Burris, N. Gunapala and C. Kennedy. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}N_2$ incorporation following inoculation of sterile plant with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif$^-$ mutant strains. Molec. Plant-Microbe Interactions. 14: 358-366.

Suman, A., A. Gaur, A.K. Shrivastava and R.L. Yadav. 2005. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plant Growth Regulation. 47: 155–162.

Vadakattu, G. and Paterson. 2006. Free-living bacteria lift soil nitrogen supply. Farming ahead. 169: 40.

Weiss, L. G., M. Bemmett and A.S. Paau. 1987. Production of bacterial inoculants by direct fermentation on nutrient-supplemented vermiculite. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2138-2140.