

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP IAA VÀ CỐ ĐỊNH ĐẠM CỦA VI KHUẨN *GLUCONACETOBACTER* SP. VÀ *AZOSPIRILLUM* SP. ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ CÂY MÍA

Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công¹

ABSTRACT

The ability of synthesis of Indole Acetic acid (IAA) and N-fixing of Gluconacetobacter sp. and Azospirillum sp. isolated from sugarcane were tested for the production of biofertilizer. Among 12 strains of Azospirillum sp. and 14 strains of Gluconacetobacter sp. studied, two strains A1 and G10 which had the highest ability of synthesis of Indole Acetic acid (IAA) and N-fixing were recorded. The amount of IAA and N-fixing of A1 and G10 were 17,748 µg/ml; 2,710 µg/ml; 8,098 µg/ml; 8,772 µg/ml, respectively.

Keywords: biofertilizer, Gluconacetobacter sp., Azospirillum sp., N-fixing, IAA

Title: Investigation of the ability of synthesis of Indole Acetic acid (IAA) and N-fixing of Gluconacetobacter sp. and Azospirillum sp. isolated from sugarcane

TÓM TẮT

Khảo sát khả năng sinh tổng hợp indol acetic acid (IAA) và cố định đạm của vi khuẩn Gluconacetobacter sp. và Azospirillum sp. được phân lập từ cây mía được thực hiện nhằm sản xuất phân bón vi sinh. Trong số 12 dòng vi khuẩn Azospirillum sp. và 14 dòng vi khuẩn Gluconacetobacter sp. đã được khảo sát thì có 2 dòng vi khuẩn A1 và G10 vừa có khả năng tổng hợp IAA vừa có khả năng cố định đạm đạt ở mức cao. Lượng IAA của dòng A1 đạt (17,748 µg/ml); G10 (2,710 µg/ml) và lượng đạm A1 đạt (8,098 µg/ml); G10 (8,772 µg/ml).

Từ khóa: phân vi sinh, Gluconacetobacter sp., Azospirillum sp., cố định đạm, IAA

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Mía được biết đến như là cây công nghiệp lấy đường quan trọng của ngành công nghiệp mía đường ở Việt Nam hiện nay. Mía, cũng như mọi cây trồng khác, muốn sinh trưởng và phát triển tốt phải hấp thu các chất dinh dưỡng từ đất và không khí bằng hình thức chủ yếu là dinh dưỡng khoáng. Ba nguyên tố khoáng chính mà cây trồng thường xuyên sử dụng là N, P, K. Lượng phân đạm chiếm 30% tổng số phân bón cần cho nông nghiệp. Ở Việt Nam, lượng phân đạm bón cho cây cũng tăng dần từ 1.271.000 tấn (2000) đến 1.627.000 tấn (2010) (www.fadinap.org). Tuy nhiên, lượng đạm bón cho cây chủ yếu là đạm hóa học và lượng đạm này cũng chỉ bù đắp được một phần lượng đạm mà cây trồng lấy đi khỏi đất hằng năm. Điều này rất bất lợi đối với người nông dân vốn còn nhiều khó khăn về vốn sản xuất. Lượng phân thừa còn lại trong đất đem lại nhiều tác hại xấu cho môi trường, gây ô nhiễm nghiêm trọng nguồn nước ảnh hưởng trực tiếp đến cuộc sống người dân. Để khắc phục những hạn chế trên của phân hóa học thì việc sử dụng phân sinh học có chứa các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm và kích thích tăng trưởng cho cây trồng như indole acetic acid là một trong những biện pháp có hiệu quả tiết kiệm chi phí sản xuất mà chất lượng và năng suất vẫn tăng.

¹ Viên NC & PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Vi khuẩn *Azospirillum* sp. thuộc chi Rhodospirillales, được biết là những vi khuẩn gram âm, có hình dạng thể xoắn, hơi cong như hình dấu phẩy hoặc dạng xoắn khuẩn, chiều dài khoảng 2,0–3,8 μm và chiều rộng khoảng 1,0–1,5 μm , sinh trưởng tốt ở 30°C.

Gluconacetobacter diazotrophicus là vi khuẩn nội sinh trên cây mía. Đây là loại vi khuẩn gram âm, hiếu khí bắt buộc, chống chịu với axit, nồng độ muối và đường cao (Boddey et al., 1991). Tế bào có hình que thẳng với đầu tròn, chiều rộng 0,7–0,9 μm , chiều dài 1–2 μm . Tế bào được quan sát dưới kính hiển vi có dạng đơn, đôi hay có cấu trúc dạng chuỗi mà không mang nội bào tử (Gillis et al., 1989; Muthukumarasamy et al., 2002). Chúng di chuyển được là nhờ vào roi bên hay roi vành khuyên (Gillis et al., 1989). Khuẩn lạc có màu nâu đậm trên môi trường khoai tây-agar với 10% đường, và màu cam đậm trên môi trường agar nghèo nitơ có chứa bromthymol blue (Cavalcante and Dobereiner, 1988). Việc nghiên cứu khảo sát các dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và *Azospirillum* sp. trong nghiên cứu này nhằm chọn lọc thêm các chủng vi sinh vật có triển vọng hướng tới sản xuất phân đạm sinh học cho cây mía.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Để chọn được dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp IAA và NH_4^+ , nghiên cứu đã tiến hành khảo sát 12 dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. và 14 dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. đã phân lập từ cây mía được cung cấp từ phòng thí nghiệm vi sinh vật- Viện Nghiên Cứu và Phát triển Công nghệ sinh học - Đại học Cần Thơ. Môi trường LGIP lỏng không đạm (Cavalcante VA. và Dobereiner, 1988) được sử dụng để nuôi vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và môi trường NFb lỏng nuôi vi khuẩn *Azospirillum* sp. Pha 15 ml môi trường LGIP (NFb) cho vào các ống nghiệm nắp đen khử trùng nhiệt ướt 121°C trong 20 phút. Để nguội, chủng 1ml vi khuẩn gốc, thí nghiệm lặp lại 3 lần. Nuôi các dòng vi khuẩn trên máy lắc 200 vòng/phút, trùm kín các ống nghiệm trong bọc nylon đen để tránh IAA sinh ra bị phân hủy bởi ánh sáng. Định lượng đạm và IAA do vi khuẩn tổng hợp được qua các ngày 2, 4, 6 (sau khi chủng).

2.1 Định lượng IAA bằng phương pháp Salkowski (Glickmann và Dessaux, 1995)

Hút cẩn thận 1ml phân dịch trong vi khuẩn sau khi ly tâm cho vào các ống duharm. Cho 2 ml thuốc thử Salkowski R2 đã pha ở trên vào các ống duharm trên. Ủ hỗn hợp trên trong tối 10 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn sau đó đo quang phổ OD ở bước sóng 530 nm. Kết quả đo OD của các dòng phân lập được thay vào phương trình đồ thị đường chuẩn (Hình 1), từ đó suy ra được nồng độ IAA của các dòng.

2.2 Định lượng đạm bằng phương pháp Indophenol blue (Page L., Miller R. H. and Keeney R. D. 1982)

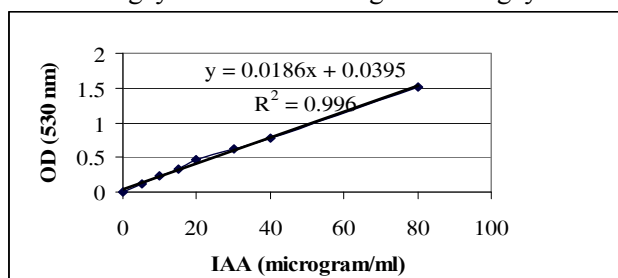
Hút 1 ml dịch vi khuẩn đã ly tâm và thêm 4 ml H_2O ; 5 ml Hypocloride buffer, 5ml thuốc thử phenol nitroprusside. Tiến hành đo phổ OD ở bước sóng 636 nm. Dựa sự thay đổi màu của phản ứng giữa thuốc thử và NH_4^+ nhờ phản ứng giữa phenol và NH_3 dưới sự hiện diện của tác nhân oxy hóa là hypoclorite hình thành phức có màu xanh dưới điều kiện pH kiềm. Kết quả đo OD của các dòng phân lập được

thay vào phương trình đồ thị đường chuẩn (Hình 2), từ đó suy ra được nồng độ NH_4^+ của các dòng.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả định lượng IAA

Kết quả cho thấy tất cả 26 dòng vi khuẩn đều có khả năng tổng hợp ra lượng IAA. Đường chuẩn đo đậm có nồng độ NH_4^+ từ 0 đến 80 ($\mu\text{l/ml}$) (Hình 1). Khả năng tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn nhìn chung tổng hợp đạt lượng ít ở ngày thứ 2, đạt đến đỉnh cao vào ngày thứ 4 và bắt đầu giảm vào ngày thứ 6.



Hình 1: Đường chuẩn IAA tinh khiết từ 0 đến 80 $\mu\text{g/ml}$

* Khả năng tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp.

Ở ngày thứ 2, dòng A1 và A3 tổng hợp IAA cao hơn so với các dòng *Azospirillum* sp. còn lại với lượng IAA lần lượt là 13,843 $\mu\text{g/ml}$; 11,156 $\mu\text{g/ml}$. Đến ngày thứ 4 tăng ở mức cao lần lượt là 17,748 $\mu\text{g/ml}$; 16,778 $\mu\text{g/ml}$. Vào ngày thứ 6 có xu hướng giảm nhẹ do môi trường ít dinh dưỡng hơn so với các ngày trước. So với kết quả nghiên cứu của Bùi Việt Sang (2008) dòng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* R8b2 cũng tổng hợp được lượng IAA cao nhất vào ngày thứ 4 là 11,8 $\mu\text{g/ml}$, Dương Thị Kim Loan (2009) đo IAA của các dòng vi khuẩn phân lập từ ruộng lúa thì có dòng OM8c1 là 15,358 $\mu\text{g/ml}$ thì các dòng vi khuẩn này đạt hàm lượng IAA cao hơn.

Bảng 1: Hàm lượng IAA do các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. tổng hợp

Vi Khuẩn	Hàm lượng IAA $\mu\text{g/ml}$		
	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
A1	13,843 ^a	17,748 ^a	15,634 ^a
A2	8,619 ^{cd}	13,942 ^{bc}	12,723 ^b
A3	11,156 ^b	16,778 ^a	16,405 ^a
A4	6,256 ^c	11,778 ^c	10,858 ^c
A5	9,788 ^{bc}	15,186 ^b	12,922 ^b
A6	10,634 ^b	13,495 ^{cd}	15,373 ^a
A40	5,672 ^e	12,486 ^{cde}	7,163 ^c
A48	7,052 ^{de}	11,996 ^{de}	3,191 ^d
A25	7,284 ^{de}	13,327 ^{cde}	6,354 ^c
A38	6,424 ^e	13,327 ^{cde}	6,780 ^c
A27	6,532 ^e	11,935 ^{de}	6,297 ^c
A33	5,922 ^e	12,394 ^{cde}	5,163 ^{cd}
CV(%)	12,28%	6,22%	13,69%

Trên cùng một cột các giá trị trung bình theo sau cùng một chữ giống nhau thì không khác biệt ở mức 95%.

Như vậy, dòng A1 và A3 có khả năng tổng hợp IAA cao nhất trong các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. được khảo sát vào ngày thứ 4 (khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng khác ở cùng thời điểm) (Bảng 1).

* *Khả năng tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn Gluconacetobacter sp.*

Tương tự các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp., các dòng *Gluconacetobacter* sp. cũng có khả năng tổng hợp IAA tốt nhất ở ngày 4. Sau khi chủng 2 ngày thì các dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. đã tổng hợp IAA nhưng lượng IAA không cao. Nhưng đến ngày 4 thì khả năng tổng hợp IAA tăng cao và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua kiểm định (Bảng 2). Dòng vi khuẩn G8, G9, G10 có khả năng tổng hợp IAA cao nhất vào ngày thứ 4 với lượng IAA lần lượt là 2,938 µg/ml; 3,412 µg/ml; 2,710 µg/ml. Vào ngày thứ 6 khả năng tổng hợp IAA giảm rõ rệt và có sự khác biệt giữa các dòng vi khuẩn

Như vậy, 3 dòng vi khuẩn G8, G9, G10 có khả năng tổng hợp IAA mạnh nhất trong các dòng *Gluconacetobacter* sp. được khảo sát vào ngày thứ 4.

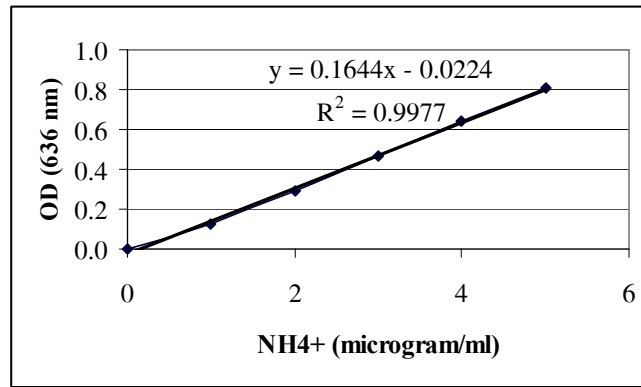
Bảng 2: Hàm lượng IAA do các dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. tổng hợp

Vi khuẩn	Hàm lượng IAA µg/ml		
	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
G1	1,219 ^{cd}	1,728 ^{cd}	1,809 ^{cd}
G2	1,307 ^{bcd}	1,552 ^{cd}	1,863 ^{cd}
G3	1,219 ^{cd}	1,587 ^{cd}	1,593 ^{ef}
G4	1,798 ^{abc}	1,833 ^c	1,575 ^{ef}
G5	1,553 ^{abcd}	1,535 ^{cd}	1,557 ^{ef}
G6	0,991 ^d	1,692 ^{cd}	1,431 ^f
G7	1,360 ^{abcd}	1,482 ^{cd}	2,043 ^{bcd}
G8	1,272 ^{bcd}	2,938 ^{ab}	1,413 ^f
G9	1,553 ^{abcd}	3,412 ^a	1,683 ^{def}
G10	1,904 ^{ab}	2,710 ^b	2,314 ^{abc}
G11	1,588 ^{abcd}	1,657 ^{cd}	2,710 ^a
G12	1,640 ^{abcd}	1,131 ^{cd}	2,241 ^{abcd}
G13	1,570 ^{abcd}	1,008 ^d	2,115 ^{bcd}
G14	2,026 ^a	1,324 ^{cd}	2,494 ^{ab}
CV(%)	23,09%	20,39%	15,82%

Trên cùng một cột các giá trị trung bình theo sau cùng một chữ giống nhau thì không khác biệt ở mức 95%.

Kết quả định lượng đạm

Kết quả cho thấy tất cả 26 dòng vi khuẩn đều có khả năng tổng hợp ra lượng NH₄⁺. Đường chuẩn đo đạm có nồng độ NH₄⁺ từ 0 đến 5 ppm (Hình 2).



Hình 2: Đường chuẩn đo NH₄⁺ từ 0 đến 5 (µg/ml)

* Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp.

Sau hai ngày chủng vi khuẩn, 12 dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. được khảo sát đều có khả năng tổng hợp lượng NH₄⁺ nhưng nồng độ còn thấp. Sau đó, các dòng vi khuẩn bắt đầu tăng hoạt động cố định đạm, lượng NH₄⁺ được tổng hợp tiếp tục tăng dần và đạt nồng độ cao nhất vào ngày thứ 4. Ngày thứ 6, lượng NH₄⁺ giảm.

Trong 12 dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. được khảo sát, có 2 dòng A1 và dòng A6 tổng hợp NH₄⁺ cao nhất ở ngày thứ 4; khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua kiểm định (Bảng 3).

Bảng 3: Hàm lượng NH₄⁺ do các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. tổng hợp

Vi khuẩn	Hàm lượng NH ₄ ⁺ µg/ml		
	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
A1	2,653 ^a	8,098 ^a	3,731 ^a
A2	1,094 ^b	0,644 ^d	0,284 ^c
A3	0,708 ^{bc}	3,236 ^c	1,230 ^b
A4	0,582 ^c	3,418 ^c	0,458 ^c
A5	0,648 ^c	2,826 ^c	0,45 ^c
A6	0,648 ^c	5,297 ^b	0,184 ^c
A40	0,629 ^c	0,622 ^d	0,175 ^c
A48	0,738 ^{bc}	0,605 ^d	0,243 ^c
A25	0,576 ^c	0,643 ^d	0,217 ^c
A38	0,684 ^c	0,575 ^d	0,192 ^c
A27	0,769 ^{bc}	0,577 ^d	0,330 ^c
A33	0,629 ^c	0,575 ^d	0,377 ^c
CV(%)	26,6%	43,09%	48,12%

Trên cùng một cột các giá trị trung bình theo sau cùng một chữ giống nhau thì không khác biệt ở mức 95%.

Ở ngày 2, dòng vi khuẩn A1 tổng hợp NH₄⁺ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua kiểm định so với các dòng vi khuẩn khác với lượng NH₄⁺ là 2,653 µg/ml. Các dòng vi khuẩn bắt đầu tăng hoạt động cố định đạm vào ngày thứ 4. Dòng A1 và A6 tổng hợp NH₄⁺ tăng đáng kể vào ngày thứ 4 với lượng NH₄⁺ lần lượt là 8,09 µg/ml và 5,297 µg/ml (Bảng 3). Khi so với kết quả của Dương Thị Kim Loan (2009) khảo sát khả năng cố định đạm của dòng OM4a1 được phân lập từ ruộng lúa là 2,064 mg/l thì kết quả này khả quan hơn. Các dòng còn lại đều có lượng

NH₄⁺ tăng hơn so với ngày 2 nhưng giữa các dòng không có sự khác biệt đáng kể. Vào ngày thứ 6 lượng NH₄⁺ có khuynh hướng giảm mạnh do môi trường không còn đủ dinh dưỡng.

Như vậy, ngày thứ 4 là thời gian tổng hợp NH₄⁺ cao nhất, có thể so sánh khả năng tổng hợp NH₄⁺ tốt nhất giữa các dòng. Trong đó dòng vi khuẩn A1 và A6 có khả năng tổng hợp NH₄⁺ cao nhất so với các dòng còn lại.

* *Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn Gluconacetobacter sp.*

Sau hai ngày chủng vi khuẩn, tất cả 14 dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. được khảo sát đều có khả năng tổng hợp NH₄⁺ nhưng nồng độ còn thấp. Sau đó, các dòng vi khuẩn bắt đầu tăng hoạt động cố định đạm, lượng NH₄⁺ được tổng hợp tiếp tục tăng dần và đạt nồng độ cao nhất vào ngày thứ 4. Ngày thứ 6, lượng NH₄⁺ giảm mạnh.

Ở ngày 2 các dòng vi khuẩn tổng hợp NH₄⁺ còn thấp. Tương tự các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. được khảo sát ở trên. Khả năng tổng hợp NH₄⁺ của các dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. tăng mạnh rõ rệt vào ngày thứ 4. Trong đó 3 dòng G10, G11, G12 tổng hợp NH₄⁺ cao khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua kiểm định so với các dòng vi khuẩn còn lại với lượng NH₄⁺ ở mức cao nhất lần lượt là 8,772 µg/ml; 9,298 µg/ml; 10,702 µg/ml (Bảng 4). Vào ngày thứ 6 lượng NH₄⁺ giảm mạnh do môi trường nuôi không còn nhiều dinh dưỡng nên khả năng tổng hợp NH₄⁺ của những dòng vi khuẩn này giảm đáng kể.

Như vậy, 3 dòng G10, G11, G12 có khả năng tổng hợp NH₄⁺ cho lượng NH₄⁺ cao nhất vào ngày thứ 4.

Bảng 4: Hàm lượng NH₄⁺ do các dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. tổng hợp

Vi khuẩn	Hàm lượng NH ₄ ⁺ µg/ml		
	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
G1	2,350 ^{bcd}	4,561 ^f	1,323 ^a
G2	4,487 ^a	5,351 ^{def}	2,241 ^a
G3	2,436 ^{bcd}	7,193 ^{bcde}	1,607 ^a
G4	2,265 ^{bcde}	4,825 ^{ef}	2,883 ^a
G5	3,120 ^{bc}	6,579 ^{cdef}	1,323 ^a
G6	1,923 ^{cdef}	7,456 ^{bcd}	0,144 ^a
G7	0,983 ^{fgh}	6,228 ^{def}	3,538 ^a
G8	1,239 ^{defgh}	7,105 ^{bcde}	0,661 ^a
G9	0,641 ^{gh}	7,368 ^{bcd}	1,392 ^a
G10	1,838 ^{defg}	8,772 ^{abc}	2,454 ^a
G11	0,726 ^{fgh}	9,298 ^{ab}	0,382 ^a
G12	1,068 ^{defgh}	10,702 ^{ab}	1,665 ^a
G13	3,376 ^{ab}	5,702 ^{def}	0,289 ^a
G14	0,556 ^{gh}	1,316 ^g	1,233 ^a
CV (%)	34,69%	18,94%	82,53%

Trên cùng một cột các giá trị trung bình theo sau cùng một chữ giống nhau thì không khác biệt ở mức 95%.

4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

Tất cả các dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. và *Gluconacetobacter* sp. được khảo sát đều có khả năng tổng hợp IAA và NH_4^+ , và đạt hàm lượng cao nhất vào ngày thứ 4. Trong 12 dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. và 14 dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. đã khảo sát thì dòng vi khuẩn tổng hợp được IAA đạt lượng cao là: A1 (17,748 $\mu\text{g/ml}$); A3 (16,778 $\mu\text{g/ml}$) và G8 (2,938 $\mu\text{g/ml}$), G9 (3,412 $\mu\text{g/ml}$), G10 (2,710 $\mu\text{g/ml}$). Các dòng vi khuẩn tổng hợp NH_4^+ ở mức cao là: A1 (8,098 $\mu\text{g/ml}$); A6 (5,297 $\mu\text{g/ml}$) và G10 (8,772 $\mu\text{g/ml}$), G11 (9,298 $\mu\text{g/ml}$), G12 (10,702 $\mu\text{g/ml}$). Như vậy, dòng A1 và G10 là 2 dòng vi khuẩn vừa có khả năng tổng hợp IAA vừa có khả năng tổng hợp NH_4^+ đạt hàm lượng cao có triển vọng hướng tới sản xuất phân đạm sinh học cho cây mía.

4.2 Kiến nghị

Tiến hành đánh giá 2 dòng vi khuẩn trên bằng thí nghiệm ngoài đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Việt Sang. 2008. Phân lập và xác định khả năng tổng hợp Indole-3- acetic acid (IAA) của một số dòng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. . Luận văn tốt nghiệp Đại học chuyên ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại Học Cần Thơ.
- Cavalcante V.A. and J. Dobereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108, pp.23-31.
- Dương Thị Kim Loan. 2009. Khả năng cố định đạm tự do trên đất phù sa và đất phèn trồng lúa. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Gillis M., Kersters K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt R.M., Stephan M.P., Teixeira K.R. S., Dobereiner J. and Deley J., 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol 39, No 3, pp. 361-364.
- Glickmann E., Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793-796.
- Muthukumarasamy R., Revathi G., Seshadri S. and Lakshminarasimhan C., 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, Vol. 83, No. 2, pp. 137-145.
- Page L., Miller R. H. and Keeney R. D. (1982). *Methods for Soils Analysis, Part 2: Chemical and Microbial properties*, 2nd edition. American Society of Agronomy Incorporation. USA.