

Research Article

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระที่แยก จากดินรอบรากข้าวในการผลิตออกซินและจิบเบอเรลลิน

Study on the efficiency of free-living nitrogen fixing bacteria isolated from rice rhizospheresoil on auxin and giberellin production

จตุพร บุญณาดากุล^{1*}, สิริภรณ์ ชื่นบาล², ชื่นบาล ศรีกาญจนา คล้ายเรือง³, อ๋าทอง³
และ พันธุ์พล สินธูยา⁴

Chatuporn Boonnadukul^{1*}, Siraporn Cheunbarn², Tapan Cheunbarn², Srikanjana Klayraung¹,
Supatida Aumtong³ and Panlop Sintuya⁴

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

²สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

³สาขาวิชาปฐพีศาสตร์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

⁴สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

¹Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290, Thailand

²Program in Environmental Technology, Faculty of Science, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290, Thailand

³Program in Soil Science, Faculty of Science, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290, Thailand

⁴Institute of Product Quality and Standardization, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290, Thailand

*E-mail: boonnadukul@gmail.com

Received: 27/08/2018; Revised: 25/01/2019; Accepted: 06/02/2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระที่แยกจากดินรอบรากข้าวในการผลิตออกซินและจิบเบอเรลลิน เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าวจากพื้นที่แตกต่างกัน แบคทีเรียที่แยกได้นับปริมาณโคโลนีด้วยวิธี plate count ผลการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินแปลงปลูกข้าวอินทรีย์ 183 ไอโซเลท ปริมาณโคโลนี 1.6×10^6 - 2.0×10^7 cfu/g และได้จากตัวอย่างดินของแปลงปลูกข้าวเคมี 127 ไอโซเลท ปริมาณโคโลนี

1.2×10^3 - 1.9×10^5 cfu/g ทดสอบการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี bromothymol blue reagent indicator และการคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระพบ 26 ไอโซเลท ทดสอบการผลิตออกซินของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้โดยใช้ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นและวิเคราะห์ปริมาณของออกซินโดยวิธี Salkowski coloring reagent ผลการทดสอบพบแบคทีเรีย 6 ไอโซเลทที่ผลิตออกซินได้มากที่สุดโดยใช้ทริปโตเฟนความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$ และไอโซเลท PY7-6 ผลิตออกซินมากที่สุด 23.9 mg/L ในส่วนไอโซเลทอื่นได้แก่ LP8-1, CR1-2, CM12-4, PY7-5 และ CM5-2 ผลิตออกซินได้ 7.0 -22.3 mg/L การทดสอบการผลิตจิบเบอเรลลินและวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินโดย HPLC พบว่ามี 2 ไอโซเลทได้แก่ CM12-4 และ LP8-1 ซึ่งสามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้ 13.74 และ 3.94 mg/L ตามลำดับ การจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ลำดับของยีน 16S rRNA บ่งชี้ว่ามี 4 สายพันธุ์ได้แก่ CM12-4 (*Pantoea agglomerans*), LP8-1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), PY7-5 (*Bacillus cereus*) และ PY7-6, CR1-2 และ CM5-2 (*Pseudomonas nitroreducens*) สรุปได้ว่า *Pseudomonas nitroreducens* (PY7-6) ที่ได้จากการศึกษานี้เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระที่ดีที่สุด ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตไนโตรเจนและออกซินเพื่อศึกษาและพัฒนาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ต่อไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ, ออกซิน, จิบเบอเรลลิน, ดินรอบรากข้าว

Abstract

This research aimed to study the efficiency of free-living nitrogen fixing bacteria isolated from the samples of rice rhizosphere soil on auxin and gibberellin production. The samples of the rhizosphere soil were collected from different areas. The amount of colony of isolated bacteria was counted by using plate count method. The result revealed that 183 isolated bacteria were obtained from soil samples of the organic rice fields, the amount of colony at 1.6×10^6 - 2.0×10^7 cfu/g and the 127 isolated bacteria were obtained from soil samples of the chemical rice fields, the amount of colony at 1.2×10^3 - 1.9×10^5 cfu/g. Nitrogen fixation was tested by using bromothymol blue reagent indicator method and selecting of free-living nitrogen fixing bacteria was found of 26 isolates. Auxin production test of the selected nitrogen fixing bacteria was conducted by using tryptophan as an initial substance and the amount of auxin was analyzed by using Salkowski coloring reagent method. The result showed that 6 isolates produced the most auxin by using tryptophan concentrations of 1,000 $\mu\text{g/mL}$ and the isolate PY7-6 produced the most auxin of 23.9 mg/L, while the rest, LP8-1, CR1-2, CM12-4, PY7-5 and CM5-2, produced auxin from 7.0 to 22.3 mg/L. Gibberellin production test and gibberellin content analysis by HPLC revealed that 2 isolates: CM12-4 and LP8-1 could produced gibberellin at 13.74 and 3.94 mg/L, respectively. Classification of bacteria from sequence analysis of the 16S rRNA gene indicated that there were 4

species: CM12-4 (*Pantoea agglomerans*), LP8-1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), PY7-5 (*Bacillus cereus*) and PY7-6, CR1-2 and CM5-2 (*Pseudomonas nitroreducens*). In conclusion, *Pseudomonas nitroreducens* (PY7-6) was the best free-living nitrogen fixing bacteria from this study which had the efficiency to produce nitrogen and auxin for further study and develop as biofertilizer.

Keywords: free- living nitrogen fixing bacteria, auxin, gibberellin, rice rhizospheresoil

บทนำ

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) มีความสัมพันธ์กับการเจริญของพืชและความอุดมสมบูรณ์ของดิน แบคทีเรียกลุ่ม PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรอบรากพืช ซึ่งกลไกระหว่างแบคทีเรียกับพืชเกิดขึ้นอย่างสลับซับซ้อนและพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ไม่เพียงแต่ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างแบคทีเรียกับพืชเท่านั้น ยังรวมถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งจากสิ่งที่มีและไม่มีชีวิตซึ่งเกิดขึ้นบริเวณรอบรากพืช (Dutta & Podile, 2010) เนื่องจากดินเขตรอบรากพืชเป็นบริเวณที่รากพืชแตกออกเพื่อดูดซับธาตุอาหาร และรากพืชสามารถดูดซับธาตุอาหารนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ช่วยแปรสภาพธาตุอาหารให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ (Van Overbeek & Van Elsas, 2008)

จุลินทรีย์บางสายพันธุ์มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตเป็นอิสระ (non-symbiosis nitrogen fixing bacteria) และสามารถผลิตฮอร์โมนซึ่งเป็นสารกระตุ้นการเจริญของพืช ดังเช่น กรดอินโดลอะซิติก (indole acetic acid: IAA) และกรดจิบเบอเรลลิน (GA_3) เป็นต้น (Laskar & Sharma, 2013) จุลินทรีย์ใช้กลไกหลายอย่างเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชโดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มที่อาศัยบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และไนเตรด (NO_3^-) ที่พืชสามารถดูดซับใช้เพื่อการเจริญได้ (Hayat et al., 2010; Khan, 2005) แบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์กรดอินโดลอะซิติกได้ดังเช่น *Azotobacter chroococcum* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่สามารถผลิตสารประกอบฮอร์โมนพืช และละลายฟอสเฟต (Abdel-Aziez et al., 2014)

ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญสำหรับการเจริญของพืช โดยเฉพาะข้าวเป็นพืชที่ต้องการธาตุไนโตรเจนในปริมาณสูงเพื่อสร้างผลผลิต เมื่อดันข้าวได้รับไนโตรเจนอย่างเพียงพอจะทำให้มีการเจริญดี ใบมีสีเขียว ทำให้ต้นข้าวสูง แดงออกได้มาก และมีจำนวนเมล็ดข้าวต่อรวงมาก ทำให้ได้ผลผลิตสูง นอกจากนี้ฮอร์โมนพืชที่มีในโตรเจนเป็นองค์ประกอบได้แก่ ออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโทไคนินมีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งของเซลล์ เร่งการขยายขนาดของเซลล์ ควบคุมการแตกของราก ป้องกันการร่วงของใบ ช่วยในการงอกของเมล็ด ส่งเสริมการสร้างโปรตีน และการเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร (Taiz & Zeiger, 2006) จากการศึกษาแบคทีเรีย

Azospirillum lipoferum strain RSWT1 และ *Pseudomonas* strain Ky1 ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว JP5 และเพิ่มผลผลิตข้าวได้ร้อยละ 18 และ 13.8 ตามลำดับ (Bashir et al., 2013)

การใช้ปุ๋ยชีวภาพหรือจุลินทรีย์เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจอย่างกว้างขวาง ที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตข้าวและการลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมระบบนิเวศเกษตร ประโยชน์จากแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากชั้นบรรยากาศ ซึ่งประกอบด้วยไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของแก๊สไนโตรเจนมีมากถึงร้อยละ 78 แบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนจึงใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ รวมทั้งการผลิตฮอร์โมนพืชสังเคราะห์ ออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโทไคนิน เป็นต้น ซึ่งพืชได้รับประโยชน์จากฮอร์โมนในการกระตุ้นการงอกของเมล็ด การเจริญของราก และทำให้พืชดูดซับอาหารในดินได้มากยิ่งขึ้น (Khan et al., 2016; Phookkasem et al., 2011) ถึงแม้ว่าจะเป็นที่ยอมรับกันดีถึงผลการศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม PGPR ที่เกิดประโยชน์ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชแต่กลไกการทำงานในระดับโมเลกุลของฮอร์โมนก็ยังไม่เป็นที่ทราบได้ชัดเจน (Babalola, 2010)

จึงเห็นได้ว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระพบได้หลากหลายชนิดที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชมีคุณสมบัติแตกต่างกันสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญของข้าวได้ การใช้ปุ๋ยชีวภาพประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ และสามารถเปลี่ยนธาตุอาหารให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ โดยผ่านกระบวนการทางชีวภาพ (Dhevendaran et al., 2013) ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอินโดลแอซิดิก (ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกกรดอินโดลแอซิดิกโดยใช้ชื่อของกลุ่มฮอร์โมนแทนว่า “ออกซิน”) และจิบเบอเรลลิน และจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อค้นหาแบคทีเรียที่มีศักยภาพเหมาะสมในการศึกษาและพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพส่งเสริมการเจริญของข้าวได้ต่อไป

วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ($p < 0.05$) โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าวระดับความลึก 15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นระดับชั้นดินที่สำคัญประกอบด้วยอินทรีย์วัตถุ (Pennock et al., 2008) จำนวน 40 ตัวอย่าง ใสในถุงพลาสติกที่ปิดผนึกและติดฉลากโดยกำหนดสถานที่และรหัสตัวอย่างดิน เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณแปลงปลูกข้าวจากพื้นที่แตกต่างกัน 4 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา และลำพูน จากพื้นที่แปลงนาของเกษตรกรที่ทำการปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องไม่น้อยกว่า 5 ปี โดยแบ่งพื้นที่ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกข้าวอินทรีย์ (วิธีการปลูกข้าวในระบบเกษตรอินทรีย์) 2) เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกข้าวเคมี (วิธีการปลูกข้าวโดยใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมีกำจัดศัตรูพืช)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างดินปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 mL นำไปเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ทำการเจือจางเป็นลำดับส่วนแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) จนได้ระดับความเจือจาง 10^{-6} จากนั้น นำมาเกลี่ยบนผิวน้ำอาหารวุ้น TSA (tryptic soy agar) ด้วยวิธี spread plate แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ 3 ซ้ำ แล้วนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี plate count มีหน่วยเป็น colony forming unit (cfu) คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มีลักษณะแตกต่างกันโดยใช้ลูปแตะเชื้อมาขีดลาก (streak plate) บนอาหารวุ้น เอียง TSA บนจานอาหารใหม่จนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วจึงเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง TSA เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

นำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบ โดยถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารวุ้นเอียง TSA ในอาหารเหลวสูตร N-free medium ปริมาตร 3 mL บ่มเชื้อในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อที่ความยาวคลื่นที่ 600 nm โดยใช้ spectrophotometer ปรับให้มีการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ถ่ายเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 0.2 mL ลงในอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid media) สูตร N-free bromothymol blue medium ปริมาตร 3 mL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี bromothymol blue reagent indicator (Dobereiner et al., 1976) โดยแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ สีของอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นสีน้ำเงิน วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl

4. การทดสอบปริมาณออกซิน

การทดลองที่ 1 นำเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ได้จากการทดสอบปริมาตร 0.2 mL ใส่ลงในอาหารเหลว TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 nm ปรับให้ได้ 0.1 และดูดใส่ในอาหารเหลว TSB ที่เติมทริปโตเฟน (tryptophan) ที่มีความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 5 mL บ่มเป็นเวลา 3 วัน โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี เมื่อแบคทีเรียผลิตออกซินจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู เข้ม วิเคราะห์ปริมาณออกซินด้วยวิธี Salkowski colouring reagent (Ahmad et al., 2008; Bharucha et al., 2013) โดยนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เก็บสารละลาย ส่วนใสปริมาตร 0.5 mL แล้วเติม reagent ปริมาตร 0.5 mL (FeCl_3 0.5 mol ละลายใน 35% HClO_4) นำไปบ่มที่ อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลานาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 535 nm โดย spectrophotometer แล้วนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟค่ามาตรฐาน

การทดลองที่ 2 ทดสอบการผลิตออกซินโดยใช้ทริปโตเฟน (tryptophan) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันโดย ถ่ายเชื้อแต่ละไอโซเลตที่สามารถผลิตออกซินได้จากการทดลองที่ 1 ปริมาตร 0.2 mL ใส่ลงในอาหารเหลว TSB บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายความยาวคลื่น 600 nm ปรับให้ได้ 0.1 แล้วดูดใส่อาหารเหลว TSB ที่เติมทริปโตเฟนที่มีความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 5 mL บ่มเป็นเวลา 3 วัน และวัดปริมาณออกซินด้วยวิธี Salkowski colouring reagent

5. การทดสอบปริมาณจิบเบอเรลลิน

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร LGLP medium ประกอบด้วย ซูโครส 100 g/L, K_2HPO_4 0.2 g/L, KH_2PO_4 0.6 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02 g/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002 g/L, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.1 g/L และ Bromothymolblue 0.025 g/L ปรับค่า pH 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เขย่า 80 rpm เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมา sonicate เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยง 10,000xg เป็นเวลา 30 นาที ปรับค่า pH 3.0 ด้วย HCl และทำการชะด้วย ethyl acetate อัตราส่วน 1:3 จำนวน 3 รอบ นำส่วนที่รวมกับ ethyl acetate ที่แยกชั้นอยู่ด้านบนมาระเหยด้วย evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและความดัน 240 จนกระทั่ง ethyl acetate ระเหยแล้วจึงชะด้วย methanol แล้ววัดหาปริมาณของจิบเบอเรลลินโดยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Tang et al., 2011)

6. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rRNA

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (protein precipitation solution รหัส A7951, บริษัท Promega Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากนั้นนำดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ primer คือ 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA -3') นำ PCR Product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis) จากนั้นนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA fragments extraction kit (รุ่น 70 bp-20 kb DNA fragments, Cat. Number GMB100, บริษัท Geneaid Biotech Ltd., ประเทศไทย) นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของชิ้น 16S rRNA โดยจัดส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรีย

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากข้าวได้ 310 ไอโซเลต แยกได้จากแปลงปลูกข้าวอินทรีย์ 183 ไอโซเลต ปริมาณแบคทีเรียมากกว่าแปลงปลูกข้าวเคมี ซึ่งแยกเชื้อได้ 127 ไอโซเลต การนับปริมาณโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินแปลงปลูกข้าวอินทรีย์ มีปริมาณโคโลนีอยู่ระหว่าง 1.6×10^6 - 2.0×10^7 cfu/g และจากตัวอย่างดินแปลงปลูกข้าวเคมี มีปริมาณโคโลนีของแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 1.2×10^3 - 1.9×10^5 cfu/g (ตารางที่ 1)

2. การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ 26 ไอโซเลต และมีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่ผลิตไนโตรเจนได้สูง โดยมีไอโซเลต CM2-2 ผลิตไนโตรเจนได้สูงสุด 15.6 mg/L รองลงมา คือ CM5-2 และ PY5-2, LP1-5, CR6-7

และ PY7-6 ผลิตไนโตรเจนได้ 8.4, 7.7 และ 6.3 mg/L ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ผลิตไนโตรเจนได้น้อยกว่า อยู่ระหว่าง 1.4-5.6 mg/L (ตารางที่ 2)

3. การทดสอบปริมาณออกซิน

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตออกซินของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 26 ไอโซเลท เมื่อใช้ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้น 600 µg/mL แบคทีเรียที่สามารถผลิตออกซินได้มี 6 ไอโซเลท และนำแบคทีเรียที่ได้ มาทดสอบความสามารถในการผลิตออกซินโดยใช้ทริปโตเฟนความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 µg/mL พบว่า ปริมาณออกซินเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของทริปโตเฟนที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3) และแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท ผลิตออกซินได้มากที่สุดเมื่อใช้ทริปโตเฟนความเข้มข้น 1,000 µg/mL เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ ไอโซเลท PY7-6, LP8-1, CR1-2 และ CM12-4, PY7-5 และ CM5-2 ผลิตออกซินได้ 23.9, 22.3, 8.2-8.5, 7.5 และ 7.0 mg/L ตามลำดับ (รูปที่ 1)

4. การทดสอบปริมาณจิบเบอเรลลิน

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลินของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 26 ไอโซเลท พบว่ามี 2 ไอโซเลท คือ CM12-4 และ LP8-1 สามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้ 13.74 mg/L และ 3.94 mg/L ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถผลิตได้ทั้งจิบเบอเรลลินและออกซิน (ตารางที่ 4)

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rRNA

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่สามารถผลิตออกซินและจิบเบอเรลลินได้ พบว่ามี 6 ไอโซเลทจำแนกชนิดของแบคทีเรียพบว่ามี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas nitroreducens* (PY7-6, CR1-2 และ CM5-2) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ผลิตออกซินได้ 23.9, 8.5 และ 7.0 mg/L ตามลำดับ และ *Bacillus cereus* (PY7-5) ผลิตออกซินได้ 7.5 mg/L มี 2 สายพันธุ์ที่ผลิตได้ทั้งออกซินและจิบเบอเรลลินคือ *Stenotrophomonas maltophilia* (LP8-1) ผลิตออกซินและจิบเบอเรลลินได้ 22.3 และ 3.94 mg/L และ *Pantoea agglomerans* (CM12-4) ผลิตออกซินและจิบเบอเรลลินได้ 8.2 และ 13.74 mg/L ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1. ปริมาณโคโลนิของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินแปลงปลูกข้าวอินทรีย์และแปลงปลูกข้าวเคมี

พื้นที่ปลูกข้าว	ปริมาณโคโลนิ (cfu/g)	
	แปลงปลูกข้าวอินทรีย์	แปลงปลูกข้าวเคมี
เชิงใหม่	2.0x10 ⁷	2.3x10 ⁴
พะเยา	1.8x10 ⁶	1.9x10 ⁵
เชิงราย	1.6x10 ⁶	1.3x10 ⁴
ลำพูน	2.3x10 ⁶	1.2x10 ³

ตารางที่ 2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่แบคทีเรียผลิตได้

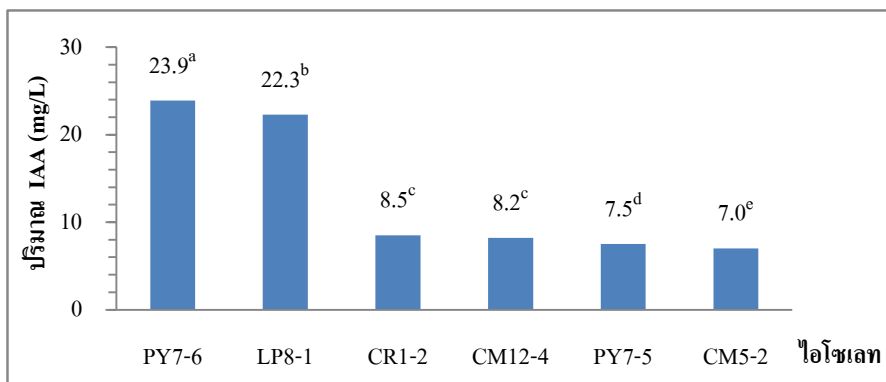
ลำดับ	ไอโซเลท	ไนโตรเจน (mg/L)	ลำดับ	ไอโซเลท	ไนโตรเจน (mg/L)
1	CM2-2	15.6 ^a	14	CM2-3	4.2 ^{ef}
2	CM5-2	8.4 ^b	15	CM12-4	4.2 ^{ef}
3	PY5-2	8.4 ^b	16	LP8-1	4.2 ^{ef}
4	LP1-5	7.7 ^b	17	LP2-5	3.5 ^{fg}
5	CR6-7	6.3 ^c	18	LP4-10	3.5 ^{fg}
6	PY7-6	6.3 ^c	19	CM8-3	2.8 ^{gh}
7	CM11-6	5.6 ^{cd}	20	CM9-3	2.8 ^{gh}
8	CM12-6	5.6 ^{cd}	21	CR10-5	2.8 ^{gh}
9	CR9-4	5.6 ^{cd}	22	PY5-3	2.8 ^{gh}
10	LP7-5	4.9 ^{de}	23	CM11-5	2.1 ^{hi}
11	CR3-1	4.9 ^{de}	24	LP3-9	2.1 ^{hi}
12	CR6-2	4.9 ^{de}	25	CR1-2	1.4 ⁱ
13	PY7-5	4.9 ^{de}	26	CR8-6	1.4 ⁱ
F-test		*	F-test		*

*วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ANOVA (p<0.05)

ตารางที่ 3. ปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนผลิตได้โดยใช้ทริปโตเฟนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลท	ปริมาณออกซิเจนตามความเข้มข้นของทริปโตเฟน (mg/L)					
		0	200	400	600	800	1,000 (µg/mL)
1	PY7-6	6.0 ^b	8.6 ^b	10.0 ^a	12.1 ^a	14.9 ^a	23.9 ^a
2	LP8-1	7.5 ^a	9.1 ^a	10.2 ^a	11.6 ^b	14.3 ^b	22.3 ^b
3	CR1-2	5.0 ^c	5.2 ^c	5.5 ^b	6.1 ^c	8.3 ^c	8.5 ^c
4	CM12-4	2.2 ^g	3.3 ^{de}	4.7 ^{cd}	5.8 ^{cd}	6.8 ^d	8.2 ^c
5	PY7-5	2.8 ^f	3.1 ^e	3.0 ^f	4.3 ^e	5.3 ^f	7.5 ^d
6	CM5-2	4.5 ^d	4.9 ^c	5.0 ^c	5.5 ^d	6.0 ^e	7.0 ^c
F-test		*	*	*	*	*	*

*วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ANOVA (p<0.05)



รูปที่ 1. ปริมาณออกซินที่แบคทีเรีย 6 ไอโซเลตผลิตได้มากที่สุดเมื่อใช้ทริปโตเฟนความเข้มข้น 1,000 µg/mL (วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ANOVA, $p < 0.05$)

ตารางที่ 4. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียครึ่งในโตรเจนที่มีประสิทธิภาพในการผลิตออกซิน และจิบเบอเรลลิน

ลำดับ	ไอโซเลต	ออกซิน (mg/L)	จิบเบอเรลลิน (mg/L)	ผลการจำแนกสายพันธุ์
1	PY7-6	23.9 ^a	-	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
2	LP8-1	22.3 ^b	3.94 ^b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3	CR1-2	8.5 ^c	-	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
4	CM12-4	8.2 ^c	13.74 ^a	<i>Pantoea agglomerans</i>
5	PY7-5	7.5 ^d	-	<i>Bacillus cereus</i>
6	CM5-2	7.0 ^e	-	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>

*วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ANOVA ($p < 0.05$)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากข้าว มีปริมาณโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินแปลงปลูกข้าวอินทรีย์มากกว่าแปลงปลูกข้าวเคมี แสดงถึงความอุดมสมบูรณ์ของดินในแปลงปลูกข้าวอินทรีย์มีมากกว่าดินจากแปลงปลูกข้าวเคมี สอดคล้องกับรายงานของ Melero et al. (2006) จากการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของดินแปลงเกษตรอินทรีย์ ซึ่งพบว่าปริมาณอินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส รวมทั้งชีวมวลของจุลินทรีย์ และกิจกรรมของเอนไซม์ในแปลงอินทรีย์เพิ่มขึ้นมากกว่าแปลงเคมีอย่างมีนัยสำคัญ ผลวิเคราะห์ทางชีวเคมีของดินมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและปริมาณธาตุอาหารในดินที่ช่วยปรับปรุงให้คุณภาพของดินดีขึ้น

จากการคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระได้ 26 ไอโซเลท และทดสอบประสิทธิภาพการผลิตออกซิเจนพบว่า แบคทีเรียผลิตออกซิเจนได้มากขึ้นตามความเข้มข้นของทริปโตเฟนที่เพิ่มขึ้นและผลิตออกซิเจนได้มากที่สุดเมื่อใช้ทริปโตเฟนความเข้มข้น 1,000 µg/mL พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตออกซิเจนได้มี 6 ไอโซเลท ได้แก่ PY7-6, LP1-8, CR1-2, CM12-4, PY7-5 และ CM5-2 สอดคล้องกับการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระมี 18 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตออกซิเจนได้และพบ 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตออกซิเจนได้สูง โดยแบคทีเรียสามารถผลิตออกซิเจนได้ในอาหารเหลวที่เติมสารตั้งต้นทริปโตเฟน (Saengsanga, 2014) และจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. ในอาหารที่ปราศจากทริปโตเฟนพบว่าไม่มีการผลิตออกซิเจน แต่ถ้าเพิ่มระดับความเข้มข้นของทริปโตเฟนจาก 50 ถึง 500 µg/mL ปริมาณออกซิเจนก็จะเพิ่มมากขึ้น (Ahmad et al., 2008) และจากการศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินรอบรากข้าว จำนวน 9 ตัวอย่างจากพื้นที่แตกต่างกันในประเทศอินเดีย สามารถแยกแบคทีเรียได้ 53 ไอโซเลท และมี 6 ไอโซเลท ที่ผลิตออกซิเจนได้อยู่ระหว่าง 0.54-14.05 mg/mL โดยใช้สารตั้งต้นทริปโตเฟนความเข้มข้น 5 µg/mL (Singh & Prasad, 2014) จากรายงานดังกล่าวข้างต้น แตกต่างจากการศึกษานี้ ซึ่งคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระได้ *Pseudomonas nitroreducens* (PY7-6) ที่มีประสิทธิภาพผลิตออกซิเจนได้มากกว่า (23.9 mg/L)

งานวิจัยนี้คัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพผลิตออกซิเจนได้มี 6 ไอโซเลท และใน 6 ไอโซเลท มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้ 2 ไอโซเลท จากการจำแนกสายพันธุ์พบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อก่อโรค มี 3 ชนิด คือ *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Pantoea agglomerans* ซึ่งอาจเกิดอันตรายต่อคนได้ *S. maltophilia* เป็นเชื้อก่อโรคในคนที่ยากต่อการรักษาดังเช่น เป็นเชื้อสาเหตุของความผิดปกติของโรคปอดบวม การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นเชื้อที่ติดต่อยาปฏิชีวนะในวงกว้าง พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม (Chang et al., 2015) *P. agglomerans* เป็นแบคทีเรียที่ให้ทั้งคุณและโทษ เป็นเชื้อก่อโรคในพืชและในคน พบได้ทั้งในพืช ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ในสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ และฝุ่นละอองในอากาศ เกิดประโยชน์ต่อพืชโดยส่งเสริมการเจริญและเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ (Dutkiewicz et al., 2015) จากการศึกษาประโยชน์ของ *P. agglomerans* เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียและราที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ถึงอย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์ของ *P. agglomerans* เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าสำหรับควบคุมโรคพืชนั้นยังไม่เป็นที่ยอมรับ เพราะไม่ปลอดภัย และมีโอกาสที่จะเกิดโรคเป็นอันตรายต่อคนได้ (Rezzonico et al., 2009)

Pseudomonas nitroreducens sp. nov. เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ค้นพบโดย Lang et al. (2007) ที่แยกเชื้อได้จาก oil brine ซึ่งเป็นแหล่งที่เต็มไปด้วยน้ำมันก๊าด (kerosene) และน้ำมันดิบในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของจุลินทรีย์ สามารถเจริญได้ใน 5% NaCl ไม่เจริญในอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงที่ 41 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Prakash et al. (2007) ที่พบว่า *P. nitroreducens* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับ *P. nitroreducens* ที่แยกได้จากดินรอบรากข้าว และการศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและการผลิตฮอร์โมนออกซิเจนมาก่อน

สรุปผลการทดลอง

การศึกษครั้งนี้ผู้วิจัยแยกแบคทีเรียจากดินรอบรากข้าวได้ 310 ไอโซเลท ซึ่งมีปริมาณของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินของแปลงปลูกข้าวอินทรีย์มากกว่าแปลงปลูกข้าวเคมี การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระพบสายพันธุ์ที่น่าสนใจคือ *Pseudomonas nitroreducens* PY7-6 เป็นแบคทีเรียกลุ่มสายพันธุ์ใหม่ที่มีผู้ศึกษาอยู่น้อย และเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพผลิตไนโตรเจนได้สูง (6.3 mg/L) และผลิตออกซิเจนได้สูงสุด (23.9 mg/L) สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่พบในการศึกษครั้งนี้ จัดเป็นกลุ่มเชื้อก่อโรคได้แก่ *Pantoea agglomerans* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคได้ในพืช สัตว์ และคน พบได้จากผิวพืช เมล็ดพันธุ์ ผลไม้ และอุจจาระสัตว์หรือคน รวมทั้ง *Bacillus cereus* และ *Stenotrophomonas maltophilia* เป็นเชื้อที่ก่อโรคในคนได้ จึงควรศึกษาอย่างละเอียดหากจะนำไปใช้ประโยชน์ เพราะอาจเป็นอันตราย ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือก *P. nitroreducens* PY7-6 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดีที่สุดสำหรับศึกษาต่อไปเพื่อสามารถพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพส่งเสริมการเจริญให้แก่ข้าวได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ และสาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาปฐพีศาสตร์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำการทดลองงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Aziez, S. M., Eweda, W. E., Girgis, M. G. Z. & Ghany, B. F. A. (2014). Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using *Azotobacter* as N₂ biofertilizer. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 95-108. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2014.06.014>
- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1559-1570. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>
- Bashir, H., Ahmad, J., Bagheri, R., Nauman, M. & Qureshi, M. I. (2013). Limited sulfur resource forces *Arabidopsis thaliana* to shift towards non-sulfur tolerance under cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.05.004>

- Bharucha, U., Patel, K. & Trivedi, U. B. (2013). Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, 2(3), 215-221. <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0065-7>
- Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H. & Hsueh, P. R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Frontiers in microbiology*, 6, 893. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00893>
- Dhevendaran, K., Preetha, G. & Hari, B. N. V. (2013). Studies on nitrogen fixing bacteria and their application on the growth of seedling of *Ocimum sanctum*. *Pharmacognosy Journal*, 5(2), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.phcgj.2013.03.003>
- Dobereiner, J., Marriel, I. E. & Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(10), 1464-1473. <https://doi.org/10.1139/m76-217>
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M. & Milanowski, J. (2015). Pantoea agglomerans: a marvelous bacterium of evil and good. Part I. Deleterious effects: Dust-borne endotoxins and allergens - focus on cotton dust. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(4), 576-88. doi: 10.5604/12321966.1185757.
- Dutta, S. & Podile, A. R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical reviews in microbiology*, 36(3), 232-244. <https://doi.org/10.3109/10408411003766806>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Khan, A. G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), 355-364. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.006>
- Khan, M. M. A., Khatun, A. & Islam, M. T. (2016). Promotion of plant growth by phytohormone producing bacteria. In N. Garg & A. Aeron (Eds.), *Microbes in Action*. pp. 45-76. USA: Nova Science Publishers.
- Lang, E., Giese, B., Spröer, C., Schumann, P., Steffen, M. & Verbarg, S. (2007). Characterization of 'Pseudomonas azelaica' DSM 9128, leading to emended descriptions of *Pseudomonas citronellolis* Seubert 1960 (Approved Lists 1980) and *Pseudomonas nitroreducens* Iizuka and Komagata 1964 (Approved Lists 1980), including *Pseudomonas multiresinivorans* as its later heterotypic synonym.

- International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 4), 878-882. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64849-0>
- Laskar, F. & Sharma, G. D. (2013). Isolation and characterisation of diazotrophic bacteria from rhizosphere of different rice cultivars of South Assam, India. *Current World Environment*, 8(1), 157-163. <https://doi.org/10.12944/CWE.8.1.20>
- Melero, S., Porras, J. C. R., Herencia, J. F. & Madejon, E. (2006). Chemical and biochemical properties in a siltyloam soil under conventional and organic management. *Soil and Tillage Research*, 90(1-2), 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.still.2005.08.016>
- Pennock, D., Yates, T. & Braidek, J. (2008). Soil sampling designs. In M. R. Carter & E. G. Gregorich (Eds.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. (2nd ed.) pp. 1-14. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Phookkasem, C., Amkha, S. & Mala, T. (2011). Screening of pure isolates for *Azospirillum* that is efficient in nitrogen fixation, auxin production and phosphate solubilization. *Kamphaengsaen Academic Journal*, 9(2), 1-14. (in Thai)
- Prakash, O., Kumari, K. & Lal, R. (2007). *Pseudomonas delhiensis* sp. nov., from a fly ash dumping site of a thermal power plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 527-531. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64456-0>
- Rezzonico, F., Smits, T. H., Montesinos, E., Frey, J. E. & Duffy, B. (2009). Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC microbiology*, 9:204, 18 pp. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-204>
- Saengsanga, T. (2014). PGPR: The role in promoting and protecting plant under stress conditions. *Thai Science and Technology Journal*, 22(4), 553-570. (in Thai)
- Singh, R. & Prasad, M. P. (2014). Screening for siderophore and ammonia production from rhizosphere isolates of *Oryza sativa*. *World Journal of Pharmaceutical research*. 3(9). 1458-1465.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology* (4th ed.). Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers,
- Tang, Y., Wang, L., Ma, C., Liu, J., Liu, B. & Li, H. (2011). The use of HPLC in determination of endogenous hormones in anthers of bitter melon. *Journal of Life Sciences*, 5, 139-142.
- Van Overbeek, L. & Van Elsas, J. D. (2008). Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS microbiology ecology*, 64(2), 283-296. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00469.x>