

การคัดแยกแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากข้าว
(*Oryza sativa*)
Isolation of Plant-growth-promoting Bacteria from Rice
(*Oryza sativa*)

โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา^{1,2*} ดุษณี ธนะบริพัฒน์¹ จำรูญ เล้าสินวัฒนา³
พรหมมาศ คูหากาญจน์³ นงลักษณ์ เกรรินทร์วงศ์³ และ จิตติ ท่าไผ่^{1,2}
Chokchai Kittiwongwattana^{1,2*} Dusanee Thanaboripat¹ Chamroon Laosinwattana³
Prommart Koochakan³ Nonglak Parinthawong³ and Chitti Thawai^{1,2}

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
² หน่วยวิจัยแอกติโนแบคทีเรีย คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
³ ภาควิชาเทคโนโลยีผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

แบคทีเรียหลายๆ สายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ในงานวิจัยนี้แบคทีเรีย epiphyte จำนวน 93 สายพันธุ์ถูกคัดแยกมาจากผิวลำต้นและรากของข้าวที่เก็บรวบรวมมาจากนาข้าวในจังหวัดอ่างทอง ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี และกรุงเทพมหานคร การจัดจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นทำโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยวิธี amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) และ pairwise alignment บนฐานข้อมูล EzTaxon ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในไฟลัมที่แตกต่างกัน 4 ไฟลัม ได้แก่ *Proteobacteria* (66.68%), *Actinobacteria* (27.95%), *Firmicutes* (3.22%) และ *Bacteroidetes* (2.15%) การทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวโดยแบคทีเรียทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าข้าวที่ได้รับแบคทีเรีย *Microbacterium* sp. 409, *Williamsia* sp. 618, *Sphingomonas* sp. 710, *Mycobacterium* sp. 713 และ *Enterobacter* sp. 903 มีน้ำหนักแห้งลำต้นสูงกว่ากลุ่มควบคุมมากกว่า 1.5 เท่า และพบว่าแบคทีเรีย *Microbacterium* sp. 409, *Williamsia* sp. 618, *Sphingomonas* sp. 710 และ *Enterobacter* sp. 903 แสดงกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอย่างน้อยหนึ่งกิจกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. 704, *Acidovorax* sp. 727, *Acidovorax* sp. 801 และ *Microbacterium* sp. 809 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพและตัวควบคุมทางชีวภาพในทางเกษตรกรรมได้ในอนาคต

คำสำคัญ : การส่งเสริมการเจริญเติบโต, *Oryza sativa*, *Pyricularia grisea*, ARDRA

*ที่อยู่ติดต่อ. โทรศัพท์ : 0-2329-8400 โทรสาร : 0-2329-8412 E-mail address : chokchai.ki@kmitl.ac.th

Abstract

Several bacterial strains are known for their plant growth promotion. In the present study, 93 isolates of bacteria were isolated from surfaces of stems and roots of rice plants collected from rice paddies in Ang-Thong, Pathumthani, Phra Nakhon Si Ayutthaya, Supanburi and Bangkok provinces. They were characterized based on partial 16S rRNA gene sequences using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and pairwise alignment on the EzTaxon database. The result showed that they were members of four different phyla including *Proteobacteria* (66.68%), *Actinobacteria* (27.95%), *Firmicutes* (3.22%) และ *Bacteroidetes* (2.15%). All bacterial isolates were tested for their plant growth promotion in rice. Inoculation of *Microbacterium* sp. 409, *Williamsia* sp. 618, *Sphingomonas* sp. 710, *Mycobacterium* sp. 713 and *Enterobacter* sp. 903 resulted in more than 1.5-fold increase in the dry weight of stems when compared to water inoculation in the control group. *Microbacterium* sp. 409, *Williamsia* sp. 618, *Sphingomonas* sp. 710 and *Enterobacter* sp. 903 displayed at least one plant-growth-promoting activity. Additionally, *Sphingobium* sp. 704, *Acidovorax* sp. 727, *Acidovorax* sp. 801 และ *Microbacterium* sp. 809 were able to inhibit the growth of *Pyricularia grisea*, the fungal pathogen of the blast disease in rice. Based on the results obtained in our study, these isolates can be potential candidates for further application as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture.

Keywords: Epiphytic bacteria, *Oryza sativa*, Plant growth promotion, *Pyricularia grisea*

1. บทนำ

ข้าวมี่ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae ข้าวจัดได้ว่าเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์ ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตลำดับที่ 6 และผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ของโลก โดยมีพื้นที่เพาะปลูกทั่วประเทศประมาณ 100,000 ตารางกิโลเมตร [1] ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้ปุ๋ยเคมีและสารป้องกันศัตรูพืชในการเพาะปลูกข้าวเป็นอย่างมาก การทำเกษตรกรรมในลักษณะดังกล่าวส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมและเพิ่มต้นทุนการผลิตด้วย ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ในการเพาะปลูกพืช โดยเป็นการใช้แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant-growth-promoting bacteria; PGPB) ซึ่งถูกคัดแยกจากแหล่งต่างๆ เช่น ปุ๋ยหมัก ดินบริเวณรอบๆ รากพืช เนื้อเยื่อภายในต้นพืช และที่บริเวณพื้นผิวในส่วนต่างๆ ของพืช [2-6]

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในทางตรงและทางอ้อม กลไกทางตรงของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีหลายรูปแบบ ตัวอย่างเช่น การเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัสที่อยู่ในดินเพื่อให้พืชสามารถดูดซับและนำไปใช้ได้, การผลิตสารซิเดอโรฟอรัส (siderophore) ที่เข้าจับกับธาตุเหล็กเพื่อช่วยให้พืชสามารถได้รับแร่ธาตุนี้เพิ่มขึ้น และการผลิตอินโดล-3-อะซีติกแอซิด indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินที่มีความสำคัญในแง่ของการกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์, การเจริญเติบโต และการพัฒนาของพืช มีรายงานว่าการใช้แบคทีเรียเหล่านี้ให้กับต้นพืชทำให้การเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น การใช้แบคทีเรีย *Herbaspirillum* และ *Burkholderia* ที่เพิ่มการละลายฟอสฟอรัสได้ทำให้ต้นข้าวมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 14-26 เปอร์เซ็นต์ [7] หรือการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* และ *Microbacterium* ที่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าว เป็นต้น [8] ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชในทางอ้อมได้โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียและฟังไจ [9] ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการเกษตรกรรมเป็นอย่างมาก

แบคทีเรียอีพิไฟต์ (epiphyte) คือแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ที่ผิวนอกของส่วนต่างๆ ของพืชและมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะที่ไม่เหมาะสม [10-11] งานวิจัยชิ้นนี้คัดแยกแบคทีเรียอีพิไฟต์จากผิวลำต้นและรากของข้าวเพื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าว ในเบื้องต้นแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ถูกนำมาจัดจำแนกโดยใช้ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA และลักษณะทางชีวเคมี จากนั้นแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ถูกนำมาทดสอบการเพิ่มชีวมวลของรากและลำต้นของข้าว แบคทีเรียที่แสดงผลบวกในการส่งเสริมให้ต้นกล้าของข้าวมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นถูกคัดเลือกมาศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ ความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ, การผลิตซิเดอโรฟอรัส (siderophore) และการสร้างฮอร์โมน IAA นอกจากนี้แบคทีเรีย epiphyte ทุกสายพันธุ์ยังถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในข้าวสองชนิดได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่ทำให้เกิดโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) และ เชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าว (rice blast disease)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากต้นข้าว

ต้นข้าวที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ที่ถูกเก็บรวบรวมจากนาข้าวในจังหวัดอ่างทอง, ปทุมธานี, พระนครศรีอยุธยา, สุพรรณบุรี และกรุงเทพมหานคร โดยแยกราก ออกจากลำต้น จากนั้นนำลำต้นและรากไปแช่ล้างเอาดินออก ขึ้นส่วนพืชถูกตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กมีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตรแล้วนำไปใส่ในขวดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำขวดไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ

ต่อหน้าที่ นาน 30 นาที แล้วนำสารละลายเชื้อมาทำการเจือจางเป็นลำดับจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-5} แล้ว
ดูดสารแขวนลอยเชื้อความเจือจางต่างๆ มาทำการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA;
Himedia) และ Pseudomonas base agar (Oxoid) จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศา
เซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วันแล้วทำการส่องคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะที่แตกต่างกันมาเพาะเลี้ยง
บนอาหาร NA จากนั้นแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต (isolate) ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single-colony
isolation โดย streak บนอาหาร NA

2.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และการวิเคราะห์ amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

นำเชื้อแบคทีเรียถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา
48 ชั่วโมง เพื่อนำเซลล์มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 bacterial DNA extraction kit (Vivantis) นำดี
เอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยการใช้ไพรเมอร์ 27F
และ 1492R [12] ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ยาสำเร็จรูป FavorPrep Gel/PCR
purification mini kit (Favorgen) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณ 500 นา
โนกรัม มาวิเคราะห์ ARDRA ด้วยเอนไซม์ *AluI* (New England Biolabs, USA) แล้วตรวจสอบผลโดยการ
ทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร)
เพื่อทำการจัดกลุ่ม ARDRA ของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียที่ให้ขึ้นดีเอ็นเอเหมือนกันถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม
เดียวกันจากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนอย่างน้อย 25 เปอร์เซ็นต์จากแต่ละกลุ่ม ARDRA อย่างสุ่ม
เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส

2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ขึ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียตัวแทนถูกนำมาหาลำดับเบสโดยการใช้ไพรเมอร์ 27F
จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียสปีชีส์ต่างๆ ที่ได้รับการจัดจำแนกอย่าง
ถูกต้องแล้วและถูกจัดเก็บอยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon [13] ด้วยวิธี pairwise alignment

2.4 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าว

นำแบคทีเรียถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ
150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการ
ปั่นเหวี่ยง จากนั้นทำการละลายตะกอนของเชื้อด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาเตรียมสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 10
มิลลิลิตร โดยการปรับความเข้มข้นของเชื้อให้เท่ากับสารละลาย McFarland No. 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับความ
เข้มข้นของเชื้อคือ 1.5×10^8 CFUต่อมิลลิลิตร นำเมล็ดข้าวจำนวน 10 เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อเป็นเวลา 2
ชั่วโมงแล้วนำไปเพาะในถ้วยพลาสติกทรงกระบอกขนาด 53 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่บรรจุทรายอยู่ประมาณ

2 ใน 3 ของปริมาตรถ้วย จากนั้นนำเมล็ดไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน แล้วทำการย้ายออกปลูกในที่ที่มีแสงเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาทำการถอนต้นกล้ามาล้างทรายออกแล้วทำการแยกลำต้นออกจากราก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเพื่อบันทึกน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก กลุ่มควบคุมคือเมล็ดข้าวที่นำไปแช่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ การส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวโดยแบคทีเรียถูกคำนวณเป็นอัตราส่วนดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{อัตราส่วน} = (\text{น้ำหนักแห้งลำต้น/รากกลุ่มทดลอง}) / (\text{ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งลำต้น/รากกลุ่มควบคุม})$$

การทดลองทำ 5 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง ใช้วิธี one-way ANOVA วิเคราะห์ความแปรปรวน ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองคำนวณโดยวิธี Tukey ($p < 0.05$)

2.5 การทดสอบการละลายสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร NA แห่งลงบนอาหาร Pikovskaya's medium (PVK) และ National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) [14] แล้วทำการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำได้จะแสดงลักษณะใสรอบรอยเชื้อแบคทีเรียบนอาหารทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด

2.6 การทดสอบการสร้างสารประกอบ siderophore

นำเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างมาซัดลงบนอาหาร chrome azurol S (CAS) agar [15] จากนั้นทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วันแล้วทำการตรวจผล โดยแบคทีเรียที่สร้างสาร siderophore จะเปลี่ยนสีน้ำเงินของอาหารเป็นสีส้มที่บริเวณรอบๆ ของรอยเชื้อแบคทีเรีย

2.7 การทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA

นำแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB, Himedia) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี L-tryptophan ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาทีเพื่อแยกเอาส่วนใสปริมาตร 200 ไมโครลิตรมาทดสอบ IAA ด้วย Salkowski's reagent [16] ในปริมาตรที่เท่ากัน แบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA จะมีส่วนใสที่เปลี่ยนเป็นสีชมพู

2.8 การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae*

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* ทำโดยซิดเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างเป็นเส้นตรงลงบนอาหาร nutrient agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

จากนั้นขีดเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ในแนวตั้งฉากกับรอยของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างโดยขีดให้ใกล้กับเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างให้มากที่สุด บ่มจานเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วตรวจสอบผลการยับยั้งโดยสังเกตจากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) กลุ่มควบคุมคือจานเลี้ยงเชื้อที่มีแต่เพียงแบคทีเรีย *X. oryzae*

2.9 การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea*

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA; Himedia) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตรมาวางลงบนอาหาร PDA จานใหม่ จากนั้นใช้หลอดหยดย้ำเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างใส่ลงไปบนอาหาร PDA จานเดียวกันโดยให้มีระยะห่างระหว่างแบคทีเรียตัวอย่างกับเชื้อราเท่ากับ 2 เซนติเมตร แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วันแล้วตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยแบคทีเรียจากการเกิดบริเวณยับยั้ง กลุ่มควบคุมคือจานเลี้ยงเชื้อที่มีแต่เพียงเชื้อรา *P. grisea*

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การคัดแยกแบคทีเรีย epiphyte

แบคทีเรียที่ถูกคัดแยกได้มีจำนวนทั้งสิ้น 93 สายพันธุ์โดยแบ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียจากต้นข้าวในจังหวัดอ่างทองจำนวน 6 สายพันธุ์ จังหวัดปทุมธานีจำนวน 4 สายพันธุ์ จังหวัดพระนครศรีอยุธยาจำนวน 4 สายพันธุ์ จังหวัดสุพรรณบุรีจำนวน 47 สายพันธุ์ และกรุงเทพมหานครจำนวน 32 สายพันธุ์ แบ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากพื้นผิวของรากจำนวน 50 สายพันธุ์และพื้นผิวของลำต้นจำนวน 43 สายพันธุ์ เมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียต่างๆ ด้วยวิธี ARDRA แล้วพบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียทั้ง 93 สายพันธุ์ออกได้เป็นกลุ่ม ARDRA ทั้งหมด 32 กลุ่ม เมื่อนำตัวแทนอย่างน้อย 25 เปอร์เซ็นต์ของแต่ละกลุ่มมาหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ซึ่งนิยมใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในเบื้องต้น [17] ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA แบ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ (ตารางที่ 1) แบคทีเรียจำนวน 62 สายพันธุ์ หรือ 66.67 เปอร์เซ็นต์คือแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* ซึ่งประกอบไปด้วยสกุล *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aquabacter*, *Azospirillum*, *Bosea*, *Burkholderia*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudoduganella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Starkeya* และ *Xanthobacter* แบคทีเรียจำนวน 26 สายพันธุ์ หรือ 27.95 เปอร์เซ็นต์ถูกจัดอยู่ในไฟลัม *Actinobacteria* และจัดอยู่ในสกุลต่างๆ ได้แก่ *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* และ *Williamsia* แบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในไฟลัม *Firmicutes* และอยู่ในสกุล *Bacillus* และแบคทีเรียจำนวน 2 สายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในไฟลัม *Bacteroidetes* และอยู่ในสกุล *Chryseobacterium* และ *Flavobacterium* ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็น

เห็นว่าแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นผิวภายนอกของข้าว แบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* ยังถูกพบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ภายในเนื้อเยื่อของรากข้าว [18-19] และพื้นผิวภายนอกและเนื้อเยื่อภายในของต้นถั่วเหลือง [20]

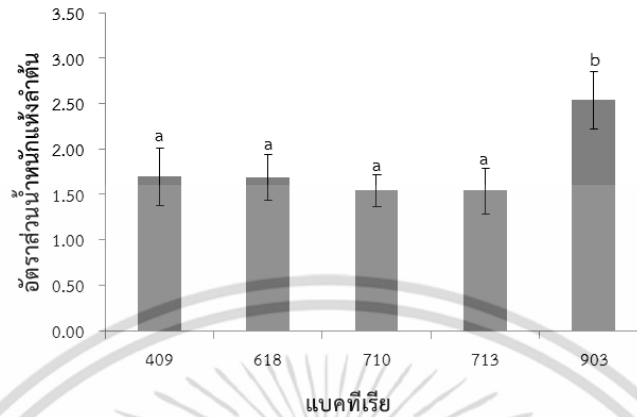
3.2 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรีย epiphyte

จากการนำแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ถูกคัดแยกได้ทดสอบความสามารถในการเพิ่มน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากของข้าวอายุ 7 วันโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือต้นข้าวที่ได้จากการแช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เมื่อคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากของกลุ่มทดลองกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมพบว่ามีเชื้อจำนวน 5 สายพันธุ์ที่ให้ค่าอัตราส่วนของน้ำหนักแห้งของลำต้นเกิน 1.5 ได้แก่ *Microbacterium* sp. 409, *Williamsia* sp. 618, *Sphingomonas* sp. 710, *Mycobacterium* sp. 713 และ *Enterobacter* sp. 903 โดยมีค่าอัตราส่วนเท่ากับ 1.70 ± 0.32 , 1.69 ± 0.25 , 1.54 ± 0.17 , 1.54 ± 0.25 และ 2.54 ± 0.32 ตามลำดับ (รูปที่ 1) ผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นด้วยว่าค่าอัตราส่วนที่ได้จากแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. 903 มีค่าสูงกว่าค่าอัตราส่วนจากแบคทีเรียอีก 4 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทางตรงกันข้ามการวัดผลน้ำหนักแห้งของรากของกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใดที่ให้ค่าอัตราส่วนน้ำหนักแห้งของรากสูงเกินกว่า 1.5 (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

ผลที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* และ *Enterobacter* ซึ่งถูกคัดแยกจากดินและต้นพืชสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Microbacterium yannici* G72 ที่คัดแยกมาจากรากของ *Arabidopsis thaliana* ช่วยให้ต้นพืชดังกล่าวมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีก้านช่อดอกที่ยาวขึ้น [21] แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. S21 ซึ่งคัดแยกได้จากต้นข้าวทำให้ต้นกล้าข้าวมีความสูงและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [22] แบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. 44 และ *Mycobacterium phlei* MbP18 สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของลำต้นและรากของต้นข้าวสาลีได้ [23] แบคทีเรีย *Enterobacter* sp. NBRI K28 ทำให้ต้นพืช *Brassica juncea* ที่ปลูกในดินซึ่งมีการปนเปื้อนของโลหะหนักมีชีวมวลเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [24] ในทางตรงกันข้าม บทบาทของแบคทีเรียในสกุล *Williamsia* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชยังไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากไม่พบงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียในสกุล *Williamsia* ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชในฐานข้อมูลต่างๆ ที่สืบค้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยบางชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในสกุล *Williamsia* มีการดำรงชีวิตร่วมกับพืช [25-26]

ตารางที่ 1. ผลการจัดจำแนกแบคทีเรีย epiphyte จากรากและลำต้นของข้าวด้วยวิธี ARDRA ร่วมกับการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม ARDRA

ไฟลัม	จีนัส	จำนวนสายพันธุ์	กลุ่ม ARDRA	
Proteobacteria	<i>Acidovorax</i>	5	14 (3), 17 (2)	
	<i>Acinetobacter</i>	2	21 (1), 25 (1)	
	<i>Aquabacter</i>	1	18 (1)	
	<i>Azospirillum</i>	4	6 (4)	
	<i>Bosea</i>	3	4 (3)	
	<i>Burkholderia</i>	1	23 (1)	
	<i>Dyella</i>	5	8 (5)	
	<i>Enterobacter</i>	11	19 (11)	
	<i>Novosphingobium</i>	1	3 (1)	
	<i>Pantoea</i>	1	27 (1)	
	<i>Pseudoduganella</i>	1	24 (1)	
	<i>Pseudomonas</i>	10	13 (2), 22 (3), 28 (2), 29 (3)	
	<i>Rhizobium</i>	1	7 (1)	
	<i>Sphingobium</i>	1	5 (1)	
	<i>Sphingomonas</i>	11	10 (10), 32 (1)	
	<i>Starkeya</i>	2	9 (2)	
	<i>Xanthobacter</i>	2	16 (2)	
	Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i>	3	1 (3)
		<i>Microbacterium</i>	15	2 (2), 11 (12), 32 (1)
		<i>Micrococcus</i>	1	12 (1)
<i>Mycobacterium</i>		3	11 (3)	
<i>Williamsia</i>		4	15 (4)	
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	3	20 (2), 31 (1)	
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium</i>	1	30 (1)	
	<i>Flavobacterium</i>	1	26 (1)	



รูปที่ 1. อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักแห้งของลำต้นข้าวที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ 5 สายพันธุ์กับค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมและมีค่ามากกว่า 1.5 ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และแถบแสดงความผิดพลาดแสดงค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$)

จากการนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของต้นข้าวมาทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ การเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัส การสร้างสารประกอบ siderophore และการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Microbacterium* sp. 409 และ *Enterobacter* sp. 903 แสดงกิจกรรมการละลายสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ และการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ในขณะที่แบคทีเรีย *Williamsia* sp. 618 แสดงกิจกรรมการสร้าง siderophore และแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. 710 แสดงกิจกรรมการสร้างฮอร์โมน IAA เพียงอย่างเดียว ส่วนแบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. 713 ไม่แสดงกิจกรรมใดๆ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2. กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของต้นข้าว

แบคทีเรีย	การละลายสารประกอบฟอสฟอรัส	การสร้าง siderophore	การสร้างฮอร์โมน IAA
<i>Microbacterium</i> sp. 409	+	-	+
<i>Williamsia</i> sp. 618	-	+	-
<i>Sphingomonas</i> sp. 710	-	-	+
<i>Mycobacterium</i> sp. 713	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp. 903	+	-	+

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุล *Microbacterium*, *Enterobacter* และ *Sphingomonas* ที่สามารถเพิ่มการละลายของสารประกอบ

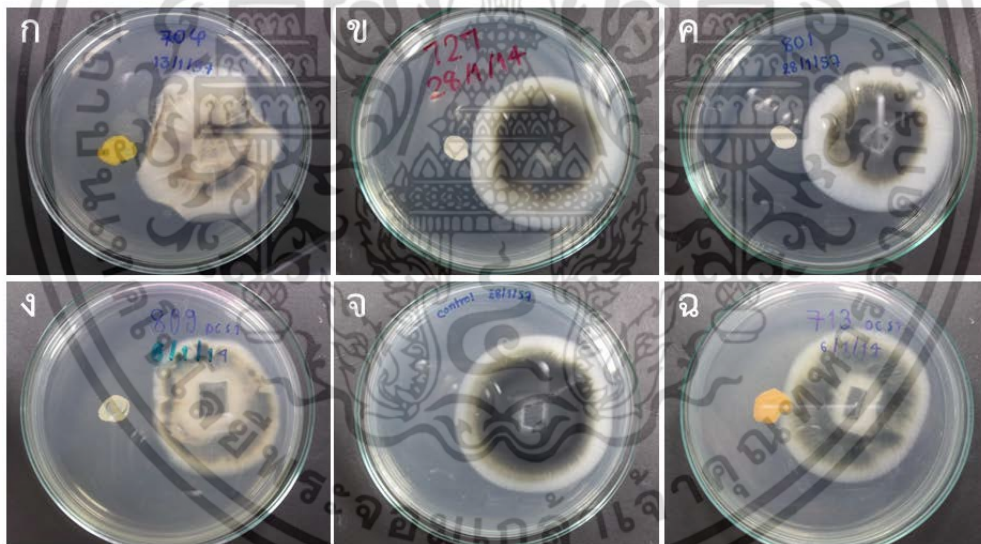
ฟอสฟอรัส สร้าง siderophore สร้างฮอร์โมน IAA ได้ [27-31] อย่างไรก็ตามการสืบค้นฐานข้อมูลไม่พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับการสร้างสาร siderophore โดยแบคทีเรียในสกุล *Williamsia* ฟอสฟอรัสและเหล็กเป็นแร่ธาตุอาหารหลักและแร่ธาตุอาหารรองสำหรับพืชตามลำดับ แร่ธาตุทั้งสองชนิดมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาในส่วนต่างๆ ของพืช อย่างไรก็ตามฟอสฟอรัสและเหล็กภายในดินมักจะอยู่ในรูปของสารประกอบที่ละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายน้ำด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้พืชไม่สามารถนำแร่ธาตุดังกล่าวไปใช้ได้โดยมีประสิทธิภาพ [9,32] การใช้แบคทีเรียที่สามารถเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัสและเหล็กที่ไม่ละลายน้ำจึงเป็นกลไกทางตรงกลไกหนึ่งในการเพิ่มปริมาณแร่ธาตุให้กับพืช [8-9] การสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรียเป็นอีกกลไกหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเนื่องจากฮอร์โมนดังกล่าวมีความจำเป็นต่อกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์และอวัยวะต่างๆ ของพืช [9,33] ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่พบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโดยเชื้อแบคทีเรียที่แสดงกิจกรรมการละลายสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อดังกล่าวมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 14-26 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ [7] นอกจากนี้ ยังมีการทดสอบผลของแบคทีเรียที่สร้างสาร siderophore ต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วเขียวที่ขาดธาตุเหล็กที่แสดงให้เห็นว่าการใส่แบคทีเรียดังกล่าวให้กับพืชช่วยลดอาการขาดธาตุเหล็กของพืชได้ [34] และการใส่เชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ลงไปในพืชสามารถกระตุ้นการสร้างรากแขนงของพืชซึ่งส่งผลให้ต้นพืชสามารถลำเลียงน้ำและแร่ธาตุจากดินได้ดีขึ้นตลอดจนมีการเจริญเติบโตที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย [33]

3.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *X. oryzae* และ *P. grisea*

จากการนำเชื้อแบคทีเรีย epiphyte ทุกสายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ที่ก่อโรคขอบใบแห้งและเชื้อรา *P. grisea* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าวพบว่าไม่มีแบคทีเรีย epiphyte สายพันธุ์ใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* แต่มีเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea* ได้ โดยมีเชื้อต่างๆ ดังนี้ *Sphingobium* sp. 704, *Acidovorax* sp. 727, *Acidovorax* sp. 801 และ *Microbacterium* sp. 809 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสามารถสังเกตได้จากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ระหว่างเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเปรียบเทียบกับจานเลี้ยงเชื้อควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรียและจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่แบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. 713 ที่ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (รูปที่ 2)

มีรายงานพบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในสกุล *Sphingobium*, *Acidovorax* และ *Microbacterium* มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคพืชได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Sphingobium mellinum* สายพันธุ์ CA16 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค corky root ในผักกาดได้ [35] ในขณะที่แบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ซึ่งแยกมาจากเมล็ดแตงโมสามารถยับยั้งการเข้าบุกรุกของเชื้อโรค *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ได้ [36] และแบคทีเรีย

สายพันธุ์หนึ่งในสกุล *Microbacterium* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่ก่อโรคในข้าว [37] กลไกหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคคือการสร้าง siderophore ขึ้นมาเพื่อช่วยในการแข่งขันดูดซับธาตุเหล็กกับเชื้อก่อโรค ทำให้เชื้อก่อโรคได้รับธาตุเหล็กไม่เพียงพอต่อความต้องการและไม่สามารถเจริญเติบโตได้ [9] อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบผลการสร้าง siderophore ของเชื้อที่ให้ผลบวกในการทดลองนี้พบว่าไม่มีแบคทีเรียสายพันธุ์ใดที่แสดงกิจกรรมการสร้าง siderophore ดังนั้นแล้วจึงมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้ใช้กลไกอื่นๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. grisea* กลไกอื่นๆ ที่แบคทีเรียใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้แก่ การสร้างสารปฏิชีวนะเช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* หลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มต่างๆ ได้หลายกลุ่ม ตัวอย่างเช่น phloroglucinols, phenazines, pyoluterorin, pyrrolnitrin และ lipopeptides เป็นต้น [38] และการสร้างเอนไซม์ที่ทำลายโครงสร้างของเชื้อก่อโรค ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ beta-1,3 glucanase, protease และ lipase ที่สามารถทำลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราที่ก่อโรคได้ [9] เป็นต้น



รูปที่ 2. ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Pyricularia grisea* โดยแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. 704 (ก), *Acidovorax* sp. 727 (ข), *Acidovorax* sp. 801 (ค) และ *Microbacterium* sp. 809 (ง) เทียบกับงานควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (จ) และงานที่ใส่แบคทีเรีย *Mycobacterium* sp. 713 (ฉ) ซึ่งไม่แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยแบคทีเรีย epiphyte พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จัดอยู่ในไฟลัม *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* และ *Bacteroidetes* และมีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Microbacterium* sp. 409, *Williamsia* sp. 618, *Sphingomonas* sp. 710, *Mycobacterium* sp. 713 และ *Enterobacter* sp. 903 ที่ช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งลำต้นของข้าวได้เกินกว่า 1.5 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแบคทีเรียเหล่านี้ยกเว้น *Mycobacterium* sp. 713 แสดงกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญของพืชที่ทดสอบอย่างน้อย 1 กิจกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Sphingobium* sp. 704, *Acidovorax* sp. 727, *Acidovorax* sp. 801 และ *Microbacterium* sp. 809 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าวได้

เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Thanawong, K., Perreta, S.R. and Basset-Mens, C. 2014. Eco-efficiency of paddy rice production in Northeastern Thailand: a comparison of rain-fed and irrigated cropping systems. *Journal of Cleaner Production*, 73, 204-217.
- [2] Gopalakrishnan, S., Vadlamudim S., Bandikinda, P., Sathya, A., Om-Rupela, V., Kudapa, H., Katta, K. and Varshney, R.K. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169, 40-48.
- [3] Velusamy, P., Immanuel, E. and Gnanamanickam, S.S. 2013. Rhizosphere bacteria for biocontrol of bacterial blight and growth promotion of rice. *Rice Science*, 20, 356-362.
- [4] Luo, S., Xu, T., Chen, L., Chen, J., Rao, C., Xiao, X., Wan, Y., Zeng, G., Long, F., Liu, C. and Liu, Y. 2012. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1745-1753.
- [5] Barka, S., Nowak, J. and Clement, C. 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 7246-7252.
- [6] Luduena, L.M., Taurian, T., Tonelli, M.L., Angelini, J.G., Anzuay, M.S., Valetti, L., Munoz, V. and Fabra, A.I. 2012. Biocontrol bacterial communities associated with diseased peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. *European Journal of Soil Biology*, 53, 48-55.

- [7] Estrada, G., Baldani, V., de Oliveira, D., Urquiaga, S. and Baldani, J. 2012. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil*, 369, 115-129.
- [8] Ji, S. H., Gururani, M. A. and Chun, S.C. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169, 83-98.
- [9] Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, doi:10.6064/2012/963401.
- [10] Lindow, S.E. and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 1875-1883.
- [11] Nongkhaw, F.M.W. and Joshi, S.R. 2014. Distribution pattern analysis of epiphytic bacteria on ethnomedicinal plant surfaces: A micrographical and molecular approach. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 2, 34-40.
- [12] Lane, D.J. 1991. "16S/23S rRNA sequencing." 115-175. in Stackebrandt E. and Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester: Wiley & Sons.
- [13] Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S. and Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phlotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62,716-721.
- [14] Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265-270.
- [15] Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56.
- [16] Perley, J.E. and Stowe, B.B. 1966. An improvement in the sensitivity of the Salkowski reagent for tryptamine, tryptophan and indoleacetic acid. *Physiologia Plantarum*, 19, 683-690.
- [17] Janda, J.M. and Abbott, S. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2761-2767.
- [18] Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. and Song, W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 55, 415-424.

- [19] Sessitsch, A., Haroimm, P., Doring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J.D. and Reinhold-Hurek, B. 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing Rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 25, 28-36.
- [20] Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A. and Azevedo, J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6, 1244-1251.
- [21] Schwachtje, J. Karojet, S., Kunz, S., Brouwer, S. and van Dongen, J.T. 2012. Plant growth promoting effect of newly isolated rhizobacteria varies between two *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Signaling and Behavior*, 7, 623-627.
- [22] Adhikari, T.B., Joseph, C.M., Yang, G., Phillips, D.A. and Nelson, L.M. 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 916-924.
- [23] Egamberdiyeva, D. and Höflich, G. 2003. Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 973-978.
- [24] Kumar, K.V., Singh, N., Behl, H.M. and Srivastava, S. 2008. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. *Chemosphere*, 72, 678-683.
- [25] Kämpfer, P., Wellner, S., Lohse, K., Lodders, N. and Martin, K. 2011. *Williamsia phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the surface of *Trifolium repens* leaves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2702-2705.
- [26] Fang, X.M., Su, J., Wang, H., Wei, Y.Z., Zhang, T., Zhao, L.L., Liu, H.Y., Ma, B.P., Klenk, H.P., Zhang Y.Q. and Yu, L.Y. 2013. *Williamsia sterculiae* sp. nov., isolated from a Chinese medicinal plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4158-4162.
- [27] Rivas, R., Trujillo, M., Sanchez, M., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E. and Velazquez, E. *Microbacterium ulmi* sp. nov., a xylanotic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 513-517.
- [28] Kim, K.Y., Jordan, D. and McDonald, G.A. 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 995-1003.

- [29] Khalifa, A.Y.Z., Alsyeeh, A., Almalki, M.A. and Saleh, F.A. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 79-86.
- [30] Bal, H.B., Das, S., Dangar, T.K. and Adhya, T.K. 2013. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 972-984.
- [31] Khan, A.L., Waqas, M., Kang, S., Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., Ali, L., Jung, H.Y. and Lee, I. 2014. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Microbial Pathogenesis and Host-Microbe Interaction*, 52, 689-695.
- [32] Osorio, H., Martinez, V., Nieto, P.A., Holmes, D.S. and Quatrini, R. 2008. Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility. *BMC Microbiology*, 8, doi:10.1186/1471-2180-8-203.
- [33] Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 425-448.
- [34] Sharma, A., Johri, B.N., Sharma, A.K. and Glick, B.R. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 887-894.
- [35] van Bruggen, A.H. C., Francis, I.M. and Jochimsen, K.N. 2014. Non-pathogenic rhizosphere bacteria belonging to the genera *Rhizorhapis* and *Sphingobium* provide specific control of lettuce corky root disease caused by species of the same bacterial genera. *Plant Pathology*, 63, 1384-1394.
- [36] Fessehaie A. and Walcott R.R. 2005. Biological control to protect watermelon blossoms and seed from infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Biological control*, 95, 413-419.
- [37] Cottyn, B., Debode, J., Regalado, E., Mew, T.W. and Swings, J. 2009. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 885-897.
- [38] Hass, D. and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease. *Annual Reviews of Phytopathology*, 41, 117-53.