การคัดเลือกและการจำแนกชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟท์ จากดินปลูกข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์

Screening and Identification of Endophytic Bacteria from Organic Red Jasmine Rice Soil

สมคิด ดีจริง* และ อนุตตรีย์ บุญต่อ

Somkid Deejing* and Anuttree Buntor

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

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

**Corresponding author: Email: kittydeejing@gmail.com, somkid_d@mju.ac.th*

(Received: 28 November 2017; Accepted: 17 May 2018)

Abstract: Microorganisms have relationship with plants. Endophytic bacteria colonize inner plant tissue without damaging. These bacteria show an important role in plant growth promotion. Thus, they can contribute to increase efficiency of organic based system of rice Intensification (SRI). The purpose of this study to analyze soil properties, screen and identify of phosphate solubilizing and indole acetic acid (IAA) endophytic bacteria from organic red jasmine rice tissue. It was found that ten years organic soil have low to moderate content of organic matter, available phosphorus and exchangeable potassium, bulk density, field capacity and saturated hydraulic conductivity. Endophytic bacteria, RSPVK-2 , RRPVK-4 , RRTSA-5, RRTSA-6, RLISP2 -1 , RRTSA-3, RRPVK-1, RRTSA-1 and RSISP2 -1 solubilized phosphate in PVK broth at 191.78, 92.65, 91.80, 73.22, 73.17, 71.23, 70.93, 69.93 and 67.49 mgPO_4^{2-}/L, respectively. Also, bacteria RSTSA-6 could produce indole-3-acetic acid (IAA) 20.55 mg/L. The genetic sequencing on 16S rRNA of RSPVK-2 , RRPVK-4 , RRTSA-6, RLISP2 -1 , RRTSA-1 and RSISP2-1 had similar to *Burkholderia cenocepacia, Paenibacillus favisporus*, *Paenibacillus alvei*, *Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis* and *Ralstonia pickettii*, respectively. RRTSA-5, RRTSA-3, RRPVK-1 were identified as *Bacillus pumilus*.

Keywords: Soil analysis, endophytic bacteria, phosphate solubilizing bacteria, indole-3-acetic acid producing

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: จุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับพืช มีแบคทีเรียเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่ออันตราย ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและน่าจะประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกข้าวอินทรีย์ได้ งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน คัดเลือก และจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลซิติกจากข้าวหอมมะลิแดงเกษตรอินทรีย์อายุ 10 ปี พบว่า ดินมีอินทรียวัตถุ ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ความหนาแน่นดิน ความจุความชื้นภาคสนาม และสภาพการนำน้ำขณะอิ่มตัวของดิน อยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง และพบว่า มีแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ละลายฟอสเฟตได้ดี ได้แก่ แบคทีเรีย RSPVK-2, RRPVK-4, RRTSA-5, RRTSA-6, RLISP2-1, RRTSA-3, RRPVK-1, RRTSA-1 และ RSISP2-1 ที่ละลายฟอสเฟตได้ 191.78, 92.65, 91.80, 73.22, 73.17, 71.23, 70.93, 69.93 และ 67.49 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรีย RSTSA-6 ยังสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 20.55 มิลลิกรัมต่อลิตร การจำแนกชนิดของแบคทีเรียข้างต้นโดยดูลำดับเบส 16S rRNA พบว่า แบคทีเรีย RSPVK-2, RRPVK-4, RRTSA-6, RLISP2-1, RRTSA-1 และ RSISP2-1 เป็น *Burkholderia cenocepacia, Paenibacillus favisporus*, *Paenibacillus alvei*, *Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis* และ *Ralstonia pickettii* ตามลำดับ ส่วน RRTSA-5, RRTSA-3, RRPVK-1 เป็น *Bacillus pumilus*

คำสำคัญ: การวิเคราะห์ดิน แบคทีเรียเอนโดไฟท์ แบคทีเรียละลายฟอสเฟต แบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิติก

คำนำ

จุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการเกษตร มีบทบาททำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ การทราบคุณสมบัติของดินทำให้สามารถจัดการดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและและผลผลิตของพืชได้ ซึ่งในระบบเกษตรอินทรีย์ อาจได้ผลผลิตพืชต่ำในช่วงแรกแต่การปรับปรุงดินด้วยอินทรียวัตถุจะส่งผลดีในระยะยาวได้มากกว่าเกษตรทั่วไป และใช้เวลามากกว่า 2 ปี ขึ้นไป ในการปรับปรุงคุณภาพดินให้มีสภาพคงตัวเพื่อให้ได้ผลผลิตข้าวสูงขึ้น (Surekha *et al*., 2014) มีจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ก่ออันตรายต่อพืช ที่เรียกว่า เอนโดไฟท์ (endophyte) มีข้อได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ที่อยู่นอกต้นพืชคือ อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยตรงจึงมีบทบาทช่วยพืชได้มาก (Araújo *et al*., 2002) ซึ่ง สมคิด และวิชญาพร (2560) คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากข้าวอินทรีย์อายุ 1 ปี พบว่า ละลายฟอสเฟตได้ 114.32 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และ Olayemi and Odedara (2017) คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนราก ลำต้น และใบ ของข้าวในไนจิเรีย พบว่า มี 5, 8 และ 4 ไอโซเลทที่ละลายฟอสเฟต ผลิต IAA และผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ได้ และจำแนกชนิดเป็น Bacillus, Pseudomonas, Enterobacter, Klebsiella, Staphylococcus, Citrobacter และ Escherichia ซึ่งพบว่า เชื้อข้างต้นช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดข้าวจาก 81.48 เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า มี 8 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งน่าจะนำไปประยุกต์เป็นหัวเชื้อในเพิ่มการเจริญและเพิ่มผลผลิตของข้าวได้ ซึ่งเอนโดไฟท์ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากข้าวอินทรีย์ ช่วยเพิ่มความยาวของลำต้น จำนวนต้น และรากของเมล็ดข้าวที่กำลังงอกได้ (Duangpaeng *et al*., 2012) และมีเอนโดไฟท์ *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* และ *B. subtilis* ช่วยควบคุมโรคไหม้ในข้าวที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae และช่วยเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวได้ (Ahmed *et al*., 2015) และ *B. oryzicola* ช่วยให้พืชต้านทานต่อโรคพืชและผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Fusarium fujikuroi* ที่ก่อโรคถอดฝักดาบในข้าว (Hossain *et al*., 2016) จากประโยชน์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตามที่กล่าวข้างต้น งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน คัดเลือกและจำแนกชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกจากข้าวหอมมะลิแดงเกษตรอินทรีย์อายุ 10 ปี เพื่อนำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตในระบบการปลูกข้าวอินทรีย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงข้าวหอมมะลิแดงที่ทำเกษตรอินทรีย์ระยะเวลา 10 ปี จากอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีของ Peech (1965) หาปริมาณอินทรียวัตถุ ตามวิธีการของ Walkley (1947) ส่วนการหาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ทำตามวิธีของ Bray and Kurtz (1945) และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้วิเคราะห์ ตามวิธีการของ Jackson (1958) และการหาค่าความหนาแน่นดินตามวิธีของ Blake (1965) และหาความจุความชื้นภาคสนาม ตามวิธีของ Gardner (1986) และหาค่าสภาพการนำน้ำขณะอิ่มตัวของดิน ตามวิธีของ Klute and Dirksen (1986)

การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวหอมมะลิแดง

นำต้นข้าวมะลิแดงในระยะต้นข้าวแตกกอ จากแปลงข้าวที่ทำเกษตรอินทรีย์เป็นเวลา 10 ปี มาตัดชิ้นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ แล้วฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที แล้วเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แช่ไว้ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 8 ครั้ง จากนั้นวางชิ้นส่วนของข้าวที่ฆ่าเชื้อแล้วบนอาหารแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ tryptic soy agar (TSA), plate count agar (PCA), Pikovskaya's medium (PVK) และ international streptomyces projected medium 2 (ISP2) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงเชื้อจากน้ำสุดท้ายที่ได้จากการล้างชิ้นส่วนของข้าวในอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ด้วยวิธี pour plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ละลายฟอสเฟตและการวิเคราะห์

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตขั้นต้น โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวจำนวน 41 ไอโซเลท มาทำ point inoculation บนอาหารแข็ง Pikovskaya (PVK) agar ประกอบด้วย (g/L) glucose (10), $Ca_3(PO_4)_2$ (5), $(NH_4)_2SO_4$ (0.5), KCl (0.2), $MgSO_4.7H_2O$ (0.1) และ วุ้น (15) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส คัดเลือกเชื้อที่เกิดวงใสไว้ใช้ต่อไป

การวิเคราะห์การละลายฟอสเฟต โดยนำเชื้อที่เกิดวงใสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PVK broth ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 1.0 (มีจำนวนเซลล์ 10^8 CFU/mL) ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร บ่มบนเครื่องเขย่า 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต ตามวิธีการของ Bray and Kurt (1945) เลือกแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีไว้ศึกษาต่อไป

การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกและการวิเคราะห์

ทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซิติกขั้นต้น โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลว Tryptone broth ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญอยู่มาหยด Kovac's reagent หากมีสีแดงเกิดขึ้นที่ผิวหน้าอาหารแสดงว่าให้ผลบวก แต่ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นที่ผิวหน้าอาหารแสดงว่าเป็นผลลบ เก็บเชื้อที่ให้ผลบวกไว้ศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก โดยนำเชื้อที่ให้ผลบวกมาศึกษาโดยเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร ลงในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติม tryptophan 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บส่วนใสวิเคราะห์ปริมาณกรดอิน-โดลอะซิติก ตามวิธีของ Ahmad *et al*. (2008) เก็บเชื้อที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูงไว้ใช้ต่อไป

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้

ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกที่คัดเลือก โดยดูลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง บันทึกลักษณะโคโลนี และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแบบแกรม แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ บันทึกการติดสีแกรม รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ และทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น การผลิตเอนไซม์ออกซิเดส คะตะเลส รวมทั้งการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส แลคโตส แมนนิทอล มอลโตส ซูโครส และไซลิทอล บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การหาลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Geneaid, Taiwan) และเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ universal primer คือ 27F ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' และวิเคราะห์ผลลำดับเบสของ 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน (ตารางที่ 1) พบว่า ดินมีปริมาณอินทรียวัตถุ 0.98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 4.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.7 ค่าความหนาแน่นดิน ความจุความชื้นภาคสนาม และการนำน้ำของดินในสภาพอิ่มตัวด้วยน้ำเท่ากับ 1.19 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 40.83 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ 0.19 เซนติเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวหอมมะลิแดง

ผลการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวหอมมะลิแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ พบได้แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนของราก ลำต้น และใบของข้าวหอมมะลิแดงจำนวน 20, 10 และ 11 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 41 ไอโซเลท (ตารางที่ 2)

Table 1. Physiological and chemical properties of ten years organic rice soil

Organic matter (%)	Available phosphorus (mg/kg)	Exchangeable potassium (mg/kg)	pH	Bulk density (g/cm^3)	Field capacity (% by weight)	Saturated hydraulic conductivity (cm/hr)
0.98	4.00	10.00	4.7	1.19	40.83	0.19

Table 2. Isolation of endophytic bacteria from red jasmine rice on various kinds of culture media

Culture media	Number of endophytic bacteria (isolates)			Total
	Roots	Stems	Leaves	
PCA	7	3	3	13
PVK	4	2	2	8
TSA	6	3	2	11
ISP2	3	2	4	9
Total	20	10	11	41

ผลการคัดเลือกขั้นต้นของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ละลายฟอสเฟต

ผลการทดสอบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตขั้นต้นบนอาหารแข็ง PVK agar พบว่า เกิดวงใสรอบโคโลนี จำนวน 24 ไอโซเลท และพบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีในอาหารเหลว PVK broth จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ RSPVK-2, RRPVK-4, RRTSA-5, RRTSA-6, RLISP2-1, RRTSA-3, RRPVK-1, RSTSA-1 และ RSISP2-1 โดยละลายฟอสเฟตได้ 191.78, 92.65, 91.80, 73.22, 73.17, 71.23, 70.93, 69.93 และ 67.49 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดอะซิติกขั้นต้น พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลท คือ แบคทีเรีย RRTSA-6 ที่ให้ผลบวก โดยสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 20.55 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

แบคทีเรียละลายฟอสเฟตและแบคทีเรียผลิตกรดอินโดลซิติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน คือ แบคทีเรีย RRPVK-1, RRPVK-4, RRTSA-3, RRTSA-5, RRTSA-6, RSTSA-1, RLISP2-1 และ RSISP2-1 มีเพียงแบคทีเรีย RSPVK-2 ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ซึ่งแบคทีเรีย RRTSA-6 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถทั้งละลายฟอสเฟตและผลิต IAA ได้ มีลักษณะทางชีวเคมี เช่น ผลิตออกซิเดส และหมักฟรุคโตส ซูโครส มอลโตส กลูโคส และกาแลคโตส แต่ไม่หมักไซลิทอล แลคโตส และแมนนิทอล ซึ่งคุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท แสดงในตารางที่ 4

ผลการหาลำดับเบสบน 16S rRNA ของแบคทีเรีย RSPVK-2, RRPVK-4, RRTSA-5, RRTSA-6, RLISP2-1, RRTSA-3, RRPVK-1, RSTSA-1, RSISP2-1 พบว่า เป็น *Burkholderia cenocepacia*, *Paenibacillus favisporus*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus alvei*, *Bacillus thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. pumilus*, *Bacillus subtilis* และ *Ralstonia pickettii* ตามลำดับ ที่ระดับความเหมือน 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย RRTSA-6 มีความสามารถทั้งละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้

Table 3. Phosphate solubilization of endophytic bacteria in PVK broth

Parts of rice	Bacterial isolate	Phosphate content ($mgPO_4^{2-}/L$)
Roots	RRPVK-1	70.93
Roots	RRPVK-4	92.65
Stems	RSPVK-2	191.78
Roots	RRTSA-3	71.23
Roots	RRTSA-5	91.80
Roots	RRTSA-6	73.22
Stems	RSTSA-1	69.93
Stems	RSISP2-1	67.49
Leaves	RLISP2-1	73.17

Table 4. Characteristics of selected endophytic bacteria

Bacterial Isolate	Cultural characteristic	Morphological characteristic	Biochemical and physiological characteristics									
			Catalase	Oxidase	Fruc	Su	Mal	Glu	Gal	Xy	Lac	Man
RRPVK-1	CF:circular, CM:entire, CE:raised	Gram positive Rods, Chains	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
RRPVK-4	CF:circular, CM:entire, CE:flat	Gram positive Rods, Chains	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
RSPVK-2	CF:irregular, CM:undulate CE:convex	Gram negative Rods, Single	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
RRTSA-3	CF:circular, CM:entire CE:raised	Gram positive Rods, Chains	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
RRTSA-5	CF:circular, CM:entire CE:raised	Gram positive Rods, Chains	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
RRTSA-6	CF:circular, CM:entire CE:flat	Gram positive Rods, Chains	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
RSTSA-1	CF:irregular, CM:undulate CE:raised	Gram positive Rods, Chains	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
RSISP2-1	CF:irregular, CM:undulate CE:raised	Gram positive Rods, Chains	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
RLISP2-1	CF:irregular, CM:undulate CE:raised	Gram positive Rods, Chains	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Remark: CF=colony form, CM=colony margin, CE= colony elevation, Fruc=Fructose, Su=Sucrose, Mal=Maltose, Glu=Glucose, Xy=Xylitol, Lac=Lactose, Man=Manitol

Table 5. Identification of selected endophytic bacteria by16S rRNA genes sequencing

Bacterial isolate	Bacteria	Accession number	Query cover	Identities
RRPVK-1	*Bacillus pumilus* strain NJ-M2	NZ_CP012329.1	100%	840/840 (100%)
RRPVK-4	*Paenibacillus favisporus*	LC127090.1	100%	680/680 (100%)
RSPVK-2	*Burkholderia cenocepacia* J2315	NC_011000.1	100%	754/756 (99%)
RRTSA-3	*Bacillus pumilus* strain NJ-M2	NZ_CP012329.1	100%	676/676 (100%)
RRTSA-5	*Bacillus pumilus* strain NJ-M2	NZ_CP012329.1	100%	685/685 (100%)
RRTSA-6	*Paenibacillus alvei* DSM 29 PAV_2c	NZ_AMBZ01000002	100%	686/690 (99%)
RSTSA-1	*Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* strain 168	NC_000964.3	100%	745/745 (100%)
RSISP2-1	*Ralstonia pickettii* 12J	NC_010682.1	98%	738/738 (100%)
RLISP2-1	*Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian* strain 97-27	NC_005957.1	100%	767/767 (100%)

วิจารณ์

ข้อมูลการวิเคราะห์ดิน พบว่า ดินแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์อายุ 10 ปี เป็นดินกรดจัด มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้และอินทรียวัตถุอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง ซึ่งดินที่เป็นกรดจัดจะทำให้ฟอสเฟตทำปฏิกิริยากับธาตุอื่น ๆ เช่น เหล็ก อะลูมิเนียม แล้วอยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ ซึ่งหากพืชขาดฟอสเฟตมีผลทำให้รากพืชไม่เจริญ มีรากฝอยน้อย ต้นแคระแก็รน การเจริญเติบโตหยุดชะงัก (Arai and Sparks, 2007) นอกจากนี้ Kemmitt *et al.* (2006) พบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในดิน ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินและมีผลกับอัตราการเกิดของวัฏจักรคาร์บอนและไนโตรเจนในดินอีกด้วย ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมแก่การปลูกพืชอยู่ระหว่าง 6.0-7.0 ส่วนปริมาณอินทรียวัตถุของดินในการทดลองนี้อยู่ในระดับต่ำ หากปริมาณอินทรียวัตถุน้อยกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าดินมีระดับความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ซึ่งปริมาณอินทรียวัตถุที่เหมาะสมต่อการปลูกพืชควรอยู่ระหว่าง 2.5-4.5 เปอร์เซ็นต์ (อภิรดี, 2542) ซึ่งการใส่อินทรียวัตถุในดินเป็นการช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของดินทั้งทางกายภาพและเคมีของดินให้ดีขึ้น เช่น ช่วยส่งเสริมให้อนุภาคของดินจับตัวเป็นก้อน ดินมีโครงสร้างดีและร่วนมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก การระบายน้ำดี ความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้น และยังช่วยเพิ่มปริมาณธาตุอาหารพืชในดิน เพิ่มการดูดซับธาตุอาหารของพืช และยังช่วยเพิ่มความต้านทานการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของดิน นอกจากนี้ ยังเป็นแหล่งธาตุอาหารของจุลินทรีย์ในดิน จึงมีผลช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และลดจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืชได้ (บัญชา, 2555) และในการทดลองนี้ พบว่า ความหนาแน่นของดิน ค่าความจุความชื้นภาคสนาม และสภาพการนำน้ำขณะอิ่มตัวของดินอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง ซึ่งความหนาแน่นรวมของดินที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกพืชเฉลี่ย 1.32 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความหนาแน่นรวมของดินมีผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน ในด้านปริมาณน้ำและอากาศในดิน เมื่อดินมีความหนาแน่นรวมสูงขึ้นสัดส่วนของน้ำจะมีมากขึ้น เพราะช่องว่างที่เก็บน้ำมากขึ้น นอกจากนี้ ความหนาแน่นของดินยังมีผลต่อการแพร่กระจายของรากพืช ดินที่มีความหนาแน่นรวมมากเกินไป หรือไม่เหมาะสม มีผลทำให้จำกัดการเจริญเติบโตของพืช ควรปรับปรุงดินด้วยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และค่าความจุความชื้นภาคสนามของดินในการทดลองนี้ มีค่าสูงกว่าค่าที่เหมาะสมสำหรับการเพาะปลูกพืช ซึ่งค่าความชื้นในภาคสนามของเนื้อดินมีค่าประมาณ 34.60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะมีน้ำที่เป็นประโยชน์ต่อพืชอยู่ 14.30 เปอร์เซ็นต์ (เกษมศรี, 2541) และ Xue *et al.* (2017) พบว่า ดินที่มีปริมาณน้ำมากมีผลกระทบต่อการหายใจของดินสูงขึ้น 2 เท่า และพบชีวมวลของจุลินทรีย์ในดินที่มีค่าความจุความชื้นภาคสนาม 10 เปอร์เซ็นต์สูงกว่าที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ และหากปริมาณน้ำในดินมากยังมีผลทำให้การใช้ประโยชน์ของไนโตรเจนของพืชลดลงอีกด้วย ในการทดลองนี้ พบว่า ค่าสภาพการนำน้ำขณะอิ่มตัวของดินอยู่ในระดับต่ำ หากดินมีค่าการนำน้ำของดินในสภาพอิ่มตัวด้วยน้ำน้อยกว่า 0.5 cm/hr ถือว่าดินมีอัตราซาบซึมของน้ำช้า ซึ่งความสามารถในการให้น้ำซึมผ่านได้ของดินจะเป็นตัวจำกัดการใช้ประโยชน์ที่ดินเพื่อการปลูกพืช ดินที่มีความสามารถในการซาบซึมน้ำช้าเหมาะสมสำหรับนาข้าว ดินที่มีความสามารถในการซาบซึมน้ำปานกลาง โดยมากจะเหมาะสมสำหรับพืชไร่ หรือไม้ยืนต้นทั่วไป ส่วนดินที่มีความสามารถในการซาบซึมน้ำได้เร็วมักไม่เหมาะสมในการปลูกพืช เพราะนอกจากน้ำในดินจะซึมหายไปเร็วแล้วโอกาสที่ธาตุอาหารจะสูญเสียไปจากดินโดยการชะล้างลงสู่ข้างล่างจะมีมากอีกด้วย ซึ่ง Whelan *et al.* (2013) พบว่า การใส่ปุ๋ยหมักลงไปในดินจะทำให้มีผลต่อค่าการนำน้ำของดินในสภาพอิ่มตัวด้วยน้ำของดินเพิ่มขึ้น ทำให้มีรูพรุนในดินมีขนาดใหญ่ขึ้น และปุ๋ยหมักยังช่วยเพิ่มให้การกักเก็บน้ำของดินดีขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้ ปริมาณน้ำในดินมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตในดิน เช่น สัตว์ พืช รวมทั้งจุลินทรีย์อีกด้วย ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลจากการวิเคราะห์ดินมีผลช่วยให้เกษตรกร หรือผู้เพาะปลูกพืชมีข้อมูลในการจัดการดินให้มีความอุดมสมบูรณ์ เช่น การจัดการธาตุอาหาร หรือการให้ปุ๋ยแก่พืชเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชให้สูงขึ้นได้ โดย Surekha *et al.* (2013) พบว่า การจัดการดินในระบบเกษตรอินทรีย์ มีผลช่วยปรับปรุงคุณภาพ

ทางด้านกายภาพ เคมี และชีววิทยาของดิน ซึ่งการทำเกษตรอินทรีย์หลังจาก 5 ปี เป็นดัชนีบ่งบอกถึงความยั่งยืนของดิน และยังพบว่า ช่วยเพิ่มคุณภาพทางโภชนาการของข้าวที่มีสีน้ำตาลอีกด้วย นอกจากนี้ Xia *et al.* (2015) พบว่า การจัดการระบบเกษตรอินทรีย์จะช่วยให้มีจำนวนและความหลากหลายของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์มากกว่าระบบเกษตรทั่วไป ซึ่งการเติมอินทรียวัตถุลงในดินแปลงเกษตรอินทรีย์ระยะเวลายาวนาน จะช่วยเพิ่มความสามารถในการกักเก็บน้ำและลดความหนาแน่นของดิน รวมทั้งส่งเสริมกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินให้ดีขึ้น (Sihi *et al*., 2017) ส่วนการเพิ่มอินทรียวัตถุ ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ส่งผลให้มีอินทรียวัตถุและมีการปลดปล่อยฟอสเฟตในดินเพิ่มขึ้น และยังช่วยให้ดินมีค่าการนำไฟฟ้าดีขึ้นด้วย (Zhang *et al*., 2013)

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ละลายฟอสเฟต ในการทดลองนี้ แยกได้จากส่วนรากข้าวมากกว่าส่วนอื่น เนื่องจากรากเป็นบริเวณที่สัมผัสกับดิน และรากพืชมีการขับสารบางอย่าง เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล ที่เป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ จึงทำให้พบจุลินทรีย์อาศัยอยู่หนาแน่น (Edwards *et al*., 2015) การเกิดวงใสบนอาหารแข็งของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการคัดเลือกขั้นต้น เกิดจากแบคทีเรียปลดปล่อยกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ออกมา เช่น ซัคซินิค ออกซาลิก และ โพรพิโอนิก รวมทั้งยังเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเตสอีกด้วย (Anand *et al*., 2016) มีรายงานการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากข้าว โดย ภัทธนวรรณ์ (2557) พบว่า แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวหอมมะลิแดงละลายฟอสเฟตได้สูงสุด 191.02 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และเมื่อเชื้อสร้างกรดปริมาณสูงขึ้นทำให้ละลายฟอสเฟตมากขึ้น ส่วน Duangpaeng *et al*. (2012) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวอินทรีย์อายุ 4 ปี ละลายฟอสเฟตได้ 52.90-98.90 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่ง Phetcharat and Duangpaeng (2012) รายงานว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากข้าวอินทรีย์อายุ 1-3 ปี ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 14. 58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสุจิตตรา และคณะ (2556) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรีละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 465.90 และ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ จีราภรณ์ และคณะ (2560) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Brevibacillus agri* ที่แยกได้จากดินรอบรากพืชในพื้นที่ของศูนย์พัฒนาพันธุ์พืชจักรพันธ์เพ็ญศิริ จังหวัดเชียงราย สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูงสุดเท่ากับ 126 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่า เชื้อข้างต้นมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกขี้หนูโดยช่วยเพิ่มจำนวนใบต่อต้น ความสูง ความยาวของราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งทั้งในส่วนที่เหนือดินและส่วนของรากให้มากขึ้นอีกด้วย

ในการทดลองนี้ พบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ซึ่ง ภัทธนาวรรณ์ (2557) รายงานว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากรากข้าวหอมมะลิแดง ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อนเช่นกัน แบคทีเรีย RRTSA-6 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถทั้งละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ มีคุณลักษณะทางชีวเคมี และการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้คล้ายกับแบคทีเรีย *P. alvei* ที่แยกได้จากตัวผึ้ง (Djordjevic *et al*., 2000) และสอดคล้องกับผลการศึกษาลำดับเบสของแบคทีเรีย RRTSA-6 ที่มีลักษณะเหมือนกับ *Paenibacillus alvei* ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองนี้ พบว่า เชื้อที่ละลายฟอสเฟตได้ดีเป็นเชื้อ *P. favisporus*, *B. cenocepacia*, *B. subtilis*, *R. pickettii*, *P. alevei* และ *B. thuringiensis* ซึ่งพบว่า *B. cenocepacia* เป็นเชื้อที่ละลายฟอสเฟตได้สูงสุด จากรายงานของ Gofar *et al.* (2015) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Burkhoeria pseudomallei* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของข้าวที่ปลูกในพื้นที่ลุ่มสามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ และมีผลช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากของข้าวได้ นอกจากนี้ Xuan *et al.* (2016) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Burkholderia vietnamiensis* สามารถประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพไปปรับใช้กับดินที่อยู่ในสภาวะดินที่เป็นกรด เพื่อให้ได้ผลผลิตของข้าวสูงขึ้น และยังเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัยสำหรับการเกษตร ส่วน Midekssa *et al.* (2015) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Burkholderia* sp. และ *B. subtilis* นอกจากจะผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้แล้วยังสามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่ก่อโรคพืชได้ และยังมีรายงานว่า

Paenibacillus sp. สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้ เช่น lantibiotics, lipopeptides และ macrolide (Wu *et al.* 2011) นอกจากนี้ Rodrigues *et al.* (2006) พบว่า lipopeptides มีฤทธิ์ในการต้านไวรัส ช่วยเสริมคุ้มกัน หรือยับยั้งสารพิษหรือเอนไซม์อย่างจำเพาะ

ในการทดลองนี้ พบว่า แบคทีเรีย RRTSA-6 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากข้าว มีคุณสมบัติทั้งการผลิตกรดอินโดลอะซิติกและละลายฟอสเฟตได้ ดังนั้น น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่ได้เชื้อที่มีคุณสมบัติทั้งสองลักษณะข้างต้นอยู่ในเชื้อเดียวกัน นอกจากนี้ ในการทดลองนี้ ยังแยกได้เชื้อที่มีประโยชน์ในทางการเกษตร เช่น *B. thruringiensis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ช่วยในการกำจัดแมลงศัตรูพืช เป็นเชื้อที่มีความจำเพาะ ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดี (Roh *et al.,* 2007) นอกจากนี้ ยังมีรายงานของ Shrestha *et al.* (2016) พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* และ *Bacillus methylotrophicus* ที่แยกได้จากข้าวมีศักยภาพในการควบคุมโรคข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีประโยชน์ต่อพืช 3 ด้าน ได้แก่ ช่วยให้พืชทนทานต่อสภาวะเครียด ช่วยให้พืชทนทานต่อเชื้อก่อโรคพืช และเป็นปุ๋ยชีวภาพ ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (de Souza *et al.*, 2015) โดย Khan *et al.* (2009) กล่าวว่า หากใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและไมคอไรซา โดยใช้ในรูปแบบเชื้อผสมจะทำให้มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชดียิ่งขึ้น

สรุป

ดินจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์อายุ 10 ปี มีคุณภาพระดับต่ำถึงปานกลาง ซึ่งพบเชื้อที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวหอมมะลิแดงที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดคือ *Burkholderia cenocepacia* RSPVK-2 และพบว่า *Paenibacillus alvei* RRTSA-6 สามารถทั้งละลายฟอสเฟตและผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ ซึ่งน่าประยุกต์ใช้เชื้อข้างต้นช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน นอกจากนี้ ยังมีแนวทางที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกเพื่อใช้ในการกำจัดวัชพืช หรือการใช้เชื้อที่คัดเลือกได้ร่วมกับเชื้ออื่น รวมทั้ง การหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ จากเชื้อข้างต้นแล้วนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำน้อย หรือพื้นที่แห้งแล้งอันเกิดจากภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตข้าวอินทรีย์ให้สามารถแข่งขันกับนานาประเทศได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนวิจัยนี้ รวมทั้งขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และสถานที่ในการปฏิบัติงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

เกษมศรี ซับซ้อน. 2541. ปฐพีวิทยา. นานาสิ่งพิมพ์, กรุงเทพฯ. 286 หน้า.

จีราภรณ์ อินทสาร ฉัตรปวีณ์ เดชจิรรัตนสิริ และ ประวิทย์ บุญมี. 2560. ผลของแบคทีเรียที่ผลิตสาร indole-3-acetic acid (IAA) ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณธาตุอาหารของพริกขี้หนู. วารสารเกษตร 33(3): 333-344.

บัญชา รัตนีทู. 2555. ปุ๋ยอินทรีย์กับการปรับปรุงดินเสื่อมคุณภาพ. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ 4(2): 115-127.

ภัทธนาวรรณ์ ฉันท์รัตนโยธิน. 2557. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสลายฟอสเฟตจากดินรอบรากของข้าวหอมมะลิแดง. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. 55 หน้า.

สุจิตรา ปะนันโต ภาคภูมิ ตันเตชสาธิต ศิริลักษณ์ จิตรอักษร รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. 2556. เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว. แก่นเกษตร 41(4): 457-468.

สมคิด ดีจริง และ วิชญาพร ปาวงค์. 2560. การแยก การคัดเลือกและการระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโด-ไฟท์ละลายฟอสเฟตจากข้าวแปลงเกษตรอินทรีย์ 5 ปี. หน้า 144-151. *ใน*: รายงานประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิรดี อิ่มเอิบ. 2542. แนวทางปรับปรุงคุณภาพทางเคมีของดินในประเทศไทย. วารสารพัฒนาที่ดิน 36 (376): 24-38.

Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research 163(2): 173-181.

Ahmed, S.A., E. Shakh, K.U. Kakar, X. Wang, A.A. Almoneafy, M.R. Ojaghian M.R., B. Li, S.I. Anjum and G. Xie. 2015. Controlling bacterial leaf blight of rice and enhancing the plant growth with endophytic a rhizobacterial *Bacillus* strains. Toxicological and Environmental Chemistry 97(6): 55-63.

Anand, K., B. Kumari and M.A. Mallick. 2016. Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 8(2): 37-40.

Arai, Y. and D.L. Sparks. 2007. Phosphate reaction dynamics in soils and soil minerals: a multiscale approach. Advances in Agronomy 94: 135-179.

Araújo, W.L., J. Marcon, W. Maccheroni, Jr., J.D. Van Elsas, J.W. Van Vuurde and J.L. Azevedo. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Applied and Environmental Microbiology 68(10): 4906-4914.

Blake, G.R. 1965. Particle density. pp. 371-373. *In*: G.R. Blake (ed.). Methods of Soil Analysis. Part I: Physical and Mineralogical Properties, Including Statistics of Measurement and Sampling. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin.

Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. Soil Science 59: 39-45.

de Souza, R., A. Ambrosini and L.M. Passaglia. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology 38(4): 401-419.

Djordjevic, S.P., W.A. Forbes, L.A. Smith and M.A. Hornitzky. 2000. Genetic and biochemical diversity among Isolates of *Paenibacillus alvei* cultured from Australian honeybee (*Apis mellifera*) colonies. Applied and Environmental Microbiology 66(3): 1098-1106.

Duangpaeng, A., P. Phetcharat, S. Chanthapho, N. Boonkantong and N. Okuda. 2012. The study and development of endophytic bacteria for enhancing organic rice growth. Procedia Engineering 32: 172-176.

Edwards, J., C. Johnson, C. Santos-Medellín, E. Lurie, N.K. Podishetty, S. Bhatnagar, J.A. Eisen and V. Sundaresan. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112(8): E911-20, doi: 10.1073/pnas.1414592112.

Gardner, W.H. 1986. Water content. pp. 493- 544. *In*: A. Klute (ed.). Methods of Soil Analysis. Part I: Physical and Mineralogical Methods.

American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin.

Gofar, N., H. Widjajanti and N. Marlina. 2015. Stimulate the growth of rice using endophytic bacteria from lowland rice plant tissue. Journal of Soil Science and Agroclimatology 12(2): 45-52.

Hossain, M.T., A. Khan, E.J. Chung, M.H. Rashid and Y.R. Chung. 2016. Biological control of rice bakanae by an endophytic *Bacillus oryzicola* YC7007. Plant Pathology Journal 32(3): 228-241.

Jackson, M.L. 1958. Soil Chemical Analysis. Practice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. 521 p.

Kemmitt, S.J., D. Wright, K.W.T. Goulding and D.L. Jones. 2006. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry 38(5): 898-911.

Khan, A.A., G. Jilani, M.S. Akhtar, S.M.S Naqvi and M. Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. Journal of Agriculture and Biological Sciences 1(1): 48-58.

Klute, A. and C. Dirksen. 1986. Hydraulic conductivity and diffusivity: Laboratory methods. pp. 687-734. *In*: A. Klute (ed.). Methods of Soil Analysis. Part I: Physical and Mineralogical Methods. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin.

Midekssa, M.J., C.R. Löscher, R.A. Schmitz and F. Assefa. 2015. Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from lentil growing areas of Ethiopia. African Journal of Microbiology Research 9(25): 1637-1648.

Olayemi, O.P. and O.O. Odedara. 2017. Screening of endophytic plant growth-promoting bacteria isolated from two Nigerian rice varieties. Nigerian Journal of Biotechnology 33: 1-10.

Peech, M. 1965. Soil pH by glass electrode pH meter. pp. 687-734. *In*: A. Klute (ed.). Methods of Soil Analysis. Part II: Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin.

Phetcharat, P. and A. Duangpaeng. 2012. Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. Procedia Engineering 32: 177-183.

Rodrigues, L., I.M. Banat, J. Teixeira and R. Oliveira. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57(4): 609-618.

Roh, J.Y., J.Y. Choi, M.S. Li, B.R. Jin and Y.H. Je. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. Journal of Microbiology and Biotechnology 17(4): 547-559.

Shrestha, B.K., H.S. Karki, D.E. Groth, N. Jungkhun and J.H. Ham. 2016. Biological control activities of rice associated *Bacillus* sp. strains against sheath blight and bacterial panicle blight of rice. PLoS One 11(1): e0146764, doi: 10.1371/journal.pone. 0146764.

Sihi, D., B. Dari, D.K. Sharma, H. Pathak, L. Nain and O.P. Sharma. 2017. Evaluation of soil health in organic vs. conventional farming of basmati rice in North India. Journal of Nutrition and Soil Science 180(3): 389-406.

Surekha, K., K.V. Rao, N. S. Rani, P.C. Latha and R.M. Kumar. 2013. Evaluation of organic

and conventional rice production systems for their productivity, profitability, grain quality and soil health. Agrotechnology S11: 1-6.

Surekha, K.K. and Y.S., Satishkumar. 2014. Productivity, nutrient balance, soil quality, and sustainability of rice (*Oryza sativa* L.) under organic and conventional production systems. Communications In Soil Science and Plant Analysis 45(4): 415-428.

Whelan, A., C. Kechavarzi, F. Coulon, R. Sakrabani and R. Load. 2013. Influence of compost amendments on the hydraulic functioning of brownfield soils. Soil Use and Management 29: 260-270.

Wu, X.C., C.D. Qian, H.H. Fang, Y.P. Wen, J.Y. Zhou, Z.J. Zhan, R. Ding, O. Li and H. Gao. 2011. Paenimacrolidin, a novel macrolide antibiotic from *Paenibacillus* sp. F6–B70 active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbial Biotechnology 4(4): 491–502.

Xia, Y., S. DeBolt, J. Dreyer, D. Scott and M.A. Williams. 2015. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. Frontiers in Plant Science 6: 490, doi: 10.3389/fpls.2015.00490.

Xuan, L.N.T., T.V. Dung, N.N. Hung and C.N. Diep. 2016. Isolation and characterization of rice endophytic bacteria in acid bacteria in acid sulphate soil of Mekong delta Vietnam. World Journal of Phamacy and Pharmaceutical Sciences 5(8): 301-317.

Xue, R., Y. Shen Y. and P. Marschner. 2017. Soil water content during and after plant growth influence nutrient availability and microbial biomass. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 17(3): 702-715.

Zhang, X., L. Chen, Q. Li, X. Qi and S. Yang. 2013. Increase in soil nutrients in intensively managed cash-crop agricultural ecosystems in the Guanting Reservoir catchment, Beijing, China. Geoderma 193-194: 102-108.