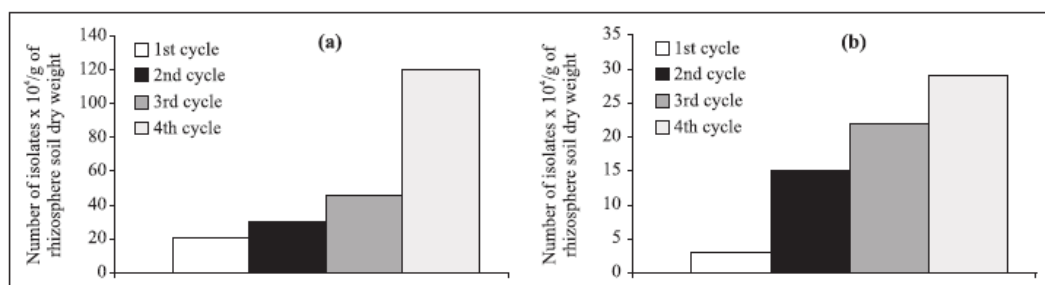


บทนำ

1. ดินบริเวณไรโซสเฟียร์ (Rhizosphere soil)

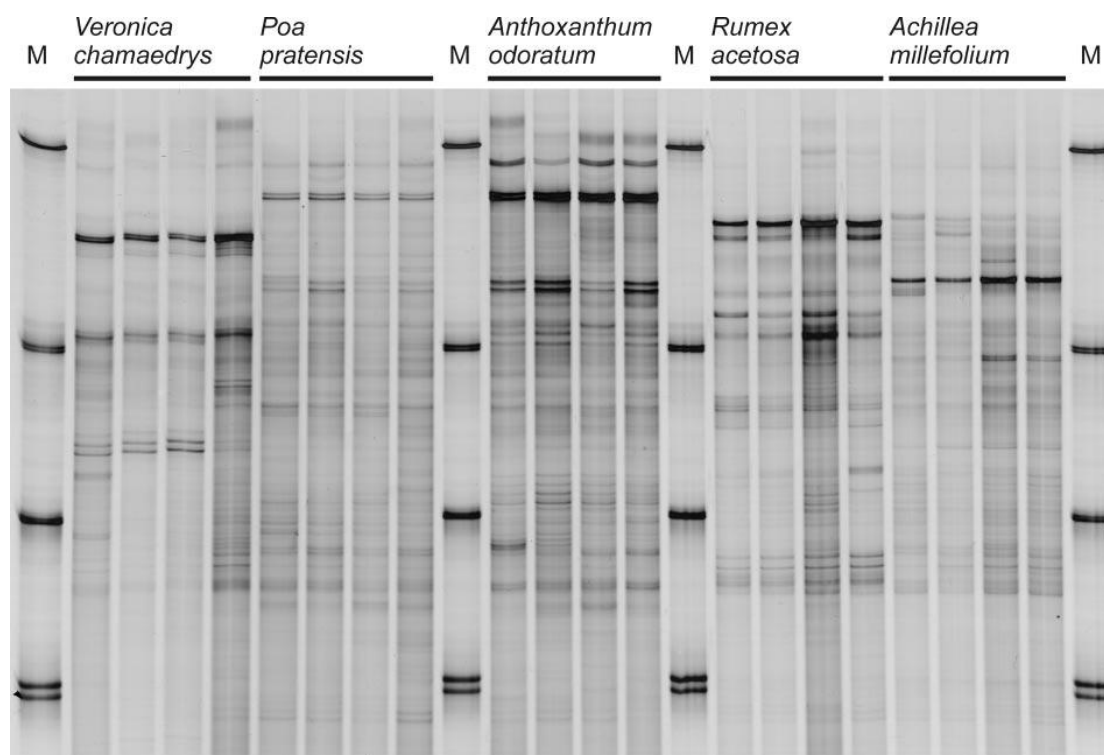
ไรโซสเฟียร์ (Rhizosphere) หมายถึง ดินบริเวณรอบรากพืชที่มีสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่ได้รับอิทธิพลจากพืช โดยการปลดปล่อยสารเมแทบอลิต์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมออกจากรากของพืชไปสู่ดินบริเวณโดยรอบรากพืช สารเมแทบอลิต์เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล คาร์โบไฮเดรต วิตามิน โปรตีน และกรดอินทรีย์ (Whipps, 1990) สารต่างๆ ที่หลั่งออกมาจากรากพืชนั้น จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งอาหารในการเจริญเติบโต (Whipps, 1990; Bending, 2003) จึงทำให้จุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์มีกิจกรรม รวมถึงจำนวนจุลินทรีย์และความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มากกว่าในดินบริเวณที่ห่างไกลออกไป (Marilley and Aragno, 1999) เช่น สารที่หลั่งออกมาจากรากข้าวโพดทำให้ *Pseudomonas fluorescence* ที่อยู่ในบริเวณไรโซสเฟียร์ของรากข้าวโพดมีการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชออกซินในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น (Benizri, 1998) หรือในการศึกษาของ Botelho (2001) พบว่ากลุ่มประชากร และการผลิตสาร phenazine ของ fluorescent *Pseudomonads* เพิ่มขึ้นในแต่ละฤดูการปลูกของถั่วเหลืองเนื่องจากอิทธิพลของดินบริเวณของไรโซสเฟียร์ดังแสดงในภาพที่ 1 และในทางกลับกัน การดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ก็ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของดินบริเวณไรโซสเฟียร์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสมดุลของธาตุอาหาร การเพิ่มธาตุอาหารให้แก่ดินโดยจุลินทรีย์เพิ่มการหมุนเวียนน้ำและแร่ธาตุ นอกจากนี้ยังมีการสร้างสารประกอบต่างๆ เช่น วิตามิน กรดอินทรีย์ และเอนไซม์ มีผลทำให้การเจริญและพัฒนาของพืชเพิ่มมากขึ้น รวมถึงการลดความเป็นพิษของสารพิษและการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เช่น การเพิ่มความสามารถในการดูดใช้ไนโตรเจนของต้นทานตะวัน โดยไรโซเบียมในบริเวณไรโซสเฟียร์ของต้นทานตะวัน (Alami *et al.*, 2000) การเพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคของมะเขือเทศ โดยการผสม *Azospirillum brasilense* ซึ่งเป็นแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์พร้อมกับเมล็ดมะเขือเทศ เมื่อนำเมล็ดไปเพาะพบว่าประชากรของ *Pseudomonas syringae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในมะเขือเทศลดน้อยลง (Alexander, 1997; Bashan and Bashan, 2005) การเปลี่ยนแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เป็นพิษต่อรากข้าวไปเป็นซัลเฟตหรือธาตุกำมะถันที่ไม่เป็นพิษโดย *Beggiatoa* ที่อาศัยอยู่ในบริเวณไรโซสเฟียร์ของรากพืช



ภาพที่ 1 กลุ่มประชากรของ fluorescent Pseudomonads ในบริเวณไรโซสเฟียร์ของถั่วเหลือง ในแต่ละช่วง
การปลูก (a) กลุ่มประชากรของ fluorescent Pseudomonads ทั้งหมด (b) สาร phenazine ที่
ผลิตขึ้นโดย fluorescent Pseudomonads

ที่มา: Botelho (2001)

ไรโซสเฟียร์แบ่งออกเป็นบริเวณต่างๆ คือ endorhizosphere (ชั้น endodermis และ cortical ของรากพืช) rhizoplane (ชั้น epidermis และ mucilaginous polysaccharide ของรากพืช) และ ectorhizosphere (ดินบริเวณที่สัมผัสกับรากพืช) (Lemanceau *et al.*, 1995; Mirleau *et al.*, 2001) ดินบริเวณไรโซสเฟียร์จะมีโครงสร้างและความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์แปรผันตามชนิดของดิน (Marschner *et al.*, 2001) ชนิดของพืช ระยะเวลา ระยะห่างจากบริเวณไรโซสเฟียร์ (Smalla *et al.*, 2001) และความแตกต่างของคุณภาพและปริมาณของสารที่พืชปลดปล่อยออกมา (Yang *et al.*, 2001) เช่น ความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จะลดลงตามระยะห่างจากรากพืชที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นประชากรจุลินทรีย์จากบริเวณไรโซสเฟียร์จากพืชชนิดเดียวกันอยู่ในภูมิภาคและภูมิอากาศเหมือนกันโครงสร้างและความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์อาจมีความแตกต่างกันก็ได้ เช่น ในการศึกษาของ Dohrmann และ Tebbe (2005) โดยปลูกพืชจำพวก herbaceous (*Veronica chamaedrys*, *Poa pratensis*, *Anthoxanthum odoratum*, *Rumex acetosa* and *Achillea millefolium*) ในดินชนิดเดียวกัน แล้วทำการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ในแต่ละพืชที่ปลูก พบว่ากลุ่มประชากรของจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์มีความหลากหลายแตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดพืชที่ปลูกดังแสดงในภาพที่ 2 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในดินบริเวณไรโซสเฟียร์ส่วนใหญ่ได้แก่ *Pseudomonas* *Flavobacterium* *Alcaligenes* และ *Agrobacterium* เป็นต้น (Alexander, 1997)



ภาพที่ 2 ความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของรากพืชจำพวกherbaceous (*Veronica chamaedrys*, *Poa pratensis*, *Anthoxanthum odoratum*, *Rumex acetosa* and *Achillea millefolium*)

ที่มา: Dohrmann and Tebbe (2005)

2. ธาตุอาหารและการเจริญเติบโตของพืช

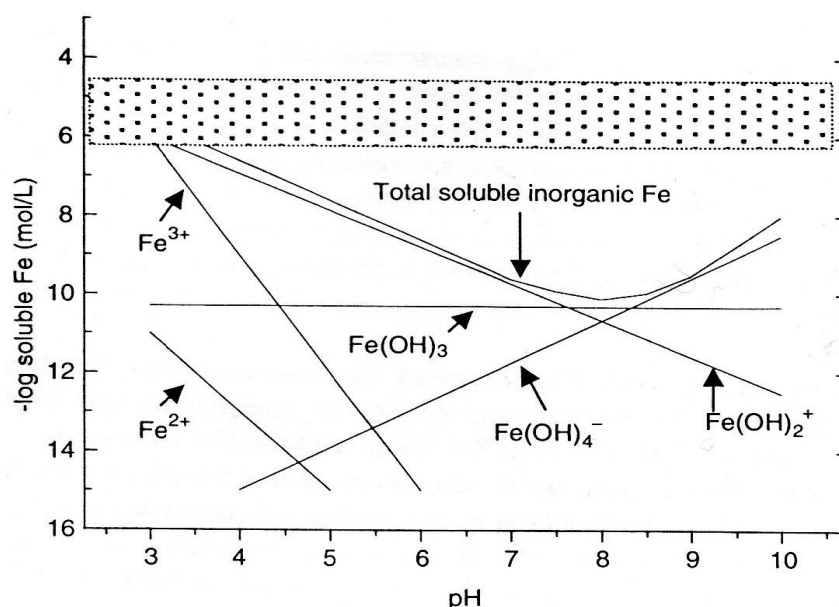
ดินเป็นวัสดุส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเป็นสิ่งที่รากพืชใช้ยึดเหนี่ยวเพื่อการเจริญเติบโต อีกทั้งดินยังช่วยรักษาระดับ pH ป้องกันอันตรายจากสารพิษ และการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ในการเจริญเติบโตของพืช ธาตุอาหารที่จำเป็นที่พืชต้องการมีทั้งหมด 17 ธาตุ ดังนี้ C H O N P K Ca Mg S B Cu Co Fe Mn Mo Zn และCl ซึ่งส่วนใหญ่เป็นธาตุอาหารที่ได้มาจากดิน (Harpstead *et al.*, 2001) และการเจริญเติบโตของพืชจะถูกจำกัดด้วยความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารในดินรวมทั้งความเป็นพิษของธาตุบางธาตุในดิน ธาตุอาหารพืชแบ่งออกเป็นธาตุอาหารมหธาตุ และจุลธาตุอาหาร ธาตุอาหารมหธาตุก็จะเป็นในส่วนของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองซึ่งเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก ส่วนจุลธาตุอาหารเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) แต่จุลธาตุก็มีความสำคัญต่อพืชไม่ยิ่งหย่อนกว่าธาตุอื่นๆ เพราะถ้าหากมีไม่เพียงพอกับความต้องการของพืชแล้ว พืชย่อมจะเจริญเติบโตและให้ผลผลิตน้อยลง และพืชอาจตายเสียก่อนที่จะให้ผลผลิตได้หากขาดแคลนอย่างรุนแรง (Frederick and Thompson, 2005) ดังนั้นความสมดุลของจุลธาตุอาหารในดินเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อ

ความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหาร และเป็นปัจจัยที่ควบคุมได้ยากมากกว่าความสมดุลของธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง ทั้งนี้เพราะช่วงระดับที่เหมาะสมของจุลธาตุอาหารนั้นค่อนข้างจะแคบพืชจึงมีโอกาสสูงในการขาดจุลธาตุ (FIFA, 2006) นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลร่วมระหว่างธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรองกับจุลธาตุ หรือระหว่างจุลธาตุด้วยกันเอง ที่ขัดขวางหรือยับยั้งความเป็นประโยชน์ซึ่งกันและกันที่เรียกว่า สมภาวะปฏิปักษ์ (antagonism) (Gobat *et al.*, 2004) จึงทำให้มีโอกาสขาดแคลนจุลธาตุต่างๆ มากขึ้นอีกด้วย และสำหรับดินในประเทศไทยมีการใส่ปุ๋ยจุลธาตุอาหารลงไปดินน้อยมาก เพราะปุ๋ยจุลธาตุมีราคาแพง เกษตรกรส่วนใหญ่มีความยากจน และบางส่วนไม่มีความรู้ความเข้าใจไม่เห็นถึงความสำคัญของจุลธาตุอาหารทำให้ดินในประเทศไทยมีโอกาสในการขาดจุลธาตุสูง (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

2.1 ธาตุเหล็ก

ธาตุเหล็กเป็นธาตุอาหารจุลธาตุชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช โดยเป็นองค์ประกอบในโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ สำหรับโปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (Bienfait and Mark, 1983) ชนิดแรกคือ ฮีมโปรตีน ประกอบด้วยไซโตโครม ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการหายใจ เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์คาทาเลส เพอร์ออกซิเดส และเลกฮีโมโกลบิน ชนิดที่สอง คือ เฟอร์ริดอกซิน เป็นโปรตีนที่มีเหล็กและกำมะถันเป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง การรีดิวซ์ไนโตรเจน การรีดิวซ์ซัลเฟต และการตรึงไนโตรเจน (Marschner *et al.*, 2001) เหล็กมีบทบาทในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช 3 ชนิด คือ จิบเบอเรลลิน เอทิลีน และกรดจาสโมนิก (Sharma, 2006) นอกจากนี้เหล็กยังทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของปฏิกิริยาออกซิเดชัน และรีดักชันในพืช เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ การตรึงไนโตรเจนและการลดพิษของอนุมูลอิสระ และยังมีบทบาทสำคัญในการสร้างคลอโรพลาสต์ในใบ (Havlin *et al.*, 2005)

เหล็กเป็นธาตุที่มีมากในดิน คือ มีประมาณ 7,000–500,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Fageria *et al.*, 2002) แต่โดยทั่วไปเหล็กจะอยู่ในรูปของสารประกอบเหล็กที่ละลายน้ำยาก หรือไม่ละลายเลย การละลายของเหล็กขึ้นอยู่กับค่า pH ค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลของสารละลายดิน และความสามารถในการละลายน้ำของเหล็กในรูปต่างๆ (Crowley, 2006) โดยทั่วไปการละลายน้ำของเหล็กอยู่ที่ประมาณ 10^{-8} โมลาร์ ที่ pH 4 และการละลายได้ของเหล็กจะลดลงถึง 10^{-20} โมลาร์ เมื่อ pH ของดินเพิ่มขึ้นเป็น 8 (Lindsay, 1995) เฟอริกไฮดรอกไซด์เป็นรูปหนึ่งของเหล็กที่ละลายน้ำได้ และเฟอริกในสารละลายจะถูกไฮโดรไลต์ไปอยู่ในรูปของ $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ และ $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ ในสารละลายดิน (ภาพที่ 3) โดยปกติพืชจะต้องการเหล็กในปริมาณน้อย คือ ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เหล็กถูกดูดซึมโดยรากพืชในรูปเฟอรัสไฮดรอกไซด์ (Fe^{2+}) และรูปเฟอริกไฮดรอกไซด์ (Fe^{3+}) แต่เนื่องจากการละลายของเหล็กจะลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ดังนั้นการปลูกพืชในดินด่างพืชจึงมีโอกาสขาดเหล็กได้ (Lindsay and Schwab, 1992)



ภาพที่ 3 ความสามารถในการละลายของเหล็กในสารละลายดิน

ที่มา: Lindsay (1995); Romheld and Marscher (1986)

2.2 ปัจจัยที่ควบคุมความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็กในดิน

2.2.1 ความเป็นกรดเป็นด่างในดิน เหล็กจะละลายน้ำและเป็นประโยชน์ต่อพืชได้มากในดินที่มี pH เป็นกรด แล้วจะลดระดับความเป็นประโยชน์ลงในดินที่มี pH ดินเป็นด่าง จากการศึกษพบว่าความสามารถในการละลายได้ของ Fe^{3+} จะลดลง 1,000 เท่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้นหนึ่งหน่วย และมีปริมาณต่ำกว่า 10-20 โมลาร์ เมื่อ pH สูงกว่า 7.5 (Lindsay, 1979) โดยเหล็กจะถูกเปลี่ยนเป็นไฮดรอกไซด์หรือออกไซด์ที่ละลายน้ำได้ยาก และตกตะกอน (Brady and Weil, 2002) ดังนั้นจึงจะเกิดภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ในดินที่เป็นด่างมากๆ นอกจากนี้ความรุนแรงของภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ยังขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ภูมิอากาศ การจัดการฟาร์ม และพันธุกรรมของพืชอีกด้วย (Romheld and Nikolic, 2007)

2.2.2 สภาพออกซิเดชัน หรือรีดักชัน ในสภาพออกซิไดซ์ โดยปกติแล้วเหล็กจะละลายน้ำได้ยากมากโดยเฉพาะในระดับ pH ดินทั่วไป เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพรีดักชัน เช่น เมื่อดินอยู่ในสภาพที่ขาดออกซิเจน โดยเป็นดินที่มีน้ำขังหรือที่เรียกว่าอยู่ในสภาพรีดักชัน เหล็กจะละลายออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ดีกว่าในดินดอนที่มีการถ่ายเทอากาศดี (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

2.2.3 การเกิดปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ เช่น การใส่ปุ๋ยลงไปในดินในปริมาณมาก อาจทำให้เกิดการขาดธาตุเหล็กในพืชได้ เพราะเหล็กจะถูกเปลี่ยนให้เป็นรูปออกไซด์ซึ่งมีความสามารถในการละลายต่ำ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) นอกจากนี้ไบคาร์บอเนตไอออน (HCO_3^-) ที่เกิดจากการแปรสภาพของปุ๋ยยังทำปฏิกิริยากับ H^+ ทำให้กลไกการดึงโปรตอนออกนอกเซลล์ผิดปกติ (H^+ -efflux pump) ส่งผลต่อการดูดใช้เหล็กของพืช (ยงยุทธ, 2552)

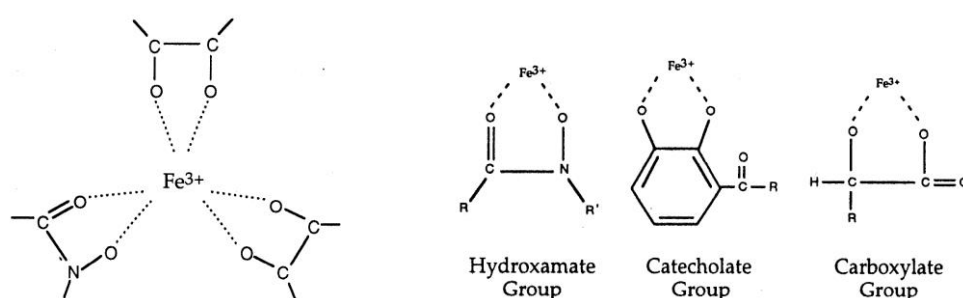
2.2.4 การเกิดปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ ธาตุเหล็กอาจจะทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ประเภทต่างๆ เช่น ฮิวมัส โปรตีน กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์อื่นๆ กลายเป็นสารประกอบที่เรียกว่า สารประกอบเชิงซ้อน สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กในดินอาจอยู่ในรูปที่ละลายน้ำอย่างอิสระ หรือที่ยึดเกาะอยู่กับอนุภาคดินเหนียว โดยปกติถ้าสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กมีโมเลกุลเล็กจะละลายน้ำ ไม่ตกตะกอน และจะเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ ในทางกลับกันถ้าเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กที่มีโมเลกุลใหญ่ก็จะไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนได้ง่าย และถูกพัดพาหรือถูกชะละลายไปได้ง่าย หรือถ้าเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กที่มีขนาดใหญ่มาก ก็จะไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของรากพืชเข้าไปได้ ดังนั้นแม้ว่าเหล็กจะละลายเป็นสารละลายอยู่ในดินได้ แต่ก็ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช นอกจากนี้ความเป็นประโยชน์ต่อพืชของสารประกอบเชิงซ้อน พวกที่มีโมเลกุลใหญ่ยังขึ้นอยู่กับค่าคงตัวด้านเสถียรภาพของมันเมื่อเทียบกับอำนาจการแลกเปลี่ยนไอออนของราก สารที่มีค่าคงตัวด้านเสถียรภาพสูงมากจะเป็นประโยชน์ต่อพืชได้น้อยกว่าสารที่มีค่าดังกล่าวต่ำ (FIFA, 2006; คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

2.3 การขาดเหล็กของพืช

การขาดเหล็กของพืชมักเกิดกับพืชที่อยู่ในดินเนือปุ๋ย เรียกว่า ภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ซึ่งเหนียวน้ำตาลด้วยปูน (lime induced chlorosis) เนื่องจากการหยุดการสร้างคลอโรพลาสต์ และไม่สังเคราะห์คลอโรฟิลล์ พืชแต่ละชนิดจะแสดงอาการขาดธาตุเหล็กแตกต่างกันออกไป แต่ส่วนใหญ่พืชจะแสดงออกที่ใบ โดยเฉพาะที่ใบอ่อนจะมีสีขาว หรือสีเหลืองซีด ใบมีขนาดเล็กลง พืชจะชะงักการเจริญเติบโต (Romheld and Nikolic, 2007) ต่อมาก็จะตายจากยอดลงมา (die back) ส่วนใบล่างจะยังมีสีเขียวอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากเหล็กเป็นธาตุที่ไม่เคลื่อนที่ (immobile) ทำให้แสดงอาการขาดที่ใบอ่อน (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) จากปัญหาการขาดแคลนเหล็กเนื่องจากเหล็กละลายได้น้อยในสารละลายดินจึงทำให้พืชและจุลินทรีย์พยายามที่จะปรับตัวเพื่อเพิ่มการละลายของเหล็กในดินโดยอาศัยกลไกต่างๆ เช่น ในพืชใบเลี้ยงคู่จะมีการขับโปรตอนออกจากราก (Macadam, 2009) ทำให้บริเวณไรโซสเฟียร์มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นและมีรีดอกซ์โพเทนเชียลต่ำ หรือในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และจุลินทรีย์บางชนิดมีการสร้างสารประกอบอินทรีย์ที่เรียกว่า ซิเดอโรฟออร์เพื่อเพิ่มการละลายของเหล็กในสารละลายดิน (Crowley, 2006)

3. ซิเดอโรฟอรั (Siderophore)

ซิเดอโรฟอรั (Siderophore) เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ ในสภาวะที่มีการละลายของเหล็กในสารละลายดินต่ำ (Pinton *et al.*, 2007) ซิเดอโรฟอรัเป็นสารโมเลกุลเล็กมีขนาดประมาณ 500-1,000 ดาลตัน มีลักษณะเป็นสารคีเลต โดยซิเดอโรฟอรัที่ถูกสร้างขึ้นและขับออกมาจากแบคทีเรีย จะเกิดเป็นสารประกอบคีเลตกับเหล็ก ซึ่งในธรรมชาติเหล็กส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของแข็ง หรือถูกดูดซับอยู่ในอินทรีย์วัตถุในรูปของ ฮิวมิน ฮิวมิก และกรดฟูลวิก ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ หรือไม่ละลายน้ำเลย (Crowley, 2006) การเกิดเป็นสารประกอบคีเลตระหว่างเหล็กกับซิเดอโรฟอรัจะทำให้เหล็กอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ พืชและจุลินทรีย์จึงสามารถนำเหล็กไปใช้ประโยชน์ได้ ซิเดอโรฟอรั มีโครงสร้างหลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต ปัจจุบันพบโครงสร้างทางเคมีของซิเดอโรฟอรัมากกว่า 500 ชนิด (Boukhalfa and Crumblid, 2002) การจำแนกซิเดอโรฟอรัจะแบ่งตามหมู่ฟังก์ชัน และประเภทของลิแกนด์ที่ล้อมรอบ ในแต่ละกลุ่มฟังก์ชันจะมีอะตอมของออกซิเจน 2 อะตอม หรือมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่ทำหน้าที่สร้างพันธะกับเหล็กดังที่แสดงในภาพที่ 4 ซิเดอโรฟอรัแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ Phenol catecholate Hydroxamates Carboxylate และ Pyoverdines (Winkelman and Drechsel, 1997)



ภาพที่ 4 ตำแหน่งการเกิดพันธะระหว่างเหล็กและซิเดอโรฟอรั

ที่มา: Glick *et al.* (1999)

3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างซิเดอโรฟอรักับเหล็ก

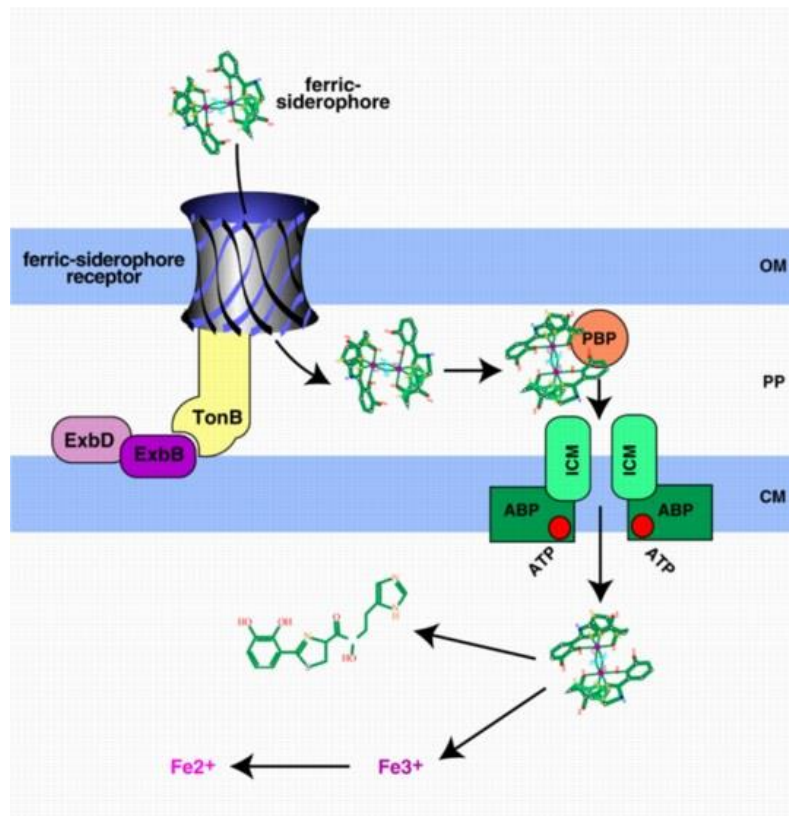
ในสภาวะที่มีออกซิเจนและมีค่า pH เป็นกลาง เหล็กจะมีการละลายต่ำมาก คือ มีการละลายที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10^{-17} โมลาร์ เนื่องจากเหล็กจะรวมตัวกับไฮดรอกไซด์ ซิลิเกต หรือฟอสเฟต เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นจุลินทรีย์จึงมีการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่มีสารละลายเหล็กในดินปริมาณน้อย โดยการผลิตซิเดอโรฟอรัแล้วขับออกมานอกเซลล์ เกิดเป็นสารประกอบคีเลตระหว่างซิเดอโรฟอรัและเพอริกไอออนทำให้เหล็กอยู่ในรูปที่ละลายน้ำ จุลินทรีย์จึงสามารถนำเหล็กไปใช้ได้ (Teaumroong and Boonkerd, 1996)

กลไกการขนส่งเหล็กจากภายนอกเข้าในเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบแตกต่างไปจากกลไกที่ใช้ในการขนส่งกรดอะมิโน น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารอื่นๆ ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำที่มีการขนส่งผ่านรูในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane pore) แต่กลไกการขนส่งเหล็กซีเดอโรฟอร์จะอาศัยโปรตีนชนิดพิเศษที่มีความสามารถจำเพาะต่อสารประกอบเหล็กซีเดอโรฟอร์ ซึ่งจะอยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) หรือไซโทพลาซึม (cytoplasm) (Leong and Neillands, 1976)

3.1.1 กลไกการนำเหล็กเข้าสู่เซลล์โดยโมเลกุลของซีเดอโรฟอร์แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ (Pinton *et al.*, 2007)

- 1) เริ่มการสังเคราะห์โมเลกุลของซีเดอโรฟอร์และแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปสู่สิ่งแวดล้อม
- 2) โมเลกุลของซีเดอโรฟอร์เข้าจับกับเฟอริกไอออนเกิดเป็นสารประกอบคีเลตเหล็กซีเดอโรฟอร์ แล้วถูกดึงกลับเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการลำเลียงแบบใช้พลังงาน
- 3) ปลดปล่อยโมเลกุลของซีเดอโรฟอร์ออกสู่ภายนอกเซลล์

เมื่อโมเลกุลของซีเดอโรฟอร์เข้าจับกับเฟอริกไอออนแล้ว โมเลกุลของซีเดอโรฟอร์จะจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ จากนั้นจะถูกขนย้ายผ่านผนังเซลล์ โดยกระบวนการลำเลียงแบบใช้พลังงาน โดยซีเดอโรฟอร์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่ผนังเซลล์แตกต่างกันออกไป เมื่อโมเลกุลของสารประกอบเหล็กซีเดอโรฟอร์ถูกเคลื่อนย้ายผ่านผนังเซลล์เข้ามายังไซโทพลาซึม เฟอริกไอออนก็จะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลของซีเดอโรฟอร์โดยบริเวณโมเลกุลที่เป็นลิแกนด์ที่เชื่อมกับเฟอริกไอออนจะถูกสลายด้วยเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ esterase จะเข้าทำปฏิกิริยากับซีเดอโรฟอร์กลุ่ม เอสเตอร์เรส (enterobactin) หรือเฟอริกไอออนอาจจะถูกปลดปล่อยโดยเกิดปฏิกิริยารีดักชัน เมื่อเฟอริกไอออนถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลของซีเดอโรฟอร์แล้ว ส่วนที่เป็นโมเลกุลของซีเดอโรฟอร์ก็อาจถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจากเดิมหรือไม่เปลี่ยนก็ได้ แล้วจึงถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ไปสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อจับกับเฟอริกไอออนต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 5 (Tamas *et al.*, 2006)



ภาพที่ 5 การเคลื่อนย้ายเหล็กเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียในรูปของสารประกอบคีเลตเฟอริกซิเดอโรฟอร์ และเหล็ก

ที่มา: Crosa (2002)

4. แบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์ (Siderophore producing bacteria, SPB)

ซิเดอโรฟอร์เป็นสารที่ถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ในหลากหลายกลุ่ม ตั้งแต่จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคของสัตว์และพืชไปจนถึงจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่อย่างอิสระ และจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช แต่จากการศึกษาจะพบการผลิตซิเดอโรฟอร์มากที่สุดในแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชบริเวณไรโซสเฟียร์ (PGPR) จุลินทรีย์จะผลิตซิเดอโรฟอร์ก็ต่อเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น ในสถานะที่ขาดแคลนธาตุอาหาร หรือมีความเข้มข้นของโลหะหนักบางชนิดมากเกินไปเกินความต้องการ (Winkelmann, 2007) ดังนั้นการผลิต ซิเดอโรฟอร์จึงเป็นกลไกที่จุลินทรีย์ใช้ในการตอบสนองต่อสถานะขาดเหล็ก นอกจากนี้ยังเป็นกลไกที่ช่วยให้แบคทีเรียอยู่ในสถานะ pH ดินที่ไม่เหมาะสมได้ และในสถานะ pH ดินที่แตกต่างกันการผลิตซิเดอโรฟอร์ของแบคทีเรียก็มีความแตกต่างกัน จะพบการผลิตซิเดอโรฟอร์ประเภท Hydroxamate ในดินที่เป็นกรดทั่วไปที่มี pH ดินต่ำ และดินที่มี pH ดินเป็นกลางจะพบการผลิตซิเดอโรฟอร์ประเภท catecholate (Rajkumar *et al.*, 2010)

การแยกแบคทีเรียผลิตซิดโครฟอรจากดินสามารถทำได้โดยใช้อาหารที่มีเหล็กอยู่ในปริมาณที่จำกัด คือเป็นอาหารประเภทที่มีเหล็กอยู่ในปริมาณน้อย หรือเหล็กอยู่ในรูปที่เป็นสารประกอบที่ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันทีที่ได้ chrome azurol sulfonate assay เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตซิดโครฟอรของจุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ถึงแม้ว่าซิดโครฟอรจะมีทั้งประเภทที่เป็น hydroxamates และ catechols ซึ่งมีความแตกต่างกันที่หมู่ฟังก์ชัน แต่ก็สามารถใช้วิธีการนี้ทดสอบได้ทั้ง 2 ประเภท chrome azurol sulfonate assay เป็นวิธีการวัดความสามารถในการผลิตซิดโครฟอรโดยใช้หลักการแย่งชิงเหล็กระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนของ chrome azurol sulfate (CAS) และ hexadecyl trimethylammonium bromide (HDTMA) ซึ่งเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน และซิดโครฟอรที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรีย เนื่องจากเมื่อเหล็กไอออนถูกเคลื่อนย้ายจากอาหารที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนโดยซิดโครฟอรแล้วสีของอาหารจะเปลี่ยนไปเป็นสีส้มซึ่งบ่งชี้ว่าแบคทีเรียนั้นมีความสามารถในการผลิตซิดโครฟอร (Miranda *et al.*, 2007)

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตซิดโครฟอรมีหลากหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน (aerobic) และ กลุ่มที่ไม่ใช้อากาศไม่แท้ (facultative anaerobic) เช่น ซิดโครฟอรในประเภท phenol catecholate ประกอบด้วย enterobactin ผลิตขึ้นโดย *E. coli* และ linear agrobactin ผลิตขึ้นโดย *Agrobacterium tumefaciens* และ ซิดโครฟอรประเภท hydroxamates ประกอบด้วย schizokinen aerobactin และ ferrioxamine ถูกผลิตขึ้นโดย *Bacillus megaterium* *Aerobacter* sp. และ *Arthrobacter* spp. เป็นต้น (Crowley, 2006)

ตารางที่ 1 ประเภทและชนิดของซีเดอโรฟอร์ที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	ประเภทของซีเดอโรฟอร์	ชื่อของซีเดอโรฟอร์
<i>Escherichia coli</i>	Phenol catecholates	Enterobactins
<i>Enterobacteriaceae</i>		Enterobactins
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		Linear catechols
<i>Mycobacteria</i> spp.		Mycobactins
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Pyochelin
<i>Pseudomonas plantarii</i>		Terpolone
<i>Bacillus megaterium</i>	Hydroxamates	Schizokinen
<i>Aerobacter</i> sp.		Aerobactin
<i>Enterobacteriaceae</i>		Arthrobactin
<i>Arthrobacter</i> spp.		Ferrioxamine
<i>Actinomyces</i> spp.		Ferrioxamine
<i>Streptomyces</i> spp.		Ferrioxamine
<i>Nocardia</i> spp.		Ferrioxamine
<i>Arthrobacter</i> spp.		Ferrioxamine
<i>Alcaligenes</i> sp.		Alcaligin
<i>Pseudomonas cepacia</i>		Cepabactin
<i>Rhizobium meliloti</i>	Carboxylate	Rhizobactin
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pyoverdines	Pyoverdine
<i>Pseudomonas</i> sp. St B10		Pseudobactin

ที่มา: Hofte (1993); Crowley (2006)

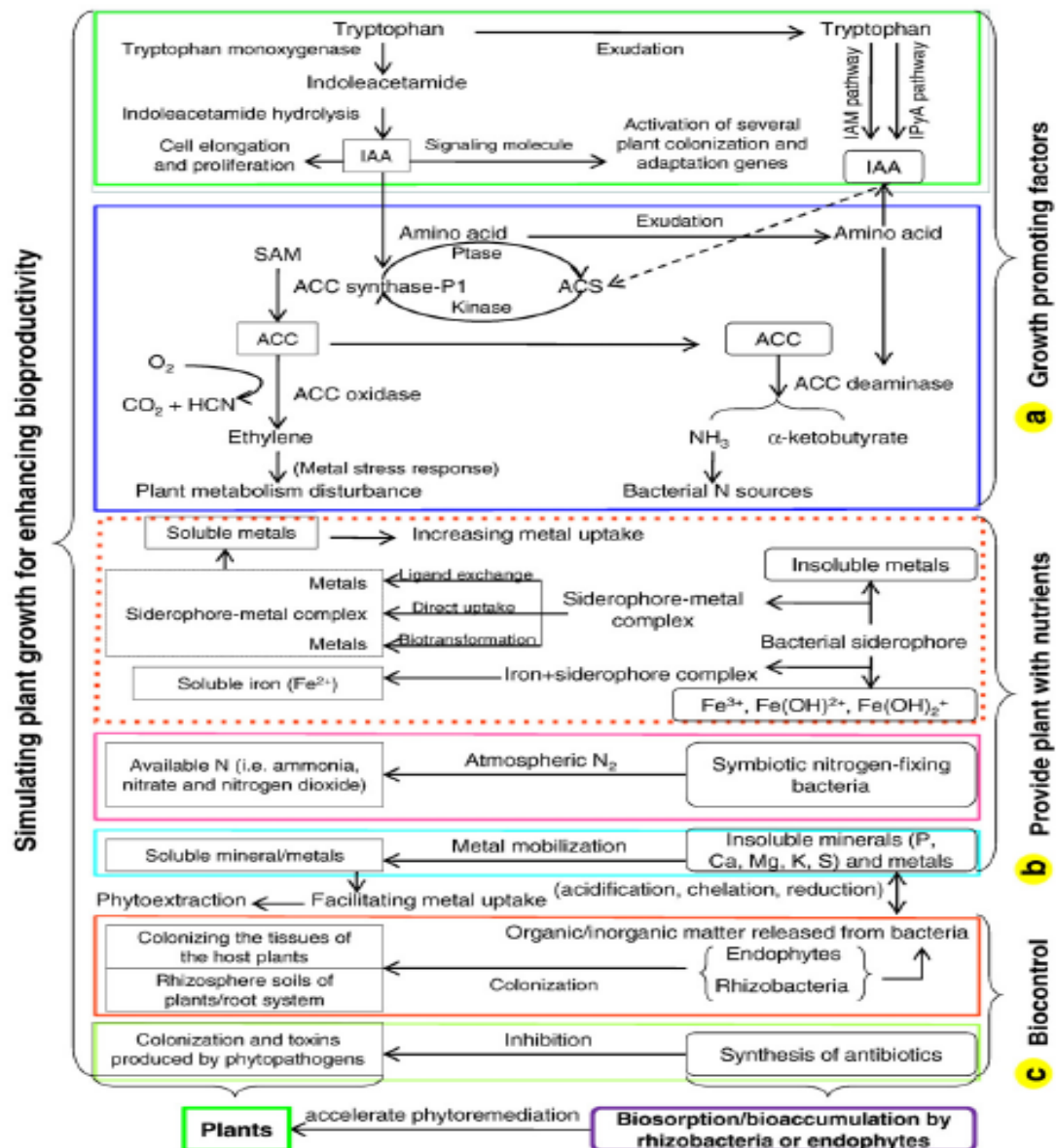
เนื่องจากซีเดอโรฟอร์มีความสามารถในการจับโลหะทรานซิชันโดยเฉพาะเหล็กได้ดี จึงมีการศึกษาและนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตซีเดอโรฟอร์มาใช้ประโยชน์ในหลายด้านทั้งในทางการเกษตรเพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี และใช้ในทางด้านสิ่งแวดล้อมในการบำบัด หรือลดความเป็นพิษของโลหะหนักบางชนิดที่ปนเปื้อนทั้งในน้ำและในดิน เช่น นิกเกิล (Ni) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) อะลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แกลเลียม (Ga) แมงกานีส (Mn) วานาเดียม (V) และโมลิบดีนัม (Mo) เป็นต้น โดยมีตัวอย่างการศึกษาดังต่อไปนี้

Solano *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์ของต้นยาสูบได้แบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 960 ไอโซเลต และมีแบคทีเรียจำนวน 96 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัส เมื่อนำแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสไปทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชพบว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ

Chaiharin *et al.* (2009) ศึกษาการผลิตซิเดอโรฟอรัสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของรากข้าวจำนวน 216 ไอโซเลตพบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัส 23 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสมีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคของข้าวได้ดังนี้ *Alternaria*, *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae* และ *Sclerotium* sp.

5. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยไรโซแบคทีเรีย (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณไรโซสเฟียร์ (rhizosphere) โดยการเพิ่มปริมาณธาตุอาหาร การละลายธาตุอาหารในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์มากขึ้น การช่วยดูดซับธาตุอาหาร หรือสร้างสารประกอบบางชนิดที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ ดังแสดงในภาพที่ 6 (Lucy *et al.*, 2004; Khalid *et al.*, 2004; Gray and Smith, 2005; Cakmakci *et al.*, 2006; Tsavkelova *et al.*, 2007) เรียกแบคทีเรียจำพวกนี้ว่า plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Lugtenberg and Kamilova, 2009) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น *Acinetobacter* *Agrobacterium* *Arthrobacter* *Azospirillum* *Bacillus* *Bradyrhizobium* *Frankia* *Pseudomonas* *Rhizobium* *Serratia* *Thiobacillus* เป็นต้น แบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ แบคทีเรียจำพวกที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช หรือที่เรียกว่า ความสัมพันธ์แบบสมชีพ (symbiosis) เป็นแบคทีเรียจำพวกที่สามารถเข้าสู่รากพืชแล้วเกิดกระบวนการต่าง ๆ ที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ และแบคทีเรียจำพวกที่อาศัยแบบอิสระในดิน (free-living bacteria) จะพบอยู่บริเวณไรโซสเฟียร์ (Siddoqui, 2006)



ภาพที่ 6 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณไรโซสเฟียร์ (a) การผลิตฮอร์โมนพืช (b) การเพิ่มธาตุอาหารพืช หรือการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช (c) การควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Ma *et al.* (2011)

5.1 กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ทางคือ ทางตรง และ ทางอ้อมดังนี้ (Bashan and Bashan, 2005; Somers *et al.*, 2004)

5.1.1 กลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางตรง

1) การเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจนให้แก่พืช โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing organism) เป็นการเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนียที่พืชสามารถนำไปใช้ได้เพื่อการเจริญเติบโตได้ เช่น การตรึงไนโตรเจนของ *Rhizobium* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบสมชีพ (symbiosis) ในปมรากของพืชตระกูลถั่ว สามารถตรึงไนโตรเจนให้แก่ต้นถั่ว (Lakha and Grick, 2007)

2) การเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชโดยการสร้างสารประกอบอินทรีย์แล้วปลดปล่อยออกมาเพื่อช่วยทำให้การละลายของธาตุต่าง ๆ ดีขึ้น เช่น การผลิตซิเดอโรฟอรัสเพื่อเกิดเป็นสารประกอบคีเลตกับเหล็กทำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำพืชจึงใช้ประโยชน์จากเหล็กได้

3) การผลิตฮอร์โมนพืช (phytohormones) ซึ่งการผลิตฮอร์โมนพืชเป็นกลไกสำคัญในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น เพิ่มการพัฒนาของราก เพิ่มความยาวของราก การแบ่งเซลล์ การยืดยาวของเซลล์ เพิ่มความสูงของลำต้น และการดูดใช้น้ำและธาตุอาหารของพืช

5.1.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อม

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อม คือ การควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชโดยตรง หรือจุลินทรีย์ที่มีส่วนยับยั้งการเจริญเติบโต และทำให้รากพืชผิดปกติ โดยจุลินทรีย์ ซึ่งมีกลไกในการควบคุมโดยการลดปริมาณ ยับยั้ง หรือกำจัดการควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อพืช (Pinton *et al.*, 2007) การใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชถือเป็นการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชมีมากมายหลายหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2 กลไกในการควบคุมทางชีวภาพเกิดขึ้นได้หลายแบบดังต่อไปนี้

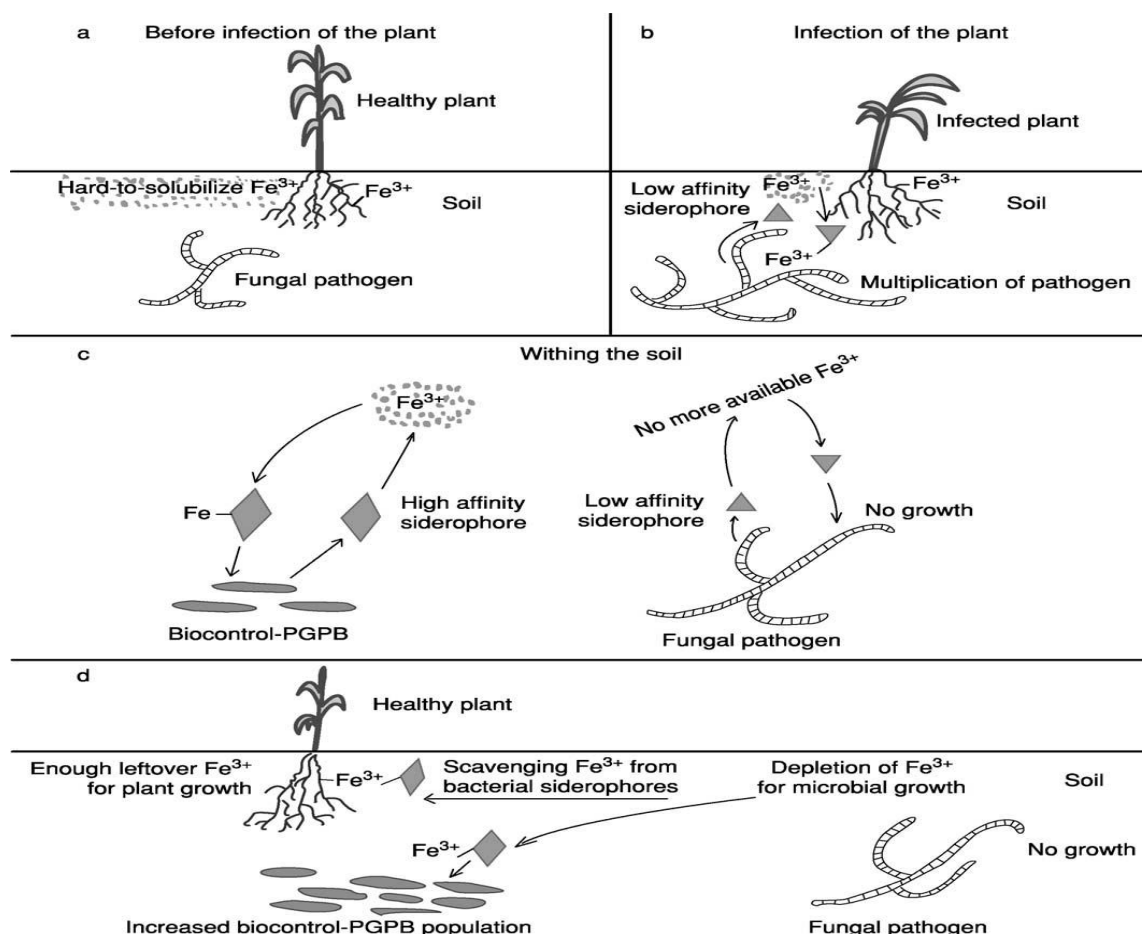
ตารางที่ 2 ตัวอย่างของไรโซแบคทีเรียที่มีความสามารถในการควบคุมราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

ไรโซแบคทีเรีย	ราสาเหตุโรคพืช	ชนิดพืช
<i>Actinoplanes</i> spp.	<i>Pythium ultimum</i>	เรดปิท
	<i>Rhizoctonia solani</i>	
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	ข้าวสาลี
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>ciceris</i>	ถั่วเขียว
<i>Bacillus subtilis</i> BACT-D	<i>Pythium aphanidermatum</i>	มะเขือเทศ
<i>Burkholderia cepacia</i> A3R	<i>Fusarium graminearum</i>	ข้าวสาลี
	<i>Fusarium</i> spp.	ข้าวสาลี
<i>Burkholderia cepacia</i> PHQM 100	<i>Pythium</i> spp.	ข้าวโพด
<i>Comamonas acidovorans</i> HF42	<i>Magnaporthe poae</i>	Kentucky bluegrass
<i>Enterobacter</i> sp. BF14	<i>Magnaporthe poae</i>	Kentucky bluegrass
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	<i>Dreschlera graminea</i>	ข้าวบาเลย์
	<i>D. avenae</i>	ข้าวไร้ต
<i>P. chlororaphis</i> PCL 1391	<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>radicis-lycopersici</i>	มะเขือเทศ
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>raphani</i>	หัวผักกาด
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	ข้าวสาลี
<i>Pseudomonas fluorescens</i> VO61	<i>Pythium ultimum</i>	ข้าว
	<i>Rhizoctonia solani</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>raphani</i>	หัวผักกาด
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> C3	<i>Rhizoctonia solani</i>	Tall fescue

ที่มา: Glick et al. (1995)

1) การแข่งขันแย่งแย่งใช้ธาตุอาหาร และการเข้าสู่พืชของจุลินทรีย์ผลิตซิเดอโรฟอรักับจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัจะมีความสามารถในการดูดีใช้เหล็กมากกว่าจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เนื่องจากการผลิตซิเดอโรฟอรัแล้วปลดปล่อยออกนอกเซลล์เกิดเป็นสารประกอบคีเลตเหล็กซิเดอโรฟอรัทำให้สามารถเคลื่อนย้ายเหล็กจากดินไปใช้ประโยชน์ภายในเซลล์แบคทีเรียได้ ซึ่งจะขัดขวางการใช้

เหล็กของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (Compant *et al.*, 2005) เพราะแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชไม่สามารถผลิตซีเดอโรฟอร์ทำให้มีความสามารถในการดูดใช้เหล็กได้ต่ำกว่า จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชก็จะขาดเหล็กที่จะนำมาใช้ในการเจริญเติบโต จึงทำให้จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 กลไกการควบคุมแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตซีเดอโรฟอร์

ที่มา: Bashan and Bashan (2005)

2) การผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ในการควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เช่น *Pseudomonas* สามารถผลิต phloroglucinols phenazines pyoluerorin pyrrolnitrin และ lipopeptides ออกมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เป็นต้น

3) การผลิตเอนไซม์ ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของราสาเหตุโรคพืช เช่น การผลิต chitinase และ β -1-3-glucanase หรือการผลิตสารยับยั้งรา จากการศึกษพบว่า *Pseudomonas fluorescence* สามารถสังเคราะห์แก๊สไฮยาไนต์ในการยับยั้ง *Thelabiosis basicola* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรครากเน่าดำในยาสูบได้ (Ramette *et al.*, 2003)

6. แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria, PSB)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช (Ehrlich, 1990) ฟอสฟอรัสจะพบอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ และโครโมโซม เป็นส่วนประกอบของ DNA และ RNA ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการหายใจ สังเคราะห์แสง สังเคราะห์แป้ง โปรตีนและไขมัน ส่งผลให้ฟอสฟอรัสมีผลต่อกระบวนการงอกของราก การออกดอก การสร้างหัวและการสุกของผล ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากรองจากไนโตรเจน แต่จากการศึกษาพบว่าในดินมีฟอสฟอรัสอยู่ในระดับที่ต่ำปริมาณ 400-1200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของดิน ในดินส่วนมากจะมีฟอสฟอรัสในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ ฟอสฟอรัสที่ละลายยาก หรือไม่ละลาย และเป็นฟอสฟอรัสที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยส่วนใหญ่สารละลายฟอสฟอรัสในดินจะมีความเข้มข้นต่ำมากโดยประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือน้อยกว่า (Goldstein, 1994) พืชสามารถใช้ประโยชน์จากฟอสฟอรัสได้ในรูปแอนไอออนของกรดออร์โทฟอสฟอริก (H_3PO_4) โดยเฉพาะในรูปของ HPO_4^{2-} หรือ H_2PO_4^- (Beever and Burns, 1980) แหล่งของฟอสฟอรัสในดินส่วนใหญ่จะได้มาจากหินที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ เช่น แร่อะพาไทต์ปฐมภูมิ (primary apatite) และแร่ปฐมภูมิอื่นๆ และการสลายตัวของสารอินทรีย์วัตถุในดินที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ จากการศึกษพบว่าปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ใส่ลงในดินให้กับพืชนั้น พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เพียง 5% ของปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ถูกใส่ลงไปเท่านั้น ส่วนที่เหลือจะถูกตรึงให้อยู่ในรูปฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ และทำให้เกิดการสะสมของฟอสฟอรัสโดยเฉพาะดินเกษตรกรรมที่มีการใส่ปุ๋ยอย่างต่อเนื่อง การตรึงฟอสฟอรัสในดินขึ้นอยู่กับ pH และชนิดของดิน ในดินที่มี pH เป็นกรดฟอสฟอรัสจะถูกตรึงด้วยออกไซด์และไฮดรอกไซด์ของเหล็กและอะลูมิเนียม ในขณะที่ปฏิกิริยาดินเป็นด่างฟอสฟอรัสจะถูกตรึงด้วยแคลเซียมทำให้ประสิทธิภาพการละลายของฟอสฟอรัสต่ำ (Goldstein, 1986; Goldstein, 1994; Jones *et al.*, 1991) พืชจะใช้ประโยชน์ฟอสฟอรัสได้ก็ต่อเมื่อฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยออกมาจากรูปดังกล่าว ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์ดินหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย และราที่สามารถเปลี่ยนรูปอนินทรีย์ฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้

จุลินทรีย์นั้นว่ามีบทบาทสำคัญต่อวัฏจักรฟอสฟอรัสในธรรมชาติเป็นอย่างมาก เนื่องจากการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) และรีดักชัน (reduction) ของสารประกอบฟอสฟอรัส เกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจากแก๊สฟอสฟีน (phosphine) ซึ่งมีประจุ -3 ไปเป็นฟอสเฟต (phosphate) ที่มีประจุเป็น +5 (Rodriguez and Fraga, 1999) ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากการศึกษาพบความสามารถในการละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ เช่น ความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) ไดแคลเซียมฟอสเฟต (dicalcium phosphate) ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) และหินฟอสเฟต (rock phosphate) (Goldstein, 1986) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต เช่น *Pseudomonas* *Bacillus* *Rhizobium* *Burkholderia* *Achromobacter* *Agrobacterium* *Micrococcus* *Aerobacter* *Flavobacterium* และ *Erwinia* ซึ่งแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเหล่านี้สามารถพบได้ในดินและในบริเวณไรโซส

เพียร์ (Sperberg, 1985; Katznelson *et al.*, 1962; Raghu and MacRae, 1966; Alexander, 1977) ทั้งแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน และพบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดินบริเวณไรโซสเฟียร์มากกว่าในดินที่ห่างไกลออกไป (Katznelson *et al.*, 1962; Raghu and MacRae, 1966) การละลายฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์มีกลไกที่แตกต่างกันออกไป (Salehrastin, 1999) เช่น กระบวนการทำให้เกิดกรด กระบวนการเกิดคีเลต และกระบวนการแลกเปลี่ยน การสังเคราะห์เอนไซม์ฟอสฟาเตส (Dadarwal, 1997; Yadav and Dadarwal, 1997) แต่ส่วนใหญ่ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียจะเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำออกมา ผลจากการผลิตกรดอินทรีย์ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียและสิ่งแวดล้อมรอบมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ดังในการศึกษาของ Chen *et al.* (2006) ที่พบความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกันระหว่าง pH ของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย และปริมาณการละลายฟอสเฟต บ่งชี้ว่ากรดอินทรีย์ที่ถูกผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีผลทำให้อาหารเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการละลายของฟอสเฟต

กรด gluconic acid เป็นกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่วนใหญ่ผลิตขึ้น เช่น พบการผลิตใน *Pseudomonas* sp. (Illmer and Schinner, 1992) *Erwinia herbicola* (Liu *et al.*, 1992) *Pseudomonas cepacia* (Goldstein *et al.* 1993) และ *Burkholderia cepacia* ส่วนกรดอื่นๆ ที่พบว่ามีการผลิตขึ้นในแบคทีเรียละลายฟอสเฟต คือ 2-ketogluconic acid พบใน *Rhizobium leguminosarum* (Halder *et al.*, 1990) *Rhizobium meliloti* (Halder and Chakrabartty, 1993) *Bacillus firmus* (Banik and Dey, 1982) และพบการผลิต lactic isovaleric isobutyric และ acetic acids ที่พบใน *Bacillus liqueniformis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* นอกจากแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจะช่วยให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชมากขึ้นแล้ว แบคทีเรียละลายฟอสเฟตยังสามารถผลิตสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย เช่น ฮอโมนพืช (phytohormone) สารปฏิชีวนะ และซีเดอรอฟอร์ (Kloepper *et al.*, 1988; Gaur and Ostwal, 1972; Subba Rao, 1982; Gerretsen, 1948; Kucey *et al.*, 1989)

7. แบคทีเรียผลิตฮอโมนพืช (Phytohormones producing bacteria)

ในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฮอโมนพืชที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเพิ่มมากขึ้น และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเกษตรอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาจะพบว่าแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตฮอโมนพืช ทั้งที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินหรือพวกที่มีอันตรกิริยากับพืช (ตารางที่ 3) ตัวอย่างฮอโมนพืชที่แบคทีเรียผลิตขึ้น เช่น ออกซิน (auxin) จิบเบอเรลลิน (Gibberillin) ไซโตไคนิน (cytokinin) เอทิลีน (ethylene) และกรดแอบไซซิก (abscisic acid) เป็นต้น การผลิตฮอโมนพืชของจุลินทรีย์มีส่วนในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ เช่น การเจริญของต้นพืช การติดดอกออกผล และการหลุดร่วงของใบดอกผลของพืช เป็นต้น กลุ่มของฮอโมนพืชที่ได้รับความสนใจในการศึกษามากและนำมาใช้ทางการเกษตรมากที่สุด คือ ฮอโมนพืชออกซิน และจิบเบอเรลลิน

ตารางที่ 3 การผลิตฮอร์โมนพืชของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ฮอร์โมนพืช	แบคทีเรีย	ชนิดพืช
ออกซิน (Auxin)	<i>Aeromonas veronii</i>	ข้าว
	<i>Agrobacterium</i> sp.	กะหล่ำ
	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	กะหล่ำ
	<i>Azospirillum brasilense</i>	ข้าวสาลี
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Radish
	<i>Comaninas acidovorans</i>	กะหล่ำ
	<i>Enterobacter cloacae</i>	ข้าว
	<i>Enterobacter</i> sp.	อ้อย
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Radish
ไซโทไคนิน (Cytokinin)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	ข้าวสาลี
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ถั่วเหลือง
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	กะหล่ำ
	<i>Gibberellin</i>	กะหล่ำ
	<i>Bacillus</i> sp.	Alder
	<i>Alcaligenes</i> sp.	มันฝรั่ง
ACC deaminase	<i>Bacillus pumilus</i>	มันฝรั่ง
	<i>Enterobacter cloacae</i>	มันฝรั่ง
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	ถั่วเหลือง
	<i>Pseudomonas putida</i>	ถั่วเขียว
	<i>Pseudomonas</i> sp.	มันฝรั่ง
	<i>Variovorax paradoxus</i>	มันฝรั่ง

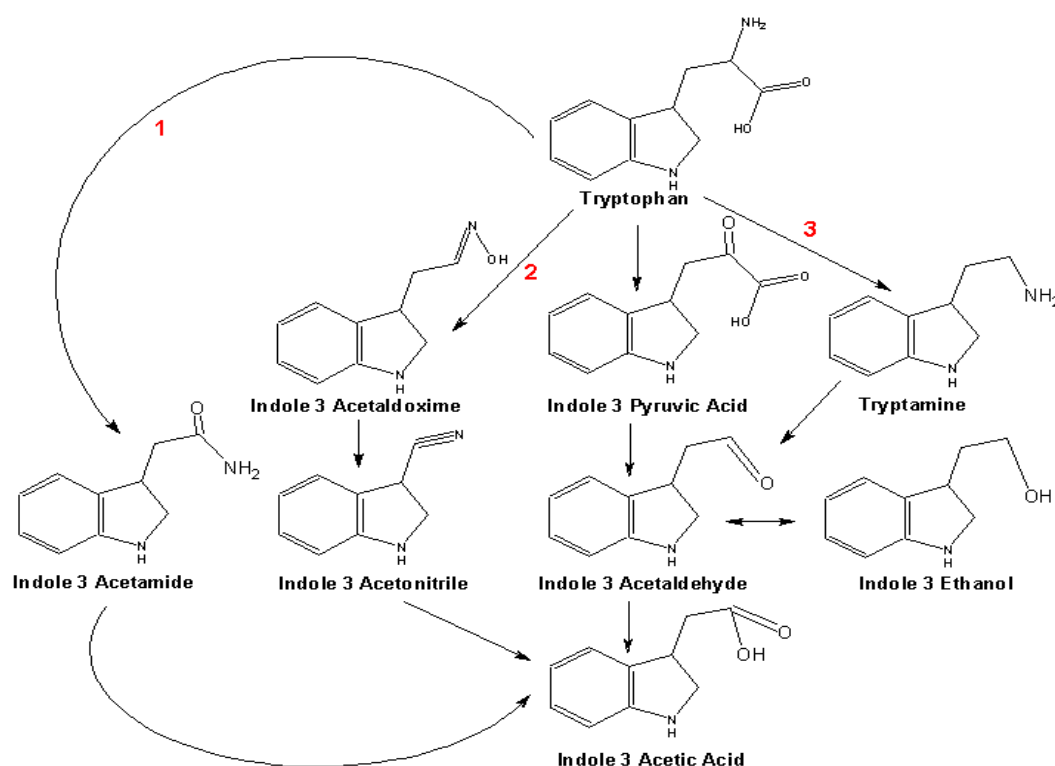
ที่มา: Glick *et al.* (1995)

7.1 แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน (Auxin producing bacteria)

ออกซินเป็นฮอร์โมนพืชที่อยู่ในรูปสารเคมีที่เรียกว่า กรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid) เป็นส่วนใหญ่ ฮอร์โมนพืชออกซินจะสร้างขึ้นบริเวณที่ปลายยอด ใบอ่อน และเมล็ด (Ribnicky *et al.*, 2002) มีสมบัติเป็นฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโตของพืชประเภทกระตุ้นการเจริญเติบโตทำให้พืชเกิดการแบ่งตัว กระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ และยืดตัวของเซลล์ในส่วนลำต้นของพืช (Tanimoto, 2005) สาร

ออกซินอาจจะพบในรูปสารประกอบเชิงเดี่ยว (free compound) และในรูปที่รวมกับสารอื่นๆ เช่น IAA-insital IAA-glucose และ IAA-aspartate แต่สาร IAA ในรูปที่รวมกับสารอื่นๆ อาจจะไม่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Hedden and Thomas, 2006)

ฮอร์โมนพืชออกซินสามารถสังเคราะห์โดยใช้กรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น (Hendrickson *et al.*, 2004) โดยกรดอะมิโนทริปโตเฟนเปลี่ยนไปเป็นออกซินโดยผ่านสารตัวกลางต่างๆ ด้วย 3 กระบวนการ (Woodward and Bartel, 2005) คือ กรดอะมิโนทริปโตเฟนเปลี่ยนเป็นอินโดลไพรวูเวต (ภาพที่ 8) โดยกระบวนการดีอะมิเนชัน หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน ดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากอินโดลไพรวูเวตทำให้เกิดสารตัวกลางใหม่ คือ อินโดลอะเซทาลดีไฮด์ จากนั้นหมู่อัลดีไฮด์ของอินโดลอะเซทาลดีไฮด์จะถูกออกซิไดส์ให้กลายเป็นออกซิน (Bartel, 1997) การสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชออกซินจากทริปโตเฟนโดยผ่านสารตัวกลางทริปทามีนด้วยกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน จากนั้นทริปทามีนจะเปลี่ยนเป็นออกซินโดยกระบวนการการออกซิเดทีฟดีอะมิเนชัน (oxidative deamination) และการสังเคราะห์ออกซินโดยผ่านสารตัวกลางอินโดลอะซิโตไนทริล ทริปโตเฟนเปลี่ยนไปเป็นไทโอกลูโคไซด์ และกลูโคไบรอสซิซิน สารดังกล่าวจะเปลี่ยนไปเป็นอินโดลอะซิโตไนทริล และในที่สุดจะเปลี่ยนไปเป็นออกซิน โดยอาศัยกิจกรรมของโคเอนไซม์ไนทรูเลส (Frankenberger and Arshad, 1995)



ภาพที่ 8 การสังเคราะห์ออกซินโดยใช้กรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น 3 วิธี

ที่มา: Zhao *et al.* (2001)

7.1.2 ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของพืชมีดังนี้ (Hedden and Thomas, 2006)

1) กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ฮอร์โมนพืชออกซินช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์แคมเบียมทำให้พืชมีเนื้อไม้มากขึ้น และเกิดการเจริญเติบโตด้านข้างเพิ่มขึ้น

2) เร่งการขยายตัวของเซลล์ ฮอร์โมนพืชออกซินช่วยให้เซลล์ในส่วนต่างๆ ของพืชยืดยาวโดยการกระตุ้นให้ เซลล์สร้างผนังเซลล์มากขึ้น

3) ควบคุมการแตกของราก ฮอร์โมนพืชออกซินสามารถกระตุ้นการเกิดของรากของกิ่งตอนหรือกิ่งปักชำของพืชได้หลายชนิด โดยฮอร์โมนพืชออกซินสามารถกระตุ้นให้เกิดรากพิเศษ (adventitious root) และกระตุ้นการเกิดเนื้อเยื่อเจริญของราก

4) ยับยั้งการเจริญของตาข้างและกิ่ง แหล่งที่สำคัญของฮอร์โมนพืชออกซิน คือ บริเวณยอดอ่อน ที่จะผลิตฮอร์โมนพืชออกซินแล้วส่งไปยังส่วนต่างๆ ของพืช การเคลื่อนที่ของฮอร์โมนพืชออกซินลงมาด้านล่าง (basipetal movement) จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของตาข้าง (lateral buds) โดยตาข้างไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ตรงบริเวณที่ได้รับฮอร์โมนพืชออกซินจากยอด แต่ถ้าตัดยอดทิ้งไปตาข้างซึ่งอยู่ถัดไปจะเจริญเติบโตขึ้นมาแทนที่ (Macadam, 2009)

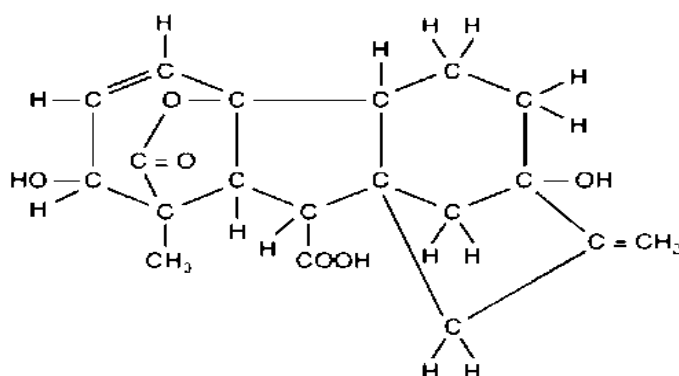
5) ควบคุมการร่วงของใบ ดอก และผล เมื่อวัยระดังก้าวแก่ตัวลง เพราะการสร้างฮอร์โมนพืชออกซินในส่วนดังกล่าวจะน้อยลงซึ่งจะน้อยกว่าส่วนอ่อนและลำต้น

6) การเพิ่มการติดผล มีการทดลองใช้สารฮอร์โมนพืชออกซินกับพืชบางชนิด ปรากฏว่าสารในกลุ่มฮอร์โมนพืชออกซินสามารถที่จะเพิ่มการติดผลของพืชได้

ฮอร์โมนพืชออกซินสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์ การสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์นั้นจะพบมากในจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณไรโซเฟียร์ของพืช เช่น *Pseudomonas* spp. *Bacillus* sp. และ *Rhizobium* spp. (Patten and Glick, 2001) จากการศึกษาพบว่า *Azotobacter* และ Fluorescent *Pseudomonads* ผลิตฮอร์โมนพืชออกซินเพิ่มขึ้นเมื่อเติมทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย โดยจะผลิตฮอร์โมนพืชออกซินสูงสุด 7.3-32.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการเติมทริปโตเฟนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ahmad et al., 2005) การศึกษาการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินของแบคทีเรียโดย Sequeira and Williams (1964) พบว่า มีฮอร์โมนพืชออกซินระดับสูงในต้นของโบบาสุบที่มีการเข้าอยู่อาศัยของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช *Pseudomonas solanacearum* มากกว่าในต้นโบบาสุบปกติ นอกจากนี้ Joseph et al. (2007) แยกแบคทีเรียบริเวณไรโซเฟียร์ของต้นถั่วลูกไก่ พบ *Bacillus* *Pseudomonas* และ *Azotobacter* มีความสามารถในการผลิตออกซิน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำแบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืชออกซินไปใช้ในทางการเกษตรพบว่าการใช้ *Pseudomonas putida* หรือ *Trichoderma* ที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินร่วมกับการปลูกมะเขือเทศทำให้น้ำหนักสดและความยาวรากของมะเขือเทศเพิ่มขึ้น (Gravel et al., 2007)

7.2 แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน (Gibberellin producing bacteria)

จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) เป็นฮอร์โมนพืช ที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดหนึ่ง เป็นสารประกอบอินทรีย์กลุ่มเตตราไซคลิก ไดเทอร์พีนอยด์ (tetracyclic diterpenoid) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยไอโซพรีน 4 โมเลกุล มาเรียงกันเป็นโครงสร้าง 3 วง โครงสร้างนี้เรียกว่า ent-gibberellane หรือ tetra-carboxylic gibbane ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของจิบเบอเรลลิน (Leopold, 1975; Crozier *et al.*, 2000) จิบเบอเรลลินถูกค้นพบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น จากการเกิดโรคระบาดของข้าวที่เป็นโรคยอดฝักดาบ (Yabuta and Sumiki, 1938) ซึ่งต้นข้าวมีลักษณะสูงผอมผิดปกติ เนื่องจากรา *Gibberella fujikuroi* เมื่อสกัดสารที่รานี้สร้างขึ้นและนำไปทดสอบกับพืชชนิดอื่น พบว่าทำให้พืชนั้นๆ มีอาการอย่างเดียวกันคือ ต้นผอม สูง จึงตั้งชื่อสารที่พบนี้ว่า จิบเบอเรลลิน ต่อมาพบกรดจิบเบอเรลลิก และอนุพันธ์ของกรดจิบเบอเรลลิก จากราอื่นๆ อีกมากกว่า 136 ชนิด (Tudzynski, 2005) และยังพบการผลิตในพืช (Macmillan, 2001) และแบคทีเรียอีกด้วย (Bottini, *et al.*, 2004) โดยทุกชนิดเรียกชื่อเหมือนกัน คือ จิบเบอเรลลินเอ หรือ GA แต่มีหมายเลขท้ายตามลำดับการค้นพบคือ $GA_1, GA_2, GA_3, \dots, GA_{79}$ จิบเบอเรลลินแต่ละชนิดต่างกันเล็กน้อยที่ตำแหน่งพันธะคู่ และหมู่ไฮดรอกซิล ส่วนคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชนั้นจะแตกต่างกัน แต่ชนิดที่เป็นประโยชน์ในทางการเกษตรมาก คือ GA_3 ซึ่งมีชื่อสามัญว่า กรดจิบเบอเรลลิก มีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{22}O_6$ (ภาพที่ 9) (จารุวรรณ, 2535)



ภาพที่ 9 โครงสร้างโมเลกุลของจิบเบอเรลลิน

ที่มา: Ingels (2009)

การศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินในแบคทีเรียรายงานครั้งแรกโดย Atzorn *et al.* (1988) ซึ่งพบการผลิตจิบเบอเรลลินประเภท GA_1 , GA_4 , GA_9 และ GA_{20} ใน *Rhizobium meliloti* ต่อมา มีรายงานการค้นพบการผลิตจิบเบอเรลลินอย่างต่อเนื่อง เช่น พบการผลิต GA_1 , GA_3 , GA_9 , GA_{19} และ GA_{20} จาก *Azospirillum lipoferum* (Bottini *et al.*, 1989) และ GA_1 กับ GA_3 จาก *Azospirillum brasilense* (Janzen *et al.*, 1992). นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตกรดจิบเบอเรลลินใน *Bradyrhizobium japonicum* (Boiero *et al.*, 2007) *Rhizobium phaseoli* (Atzorn *et al.*, 1998) และ *Bacillus* spp. (Manero *et al.*, 1996)

7.2.1 ผลของจิบเบอเรลลินต่อการเจริญเติบโตของพืชมีดังนี้ (Stowe and Yamaki, 1957)

1) กระตุ้นการขยายตัวของเซลล์ โดยการเพิ่มความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์มีรูปร่างยืดยาวขึ้น กระตุ้นการยืดตัวของข้อและการแผ่ขยายของใบ กระตุ้นการงอกของเมล็ด การเจริญของรากแรกเกิด (radicle root)

2) จิบเบอเรลลินมีผลต่อพัฒนาการของดอกโดยเฉพาะพัฒนาการของก้านชูเกสรตัวผู้และกลีบดอก กระตุ้นการติดผลในพืชหลายชนิด เช่น ส้ม มะเขือเทศ องุ่น การได้รับจิบเบอเรลลินช่วยให้เกิดการติดผลโดยไม่ต้องผสมเกสรได้ กระตุ้นการเปลี่ยนเพศดอก เช่น ทำให้พืชตระกูลแตงหรือพืชที่แยกดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย เกิดดอกตัวผู้มากขึ้นได้

3) การกระตุ้นการงอกของพืช จิบเบอเรลลินช่วยทำลายระยะพักตัวของพืชทั้งการพักตัวของตาและเมล็ด โดยการยับยั้งการออกฤทธิ์ของกรดแอบไซซิกที่ทำให้เกิดระยะพักตัว และการควบคุมให้พืชอยู่ในสภาวะอ่อนวัย

ในการศึกษา *Azotobacter chroococcum* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับข้าวโพดแบบสมชีพพบว่า *A. chroococcum* สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Bottini et al. (1989) พบว่าการใช้ *Azospirillum* spp. ร่วมกับการปลูกหญ้าสามารถเพิ่มผลิตผลของหญ้าเพราะการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินจากแบคทีเรีย และในการศึกษาของ Karadeniz et al. (2006) พบว่า *Proteus mirabilis* *P. vulgaris* *Klebsiella pneumoniae* *Bacillus megaterium* *B. cereus* *Escherichia coli* มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน และกรดแอบไซซิก

วิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชของเกษตรกรจังหวัดลพบุรี โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์จากพืชทั้งหมด 4 ชนิด คือ อ้อย ข้าวโพด พริก และ ผักสลัดน้ำ ทำการเก็บตัวอย่าง 3 จุด ต่อหนึ่งแปลงพืช เก็บตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์โดยขุดต้นพืช รวมถึงดินบริเวณรอบของต้นพืช (rhizosphere soils) นำมาใส่ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ รัดปากถุงให้แน่น เขียนข้อมูลรายละเอียด ได้แก่ พันธุ์พืช อายุ วันเดือนปีที่เก็บ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษา จากนั้นเก็บตัวอย่างดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอกการแยกแบคทีเรียต่อไป

2. การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์

แยกแบคทีเรียจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ด้วยวิธี soil dilution and plate โดยนำตัวอย่างพืชมาเคาะให้ดินที่มีขนาดใหญ่ที่ติดอยู่กับรากออกแล้วนำมาเขย่าเพื่อให้ดินบริเวณไรโซสเฟียร์หลุดออกมาจากรากพืช จากนั้นนำตัวอย่างดิน 10 กรัม เติมสารละลาย 0.85% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำสารละลายดินที่ได้ไปเขย่าอย่างแรงที่เร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารแขวนลอยดินตกตะกอนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายใสส่วนบนมาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ $10^0 - 10^{-7}$ นำสารละลายในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate บนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง NA และนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

3. การคัดเลือกและแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง NA ที่ได้จากการแยกในขั้นแรกมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ streak บนอาหาร NA จนกระทั่งได้เป็นโคโลนีเดี่ยว แล้วนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว NB บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียเจริญอยู่ในช่วง log phase จากนั้นนำมาทำให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้ไว้ใน กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นหัวเชื้อแบคทีเรีย และเก็บรักษาแบคทีเรียที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการผลิตซิงโครฟอรัของแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตซิงโครฟอรัของแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียหัวเชื้อมา streak บนอาหารแข็ง nutrient broth (NA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อแตะโคโลนีของแบคทีเรียมา 1 โคโลนี แล้ว streak บนอาหารแข็ง chrome azurol sulphonate (CAS) ที่เตรียมโดยวิธีการของ Alexander และ Zuberer (1991) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตวงสีส้มที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรีย

การวัดปริมาณการผลิตซิงโครฟอรั โดยนำแบคทีเรียผลิตซิงโครฟอรั ที่ได้จากการทดสอบข้างต้น มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง CAS บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียมา 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลว CAS (ไม่มีส่วนประกอบของ Indicator solution 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่

ความเร็ว 8,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใส่ทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85%NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ให้มีค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 โดยใช้ 0.85%NaCl ในการเจือจาง แล้วนำเซลล์เริ่มต้น 0.25 มิลลิลิตร มาถ่ายใส่อาหารเหลว CAS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบปริมาณการผลิตซิเดอโรฟอร์ด้วยการเติม Indicator solution 1 ในอัตราส่วน 1:1 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้น และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร คำนวณ %decolorization ตามวิธีของ Payne (1994) โดยมีสูตรในการคำนวณดังนี้

$$\%siderophore\ units = \frac{Ar - As}{Ar} \times 100$$

Ar = ค่าการดูดกลืนแสงของตำหรับควบคุมที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

As = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

5. การระบุชนิดแบคทีเรียโดยการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนขงยีน 16S rRNA

5.1 การระบุชนิดแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนขงยีน 16S rRNA ตามวิธีการที่

1

5.1.1 การเตรียมแบคทีเรีย และการทำปฏิกิริยา PCR

นำแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์มา streak บนอาหารแข็ง NA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์ 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง นำมาเติม 3% NaCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม 0.05 NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้ไมโครไปเป็ดูดขึ้นลงเพื่อให้แบคทีเรียกระจายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดสารละลายใส่ 25 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR

การในการเตรียมสารในปฏิกิริยา PCR เริ่มจากนำสารละลายปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP) ปริมาตร 0.04 ไมโครลิตร 10X buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร universal primer forward และ reverse (16S 928f-341r) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase (Fermentas, Canada) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และเติมน้ำจนได้ปริมาตร นำไป ปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (PTC 100, MJ. Research) ซึ่งมีการตั้งค่าเครื่อง PCR

5.1.2 การตรวจสอบคุณภาพผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยการนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis การเตรียม 0.8% agarose gel โดยนำ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% เทใน gel tray และเสียบ comb ทิ้งไว้จนเจล แข็งตัวดีแล้วจึงดึง ออกจากนั้นนำ agarose gel ไปวางในเครื่อง electrophoresis ที่มี 1X TAE buffer (Tris-acetate) (Liu *et al.*, 1997) ผสม 1X loading dye และผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ในอัตราส่วน 3:5 ไมโครลิตร แล้วนำไป หยดในช่องของ agarose gel ในแต่ละช่อง และหยด maker 2 ไมโครลิตร ลงในช่องแรกและช่องสุดท้าย เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ปลั๊กกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลไปแช่ใน ethidium bromide (0.5 mg/ml) เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยแช่น้ำ เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจสอบเจล ภายใต้แสง ultraviolet

5.1.3 การวิเคราะห์ลำดับเบส

วิเคราะห์ลำดับเบส โดยนำผลผลิต PCR ปริมาณ 40 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ลำดับ เบส (Macrogen, Korea) แล้วนำข้อมูลลำดับเบสของแบคทีเรียที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์ อื่นๆ ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)

5.2 การระบุชนิดแบคทีเรียโดยการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนขงยีน 16S rRNA ตาม วิธีการที่ 2

5.2.1 การเตรียมแบคทีเรีย และการ PCR

นำแบคทีเรียผลิตชีเคอโรฟอว์จาก stock culture มา streak บนอาหารแข็ง NA แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดเชื้อที่ปลอดเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยวของ แบคทีเรียผลิตชีเคอโรฟอว์ 1 โคโลนี เติมนลงในสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยมีส่วนประกอบดังนี้ สารละลายแบคทีเรีย 1 ไมโครลิตร dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 10X buffer+ $MgCl_2$ 2.5 ไมโครลิตร forward universal primer และ reverse

universal primer (16S 8f-1492r) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle

5.2.2 การตรวจสอบคุณภาพผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis การเตรียม 0.8% agarose gel โดยนำ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% เติม ethidium bromide 0.6 ไมโครลิตร เทใน gel tray และ เสียบ comb ที่งัดจนเกลี้ยงตัวดีแล้วจึงดึงออก จากนั้นนำ agarose gel ไปวางในเครื่อง electrophoresis ที่มี 1X TAE buffer (Tris-acetate) (Liu *et al.*, 1997) ผสม 1X loading dye และผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ในอัตราส่วน 1:5 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยอดในช่องของ agarose gel ในแต่ละช่อง และหยอด maker 2 ไมโครลิตร ลงในช่องแรก และช่องสุดท้ายเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ปลั๊กกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็น เวลา 30 นาที แล้วตรวจสอบผลภายใต้แสง ultraviolet จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick PCR purification kit (QIAGEN, USA)

5.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบส

วิเคราะห์ลำดับเบส โดยนำผลผลิต PCR ปริมาณ 12 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 40 นาโน กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ลำดับเบส (BioMedical Genomics Center, USA) แล้วนำข้อมูลลำดับเบส ของแบคทีเรียที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์อื่นๆ ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)

6. การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์

การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยนำแบคทีเรียที่สามารถผลิตซิเดอโรฟอร์จาก stock culture มา streak บนอาหารแข็ง NA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดเขียวเชื้อที่ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดียวของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์ 1 โคโลนี streak บนอาหาร แข็ง National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRI-P) (Nautiyal, 1999) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนของอาหารรอบโคโลนี (วงใสรอบโคโลนี) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการละลายแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์

จากนั้นนำแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่ได้จากการทดสอบ ข้างต้นมาวัดปริมาณการละลายฟอสเฟตด้วยวิธี Vanadomolybdophosphoric acid (Lim, 1991) โดยนำ แบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์มา streak บนอาหารแข็ง NBRI-P ที่ใช้ K_2HPO_4 เป็นแหล่งของฟอสเฟตแทน $Ca_3(PO_4)_2$ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดเขียวเชื้อที่ปลอดเชื้อแตะ โคโลนีของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์มา 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลว NBRI-P (ใช้ K_2HPO_4 เป็นแหล่งของฟอสเฟตแทน $Ca_3(PO_4)_2$) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 180

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนเซลล์จำนวน 3 ครั้ง ด้วย 0.85% NaCl ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 โดยใช้ 0.85% NaCl ในการเจือจาง แล้วนำเซลล์เริ่มต้นมา 0.25 มิลลิลิตรถ่ายใส่อาหารเหลว NBRIP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบการละลายแคลเซียมฟอสเฟตด้วยการเติม 1N HCl ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปเติม vanadate-molybdate reagent ในอัตราส่วน 3.5:1 ปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที (Mehta and Nautiyal, 2001) สังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้น และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve)

7. การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอริโมนพืชออกซินของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์

นำแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์มา streak บนอาหารแข็ง NA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดเย็บเชื้อที่ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดียวของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์ 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl จำนวน 3 ครั้ง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 โดยใช้ 0.85% NaCl ในการเจือจาง นำเซลล์เริ่มต้นปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรถ่ายอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อครบ 48 ชั่วโมง เติมนิโคติน (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิโมล) (Brick, *et al.*, 1991) เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ออกซิน บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบการผลิตออกซินด้วยการเติม Salkowsky' reagent ในอัตราส่วนของสารละลายส่วนใสต่อ Salkowsky' reagent เท่ากับ 1:1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที แล้วสังเกตการเปลี่ยนจากสีเหลืองของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียกลายเป็นสีแดง และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve) (Gordon and Weber, 1951; Glickmann and Dessaux, 1995)

8. การศึกษาความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลินของแบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรัส

นำแบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรัสจาก stock culture มา streak บนอาหารแข็ง NA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเย็บเชือกที่ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรัส 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์เริ่มต้นในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl จำนวน 3 ครั้ง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรัสด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ให้มีค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 โดยใช้ 0.85% NaCl ในการเจือจาง นำเซลล์เริ่มต้นปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร มาใส่อาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อครบ 48 ชั่วโมง เติมหิริปีโตเฟนความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบการผลิตปริมาณการผลิตจิบเบอเรลลินด้วยวิธีการของ Paleg (1965) นำสารละลายส่วนใส 2.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มี 0.5M zinc acetate 0.2 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำมาเติม 0.5M potassium ferrocyanide 0.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาเติม 5% HCl ในอัตราส่วน 1:1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 75 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ 5% HCl เป็น blank ในการวัดปริมาณการผลิตจิบเบอเรลลิน นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve) (Glick et al. 1995; Vikram et al., 2007)

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ และการแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

จากการแยกแบคทีเรียจากบริเวณไรโซสเฟียร์ของรากพืช 4 ชนิด จากแปลงเกษตรกร ที่ปลูกบนชุดดินตาคลี จังหวัดลพบุรีซึ่งมีค่า pH ดินเป็นด่าง ด้วยวิธีการ dilution and plate ผลการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 80 ไอโซเลต โดยแยกแบคทีเรียจากพืชชนิดต่างๆ ได้ในจำนวนใกล้เคียงกันดังที่แสดงในตารางที่ 4 โดยสามารถแยกแบคทีเรียได้มากที่สุดจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของอ้อย คือ 24 ไอโซเลต รองลงมา คือ พริก และ ผักสลัดน้ำ ที่สามารถแยกแบคทีเรียได้ 19 ไอโซเลตเท่ากัน และข้าวโพด 18 ไอโซเลต

จากการศึกษาเพื่อแยกแบคทีเรีย และการนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชก่อนหน้าพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ไม่สามารถนำไปใช้ในทางการเกษตรได้จริงเนื่องจากพื้นที่ในการเกษตรมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากดินทั่วไป (Ross *et al.*, 2000) ด้วยเหตุผลนี้ในการศึกษารั้งนี้จึงเลือกเก็บตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์จากพื้นที่ทำการเกษตร เพื่อแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากผลการคัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์พบจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างกันมากนักในแต่ละชนิดพืช แต่พบสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่หลากหลายเนื่องจากลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้มีความแตกต่างกัน ทำให้ได้พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีความแตกต่างกันแม้จะปลูกในชุดดิน และสภาพแวดล้อมเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนประชากรของแบคทีเรียจะแปรผันกับชนิดของพืช และสารที่ปลดปล่อยออกมาจากรากพืชที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ชนิดของพืช และสารที่ปลดปล่อยออกมาจากรากพืช รวมไปถึงสภาวะแวดล้อมยังเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ของแบคทีเรียอีกด้วยดังที่จะได้ศึกษาในรายละเอียดต่อไป

ตารางที่ 4 แบบที่เรียที่เลือกมาทำการศึกษาจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของพืชชนิดต่างๆ ในชุดดิน
ตาคลี

ลำดับ	ชนิดพืช	ไอโซเลต	ลำดับ	ชนิดพืช	ไอโซเลต
1	ถั่วเขียว	Su01	27	ข้าวโพด	Cor27
2	ถั่วเขียว	Su02	28	ข้าวโพด	Cor28
3	ถั่วเขียว	Su03	29	ข้าวโพด	Cor29
4	ถั่วเขียว	Su04	30	ข้าวโพด	Cor30
5	ถั่วเขียว	Su05	31	ข้าวโพด	Cor31
6	ถั่วเขียว	Su06	32	ข้าวโพด	Cor32
7	ถั่วเขียว	Su07	33	ข้าวโพด	Cor33
8	ถั่วเขียว	Su08	34	ข้าวโพด	Cor34
9	ถั่วเขียว	Su09	35	ข้าวโพด	Cor35
10	ถั่วเขียว	Su10	36	ข้าวโพด	Cor36
11	ถั่วเขียว	Su11	37	ข้าวโพด	Cor37
12	ถั่วเขียว	Su12	38	ข้าวโพด	Cor38
13	ถั่วเขียว	Su13	39	ข้าวโพด	Cor39
14	ถั่วเขียว	Su14	40	ข้าวโพด	Cor40
15	ถั่วเขียว	Su15	41	ข้าวโพด	Cor41
16	ถั่วเขียว	Su16	42	ข้าวโพด	Cor42
17	ถั่วเขียว	Su17	43	พริก	Chi43
18	ถั่วเขียว	Su18	44	พริก	Chi44
19	ถั่วเขียว	Su19	45	พริก	Chi45
20	ถั่วเขียว	Su20	46	พริก	Chi46
21	ถั่วเขียว	Su21	47	พริก	Chi47
22	ถั่วเขียว	Su22	48	พริก	Chi48
23	ถั่วเขียว	Su23	49	พริก	Chi49
24	ถั่วเขียว	Su24	50	พริก	Chi50
25	ข้าวโพด	Cor25	51	พริก	Chi51
26	ข้าวโพด	Cor26	52	พริก	Chi52

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับ	ชนิดพืช	ไอโซเลต	ลำดับ	ชนิดพืช	ไอโซเลต
53	พริก	Chi53	67	ผักสลัดน้ำ	Wa67
54	พริก	Chi54	68	ผักสลัดน้ำ	Wa68
55	พริก	Chi55	69	ผักสลัดน้ำ	Wa69
56	พริก	Chi56	70	ผักสลัดน้ำ	Wa70
57	พริก	Chi57	71	ผักสลัดน้ำ	Wa71
58	พริก	Chi58	72	ผักสลัดน้ำ	Wa72
59	พริก	Chi59	73	ผักสลัดน้ำ	Wa73
60	พริก	Chi60	74	ผักสลัดน้ำ	Wa74
61	พริก	Chi61	75	ผักสลัดน้ำ	Wa75
62	ผักสลัดน้ำ	Wa62	76	ผักสลัดน้ำ	Wa76
63	ผักสลัดน้ำ	Wa63	77	ผักสลัดน้ำ	Wa77
64	ผักสลัดน้ำ	Wa64	78	ผักสลัดน้ำ	Wa78
65	ผักสลัดน้ำ	Wa65	79	ผักสลัดน้ำ	Wa79
66	ผักสลัดน้ำ	Wa66	80	ผักสลัดน้ำ	Wa80

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัของแบคทีเรีย

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัของแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยอาหารแข็ง CAS แบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัจะสามารถเปลี่ยนสีอาหาร CAS จากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม หรือสีเหลือง โดยจะปรากฏขึ้นรอบๆ โคโลนี เนื่องจากซิเดอโรฟอรัแย่งชิงเหล็กออกจากสารประกอบในอาหาร CAS (CAS-Fe(III)) จากการทดสอบพบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัจำนวน 15 ไอโซเลต จากแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 80 ไอโซเลต โดยพบจำนวนแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัมากที่สุดในอ้อย และผักสลัดน้ำ จำนวน 5 ไอโซเลต รองลงมาคือ ข้าวโพด และพริก พบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัจำนวน 3 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อนำแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัที่แยกได้จำนวน 15 ไอโซเลต ไปวัดปริมาณการผลิตซิเดอโรฟอรัพบว่าการผลิตซิเดอโรฟอรัอยู่ในช่วงระหว่าง 31.75-79.90% siderophore unit ทั้งนี้ไอโซเลต Su04 และ Su09 ที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของอ้อย และ ไอโซเลต Wa65 ที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของผักสลัดน้ำ มีความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัสูงสุดที่ 79% siderophore unit (ตารางที่ 5) และพบปริมาณการผลิตซิเดอโรฟอรัน้อยที่สุดในแบคทีเรียไอโซเลต Su20 ที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของอ้อย ปริมาณ 31.75 % siderophore unit ซึ่งในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chaiarn *et al.* (2009) สามารถแยกแบคทีเรีย

ผลิตซิเดอโรฟอร์ได้จากดินนาในภาคเหนือของประเทศไทยพบแบคทีเรีย *Pseudomonas aureofaciens* AR1 มีความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอร์สูงสุดที่ 99.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อทดสอบด้วยวิธีการของ Schwyn and Neilands (1987) ขณะที่ Sharma and Johri (2003) พบแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. PRS9 ที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของถั่วในประเทศอินเดียมีความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอร์สูงสุดที่ 216.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อวัดปริมาณการผลิตด้วยวิธี Meyer and Abdallah (1978)

โดยทั่วไปดินที่มี pH ดินเป็นด่างจะทำให้เหล็กในดินอยู่ในรูปที่พืชนำมาใช้ประโยชน์ได้ต่ำ จากการศึกษาพบว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์นับว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็กในดินต่อพืช ดังมีการรายงานว่าพืชที่ปลูกในดินที่ไม่มีการนึ่งฆ่าเชื้อดินพบว่าพืชไม่แสดงอาการขาดธาตุเหล็กและมีระดับธาตุเหล็กในดินในระดับสูง ในทางกลับกันพบว่าพืชที่ปลูกในดินที่มีการนึ่งฆ่าเชื้อพืชแสดงอาการขาดธาตุเหล็กให้เห็น (Masalha *et al.*, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ทำการแยกแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอร์จากดินที่มีค่า pH ดินเป็นด่างเนื่องจากเชื่อว่าน่าจะมีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอร์เมื่ออยู่ในสภาวะที่ธาตุเหล็กในดินอยู่ในสภาวะที่ไม่ละลายหรือไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช

ตารางที่ 5 ปริมาณการผลิตซิดิเดอโรฟอรัของแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลต ที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์

ลำดับ	ชนิดพืช	ไอโซเลต	ปริมาณการผลิตซิดิเดอโรฟอรั (% siderophore unit)
1	อ้อย	Su04	79.90±0.43
2		Su09	79.63±0.33
3		Su11	64.11±3.12
4		Su18	64.43±3.50
5		Su20	31.75±1.99
6	ข้าวโพด	Cor25	76.25±0.52
7		Cor26	66.88±2.51
8		Cor38	63.40±8.42
9	พริก	Chi44	56.48±3.64
10		Chi60	55.28±3.09
11	ผักสลัดน้ำ	Wa63	61.27±1.71
12		Wa64	65.47±1.42
13		Wa65	79.52±0.54
14		Wa70	57.52±5.53
15		Wa72	67.27±4.71

3. การระบุชนิดแบคทีเรียโดยการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนขงยีน 16S rRNA

จากการระบุชนิดแบคทีเรียผลิตซิดิเดอโรฟอรัจำนวน 15 ไอโซเลต ที่แยกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งมีขนาด 587 และ 1484 คู่เบส จาก primer 341r-928f และ 8f-1492r ตามลำดับ สามารถระบุแบคทีเรียได้เป็น 11 สกุล ดังนี้ *Burkholderia* *Xanthomonadaceae* *Pseudomonas* *Staphylococcus* *Stenotrophomonas* *Microbacterium* *Cupriavidus* *Bacillus* *Arthrobacter* *Agrobacterium* และ *Promicromonospora* ดังตารางที่ 6 ทั้งนี้แบคทีเรียผลิตซิดิเดอโรฟอรัที่มีประสิทธิภาพในการผลิตซิดิเดอโรฟอรัสูงสุดมี 3 ไอโซเลต

สามารถระบุได้ คือ ไอโซเลต Su04 มีความเหมือนกันของลำดับเบสกับ *Burkholderia cepacia* ไอโซเลต Su09 มีความเหมือนกันของลำดับเบสกับ *Xanthomonadaceae bacterium* และไอโซเลต Wa65 มีความเหมือนกันของลำดับเบสกับ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ระดับความเหมือน 99% 98% และ 98% ตามลำดับ

จากการแยกแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของพืช แล้วนำมาระบุชนิดแบคทีเรียโดยการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนขงยีน 16S rRNA พบแบคทีเรียมีความหลากหลายทางสายพันธุ์แม้จะแยกจากดินในชุดดินเดียวกัน เนื่องจากชนิดของพืชมีอิทธิพลโดยตรงในการควบคุมการผลิตสารเมแทบอลิต์ของแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์จากการหลั่งสารคัดหลั่งของรากพืช และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิดยังมีความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรั (phytosiderophore) ได้ด้วยตัวเอง ดังนั้นจึงทำให้แบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (Ma and Nomoto, 1996; Masalha *et al.*, 2000; Yehuda *et al.*, 1996) นอกจากนี้ปริมาณการผลิตซิเดอโรฟอรัที่วัดได้มีความแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลตแม้จะเป็นแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์พืชชนิดเดียวกัน เนื่องมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน (Lehino and Vacek, 1994)

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรั่ เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST

Isolate	Nearest phylogenetic neighbor (genus and species)	Accession no	Sequence alignment		
			Similarity nucleotide	E- value	% identity
Su04	<i>Burkholderia cepacia</i>	HM46117.1	530/531	0.0	99%
Su09	<i>Xanthomonadaceae bacterium</i>	JN846925.1	772/777	0.0	99%
Su11	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	HM451957.1	440/550	0.0	80%
Su18	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	JF505943.1	774/780	0.0	99%
Su20	<i>Pseudomonas boreopolis</i>	AJ864722.1	534/540	0.0	98%
Cor25	<i>Staphylococcus</i> sp.	GU361126.1	536/536	0.0	99%
Cor26	<i>Burkholderia arboris</i>	JF792427.1	552/562	0.0	98%
Cor38	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	FN908768.1	519/522	0.0	99%
Chi44	<i>Cupriavidus</i> sp.	AB542403.1	487/491	0.0	99%
Chi60	<i>Bacillus pumilus</i>	GU998809.1	293/303	0.0	97%
Wa63	<i>Arthrobacter</i> sp.	FN666614.1	517/525	0.0	98%
Wa64	<i>Bacillus</i> sp.	HM484306.1	531/531	0.0	100%
Wa65	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	HM582868.1	874/918	0.0	98%
Wa70	<i>Agrobacterium</i> sp.	GU248316.1	482/498	0.0	96%
Wa72	<i>Promicromonospora</i> sp.	EU939448.1	491/498	0.0	98%

4. การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัส

คุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียจะช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินเป็นกลไกหนึ่งในการเพิ่มความสามารถในการดูดใช้ฟอสฟอรัสของจุลินทรีย์และยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย (Verma *et al.*, 2001) เมื่อนำแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสทั้ง 15 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร NBIRP เพื่อทดสอบความสามารถในการละลายแคลเซียมฟอสเฟต พบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสทุกไอโซเลตมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยสังเกตได้จากการเกิดวงใสของการละลายแคลเซียมฟอสเฟตรอบๆ โคโลนีบนอาหาร NBIRP และการเกิดวงใสรอบโคโลนีมีขนาดแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต บ่งชี้ว่าแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสแต่ละไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการละลายแคลเซียมฟอสเฟตได้แตกต่างกัน จึงได้มีการทดลองในขั้นต่อไปเพื่อศึกษาปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสแต่ละไอโซเลตตามวิธีการของ Mehta and Nautiyal (2001) พบปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตมีความสัมพันธ์กับวงใสรอบโคโลนี พบปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสอยู่ในช่วงระหว่าง 56.78-270.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยแบคทีเรียไอโซเลต Wa65 มีความสามารถในการละลายแคลเซียมฟอสเฟตสูงสุดที่ความเข้มข้น 270.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (ตารางที่ 7) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ สุภาพร 2553 ที่สามารถแยกแบคทีเรีย *Burkholderia multivorans* Rs01 จากดินนากรดกำมะถันซึ่งเป็นชุดดินรังสิต เมื่อทดสอบปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตด้วยวิธี molybdenum blue method พบแบคทีเรียสามารถละลายแคลเซียมฟอสเฟตได้สูงสุด 287.5 มิลลิกรัมต่อลิตร Ribeiro and Cardoso (2011) แยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของ *Araucaria angustifolia* พบแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* มีความสามารถในการละลายแคลเซียมฟอสเฟต 450 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เมื่อวัดปริมาณการผลิตด้วยวิธี vanadomolybdophosphoric acid

ถึงแม้ว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจะพบได้ทั่วไปในดินบริเวณไรโซสเฟียร์ แต่ก็ยังมีจำนวนประชากรไม่สูงนักเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียทั่วไปในดิน (Skrary and Cameron, 1998; Azeem *et al.*, 2007) ดังในการศึกษาก่อนหน้านี้ Hameeda *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพื่อนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย พบแบคทีเรียละลายฟอสเฟต 5 ไอโซเลต เท่านั้น จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 207 ไอโซเลต Ribeiro and Cardoso (2011) แยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้จำนวน 27 ไอโซเลต จากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของ *Araucaria angustifolia* ทั้งหมด 97 ไอโซเลต เนื่องจากดินที่นำมาทำการศึกษานี้มี pH ของดินค่อนข้างสูงจึงทำให้มีโอกาสที่จะพบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการละลายฟอสเฟตและความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัสของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กันโดยความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัสสามารถพบได้ในแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในปริมาณสูง สอดคล้องกับความจริงที่ว่าแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัสจะมีกลไกในการผลิตซิเดอโรฟอรัสและการผลิตกรดอินทรีย์ที่ใช้ในการละลายฟอสเฟตอยู่ด้วย (Vassilev *et al.*, 2006) และใช้กลไกนี้ในการตอบสนองต่อสภาวะที่ขาดแคลนเหล็ก (Guerinot *et al.*, 1990; Machuca *et al.*,

2001) ดังการรายงานของ Kloepper *et al.* (1988) และ Glick (1995) ที่พบว่าผลผลิตของพืชเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใส่แบคทีเรียที่มีความสามารถทั้งการผลิตซิเดอโรฟอรัและการละลายฟอสเฟต

ตารางที่ 7 ปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรั

ลำดับ	ไอโซเลต	ปริมาณการละลายแคลเซียมฟอสเฟต ($\mu\text{g/ml}$)
1	Su04	254.97 $\pm$ 9.9
2	Su09	114.25 $\pm$ 7.5
3	Su11	175.69 $\pm$ 2.1
4	Su18	117.00 $\pm$ 36.0
5	Su20	183.40 $\pm$ 7.4
6	Cor25	99.17 $\pm$ 11.5
7	Cor26	207.62 $\pm$ 10.3
8	Cor38	56.78 $\pm$ 3.5
9	Chi44	94.65 $\pm$ 12.0
10	Chi60	223.37 $\pm$ 24.1
11	Wa63	135.83 $\pm$ 15.7
12	Wa64	130.77 $\pm$ 11.4
13	Wa65	270.27 $\pm$ 1.6
14	Wa70	57.22 $\pm$ 8.1
15	Wa72	193.31 $\pm$ 7.9

3. การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอโมนพืชของแบคทีเรีย

3.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอโมนพืชออกซินของแบคทีเรีย

การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอโมนพืชออกซินของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรั โดยการทดสอบด้วย Salkowsky' reagent พบว่าสีเหลืองของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีชมพู แสดงว่าแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่มีความสามารถในการผลิตฮอโมนพืชออกซิน จากการศึกษาพบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัที่มีความสามารถในการผลิตฮอโมนพืชออกซินจำนวน 14 ไอโซเลต มีเพียง Su09 เท่านั้นที่ไม่มีความสามารถในการผลิต โดยพบปริมาณการผลิตอยู่ในช่วงระหว่าง 2.43-22.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่ง Chi60 มีความสามารถในการการผลิตฮอโมนพืชออกซินสูงสุด ที่ความเข้มข้น

22.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 8) ปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละไอโซเลตไม่ขึ้นกับชนิดพืชที่แยกแบคทีเรียได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ที่สามารถผลิตฮอร์โมนพืชออกซินได้โดยจากการศึกษาของ Ahmad *et al.* (2008) พบการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินอยู่ในระดับ 2.13-3.6 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จาก *Azotobacter* และ *Pseudomonas* Gravel *et al.*, (2007) และพบการผลิตอยู่ในระดับ 3.3-6.2 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใน *P. putida* และ *Trichoderma atroviride* นอกจากนี้ Marques *et al.* (2010) รายงานการผลิตในระดับ 2.9-17 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใน *Chryseobacterium* sp. *Bacillus* sp. *Achromobacter* sp. และ *Ralstonia eutropha* (Husen 2003; Yasmin *et al.*, 2007; Vasconcellos *et al.*, 2010; Ribeiro and Cardoso, 2011)

ตารางที่ 8 ปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชออกซินของแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรั

ลำดับ	ไอโซเลต	ออกซิน ($\mu\text{g/ml}$)
1	Su04	12.93 $\pm$ 0.2
2	Su09	0.00 $\pm$ 0.0
3	Su11	8.91 $\pm$ 0.0
4	Su18	5.25 $\pm$ 0.5
5	Su20	12.60 $\pm$ 0.4
6	Cor25	5.02 $\pm$ 0.5
7	Cor26	10.52 $\pm$ 0.2
8	Cor38	7.39 $\pm$ 0.1
9	Chi44	8.29 $\pm$ 0.6
10	Chi60	22.86 $\pm$ 0.7
11	Wa63	11.92 $\pm$ 0.4
12	Wa64	6.60 $\pm$ 0.4
13	Wa65	17.26 $\pm$ 0.7
14	Wa70	2.43 $\pm$ 0.1
15	Wa72	3.09 $\pm$ 0.0

ฮอร์โมนพืชออกซินที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีผลต่อระบบรากของพืชในการเพิ่มขนาดและปริมาณของรากฝอย การเพิ่มการแตกราก ซึ่งเป็นเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสรากกับดินในการดูดใช้ธาตุอาหารพืชและน้ำทำให้พืชรับธาตุอาหารและน้ำเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลของฮอร์โมนพืชออกซินต่อพืชนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของออกซิน ชนิด และสายพันธุ์ของพืช นอกจากนี้ฮอร์โมนพืชออกซินอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ (Solano *et al.*, 2008) เพราะเมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชออกซินมีปริมาณน้อยจะช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชแต่เมื่อมีความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชออกซินในปริมาณมากจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Xie *et al.*, 1996) ในการศึกษาพบปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชของแบคทีเรียในปริมาณปานกลางจึงเหมาะสมที่จะนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

3.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินของแบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรัส

การศึกษาความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินของแบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรัส โดยวิธีการของ Paleg (1965) พบปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินอยู่ในช่วงระหว่าง 185.49-246.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 9) โดยแบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรัส ไอโซเลต Wa65 มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินสูงสุดที่ความเข้มข้น 270.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรัส ไอโซเลต Wa63 มีปริมาณการผลิตจิบเบอเรลลินน้อยที่สุดที่ 185.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาพบแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินจึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินเป็นฮอร์โมนที่ได้มีการศึกษา และสกัดกรดจิบเบอเรลิกมาใช้ในการทางการเกษตรมาเป็นเวลานาน และสารสกัดกรดจิบเบอเรลิกที่จำหน่ายกันในทางการค้าส่วนใหญ่มีราคาแพง จึงมีนักวิทยาศาสตร์หันมาสนใจในการที่ศึกษาแบคทีเรียดินที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินเพื่อนำมาใช้ในการทางการเกษตร แต่การศึกษาส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาการผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในเชื้อรา เช่น ในการศึกษาของ Muhammad *et al.* (2009) พบ *Scolecobasidium tshawytschae* มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน 17.84 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ศึกษาความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินในแบคทีเรีย และนำแบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินมาใช้ในการทางการเกษตร เช่น Karako and Aksoz (2005) รายงานว่าพบแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน 285.06 มิลลิกรัมต่อลิตร Cassan *et al.* (2009) พบ *Azospirillum brasilense* Az39 และ *Bradyrhizobium japonicum* E109 มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน 0.95 และ 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียทั้งสองชนิดไปทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการงอกและการเจริญของต้นอ่อนข้าวโพดและถั่วเหลือง พบว่าการใช้แบคทีเรียทั้งสองชนิดร่วมกันหรือการใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวในการคลุกเมล็ดก่อนปลูกมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ของการงอกและการเจริญของต้นอ่อนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองควบคุม เนื่องจากการผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลินของแบคทีเรียดังกล่าว

ตารางที่ 9 ปริมาณการผลิตฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินของแบคทีเรียผลิตซีเดอโรฟอรั

ลำดับ	ไอโซเลต	จิบเบอเรลลิน (µg/ml)
1	Su04	189.29±11.2
2	Su09	205.07±11.9
3	Su11	198.93±9.4
4	Su18	214.42±0.0
5	Su20	198.93±9.0
6	Cor25	197.32±11.8
7	Cor26	207.41±5.4
8	Cor38	205.07±8.4
9	Chi44	208.87±15.8
10	Chi60	193.38±7.0
11	Wa63	185.49±2.3
12	Wa64	197.47±10.3
13	Wa65	246.42±14.4
14	Wa70	202.15±10.9
15	Wa72	202.44±9.8

สรุปและเสนอแนะ

จากการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของพืช 4 ชนิด คือ อ้อยข้าวโพด พริก และ ผักสลัดน้ำ ได้จำนวน 80 ไอโซเลต พบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัจำนวน 15 ไอโซเลต และมีความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอรัอยู่ในช่วงระหว่าง 31.75-79.90% siderophore units เมื่อนำแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัทั้ง 15 ไอโซเลตไปทดสอบการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ พบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัมีความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตอยู่ในช่วงระหว่าง 56.78-270.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถผลิตฮอร์โมนออกซิน และจิบเบอเรลลินอยู่ในช่วงระหว่าง 2.43-22.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 185.49-246.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาพบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัไอโซเลต Su04 Su09 และ Wa65 มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสในยีน 16S rRNA พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับเบสกับ *Burkholder cepacia* *Xanthomonadaceae* *bacterium* และ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ระดับความเหมือน 99% 98% และ 98% ตามลำดับ

จากการศึกษาพบแบคทีเรียผลิตซิเดอโรฟอรัไอโซเลต Su04 Su09 และ Wa65 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จึงน่าจะมีการนำไปศึกษา และวิเคราะห์ถึงชนิดของซิเดอโรฟอรัที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ปัจจัยที่ควบคุมการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงมาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชกับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แล้วนำมาพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์เพื่อนำใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร โดยเฉพาะในพื้นที่ที่เป็นดินเหนียวมี pH ดินสูง

CAS เป็นอาหารที่ใช้ในการทดสอบการผลิตซิเดอโรฟอรัซึ่งมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์บางชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก เพราะมีสาร HDTMA ดังนั้นเมื่อนำมาใช้จึงไม่สามารถทดสอบการผลิตซิเดอโรฟอรัได้ครอบคลุมในทุกชนิดของแบคทีเรีย ควรใช้วิธีการที่ครอบคลุมแบคทีเรียทุกชนิด เช่น การวัดการผลิตซิเดอโรฟอรัด้วย high performance liquid chromatography (HPLC)

เอกสารอ้างอิง

- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จารุวรรณ ไควสุรัตน์. 2535. การผลิตจิบเบอเรลลินโดยการเลี้ยงเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ในอาหารแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ยงยุทธ ไอสกสภา. 2552. ธาตุอาหารพืช. พิมพ์ครั้งที่ 3 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุภาพร จันรุ่งเรือง. 2553. การแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turk. J. Biol. 29: 29-34.
- Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol. Res. 163: 173-181.
- Alami, Y., W. Achouak, C. Marol and T. Heulin. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflower by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3393-3398.
- Alexander, D.B. and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fertil. Soils. 12: 39-45.
- Alexander, M. 1977. Introduction to soil Microbiology. 2nd ed. Wiley Eastern Limited, New York.
- Atzorn, R., A. Crozier, C.T. Wheeler and G. Sandberg. 1988. Production of gibberellins and indole-3-acetic-acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. Planta. 175: 532-538.
- Azeem, S.A.M., E.L. ABD, T.A. Mehana and A.A. Shabayek. 2007. Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. Afr. Crop. Sci. J. 8: 1517-1525.
- Banik, S. and B.K. Dey. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. Plant Soil. 69: 353-364.
- Bartel, B. 1997. Auxin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 48: 51-66.
- Bashan, Y. and L.E. Bashan. 2005. Bacteria, pp. 103-115. In D. Hillel, ed. Encyclopedia of soils in the environment. Oxford, Oxford.
- Beever, R.E. and D.J.W. Burns. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. Adv. Bot. Res. 8: 127-219.

- Beneduzi, A., P. Daiane, P.B. Costa, M.H.B. Zanettini and L.M.P. Passaglia. 2008. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Res. Microbiol.* 159: 244-250.
- Bending, G.D. 2003. The rhizosphere and its microorganisms, pp. 1123–1129. *In* B. Thomas, D.J. Murphy and B.G. Murray, eds. *Encyclopaedia of applied plant sciences*. Academic Press, London.
- Benizri, E., A. Courtade and C.P. Guckert. 1998. A Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1481-1484.
- Bienfait, H.F. and F.V. Mark. 1983. Phytoferritin and its role in iron metabolism, pp. 111-123. *In* D.A. Robb and W.S. Pierpoint, eds. *Metals and micronutrients uptake and utilization by plants*. Academic Press, London.
- Boiero, L., D. Perrig, O. Masciarelli, C. Penna, F. Cassan and V. Luna. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 874–880.
- Botelho, G.R. 2001. Seleção de *Pseudomonas fluorescentes* para controle biológico da podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani*. Ph.D.. Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce and R.P. Pharis. 1989. Identification of gibberellins A₁, A₃ and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *J. plant physiol.* 10: 45–47.
- Bottini, R., F. Cassan and P. Piccoli. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 497–503.
- Boukhalfa, H. and A.L. Crumbliss. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated transport. *BioMetals.* 15: 325-339.
- Brady, N.C. and R.R. Weil. 2002. *The Nature and Properties of Soils*. 13th ed. The Macmillan Co., New York.
- Brick, J.M., R.M. Bostock and S.E. Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for indole-acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535–538.
- Cakmakci, R., F. Donmez, A. Aydm and F. Sahin. 2006. Growth promotion of plants by plant growth promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38: 1482–1487.
- Cassana, F., D. Perriga, V. Sgroya, O. Masciarellia, C. Pennab and V. Lunaa. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 45: 28–35

- Chaiharn, M., M. Chunhaleuchanon and S. Lumyong. 2009. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 1919–1928.
- Chen, Y.P., P.D. Rekha, A.B. Arunshen, W.A. Lai and C.C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34: 33-41.
- Chen, J. 1996. In vitro tomato fruit cultures demonstrate a role for indole-3-acetic acid in regulating fruit ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 520-524.
- Claverys, J.P. and L.S. Havarstein. 2002. Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Biosci.* 7: 1798–1814.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément and E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.
- Corsa, J.H. and C.T. Walsh. 2002. Genetic and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 223-249.
- Crowley, E. 2006. Microbial siderophore in the plant rhizosphere, pp. 169–198. *In* L.L. Barton and J. Abadia, eds. Iron nutrition in plants and rhizosphere microorganisms. Springer, Netherlands.
- Crozier, A., Y. Kamiya, G. Bishop and T. Yokota. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules, pp. 850–929. *In* B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones, eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiology, Rockville.
- Czajkowski, R. and S. Jafra. 2009. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta. Biochem. Pol.* 56: 1-16.
- Dadarwal, K.R. 1997. Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production. Scientific publishers, Jodhpur, India.
- Dohrmann, A.B. and C.C. Tebbe. 2005. Effect of elevated tropospheric ozone on the structure of bacterial communities inhabiting the rhizosphere of herbaceous plants native to Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7750–7758.
- Dye, F.W., J. Jones, S.R. Chhabra and J.A. Downie. 2002. *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 184: 1597–1606.
- Ehrlich, H.L. 1990. Mikrobiologische und biochemische verfahrenstechnik, pp. 220. *In* A. Einsele R.K. Finn and W. Samhaber, eds. Geomicrobiology. 2nd ed. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft.

- Engebrecht, J., K. Nealson and M. Silverman. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*. 32: 773-781.
- Fageria, N.K., V.C. Baligar and R.B. Clark. 2002. Micronutrients in crop production, pp. 185-268. *In* D.L. Sparks, ed. *Advances in agronomy*. Academic Press, San Diego.
- Fertilizer industry federation of Australia (FIFA). 2006. Australian soil fertility manual.. CSIRO publ. Inc., Oxford.
- Frankenberger, W.T. and M. Arshad. 1995. *Phytohormones in soils: microbial production and function*. Marcel dekker. Inc., New York.
- Frederick, R.T. and L.M. Thompson. 2005. *Soils and soil fertility*. Blackwell publ. Ltd., Oxford.
- Fuqua, C. and E.P. Greenberg. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 685–695
- Fuqua, W.C., S.C. Winans and E.P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269–275.
- Gaur, A.C. and K.P. Ostwal. 1972. Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. *Indian J. Exp. Biol.* 10: 393-394.
- Gerretsen, F.C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil.* 1: 51–81.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109–117.
- Glick, B.R., D.M. Karaturovic and P.C. Newel. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonas*. *Can. J. Microbiol.* 41: 533–536.
- Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin and D.M. Penrose. 1999. *Biochemical and genetic mechanism used by plant promoting bacteria*. Imperial college press, London.
- Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793–796.
- Gobat, M.J., M. Aragno and W. Matthey. 2004. *The living soil: fundamentals of soil science and soil biology*. Scirnce publ. Inc., New Hampshire.
- Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* 1: 51–57.
- Goldstein, A.H. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria, pp 197–203. *In* A. Torriani-Gorini, E. Yagil and S. Silver, eds. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington.

- Goldstein, A.H., R.D. Rogers and G. Mead. 1993. Mining by microbe. *Bio. Technol.* 11: 1250–254.
- Gonzalez, J.E. and M.M. Marketon. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing Rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 574–592.
- Gordon, S.A. and R.P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology.* 26: 192–195.
- Gravel, V., H. Antoun and R.J. Tweddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39: 1968–1977.
- Gray, E.J. and D.L. Smith. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395–412.
- Guerinot, M.L., E.J. Meidl and O. Plessner. 1990. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 172: 3298–3303.
- Halder, A.K., A.K. Mishra, P. Bhattacharyya and P.K. Chakrabarty. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 81–92.
- Halder, A.K. and P.K. Chakrabarty. 1993. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia. Microbiol.* 38: 325–330.
- Harpstead, I.M., T.J. Sauer and W.F. Bennett. 2001. *Soil science simplified*. 4th ed. Blackwell publ. Ltd, Iowa.
- Havlin, J.L., S.L. Tisdale, J.D. Beaton and W.L. Nelson. 2005. *Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management*. 7th ed. Pearson prentice hall, New Jersey.
- Hameeda, B., G. Harini, O.P. Rupela, S.P. Wani and G. Reddy. 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163: 234–242.
- He, X., W. Chang, D.L. Pierce, L.O. Seib, J. Wagner, C. Fuqua. 2003. Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J. Bacteriol.* 185: 809–822.
- Hedden, P. and S.G. Thomas. 2006. *Plant hormone signaling*. Blackwell publ. Ltd, Oxford.
- Hendrickson, A., J. Luswig-Mueller and J. Cohen. 2004. International plant growth substances association conference. Canberra, Australia.
- Hofte, M. 1993. Classes of microbial siderophore, pp. 1–27. *In* L.L. Barton and B.C. Hemming, eds. *Iron chelation in plants and soil microorganisms*. Academic Press, San Diego.
- Hoang, H.H., A. Becker and J.E. Gonzalez. 2004. The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J. Bacteriol.* 186: 5460–5472.

- Husen, E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. Indon. J. Agric. Sci. 4: 27–31.
- Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biol. Biochem. 24: 389–395.
- Ingels, J.E. 2009. Ornamental horticulture science, operations and management. Reputable publ. Inc., United State.
- Janzen, R., S. Rood, J. Dormar and W. McGill. 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically medium and in co-culture on straw. Soil Biol. Biochem. 24: 1061–1064.
- Jones, D.A., B.F.L. Smith, M.J. Wilson and B.A. Goodman. 1991. Solubilizer fungi of phosphate in rice soil. Mycol. Res. 95: 1090–1093.
- Joseph, R., R. Patra and R. Lawrenc. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Plant Prod. 2: 141-152.
- Jurkevitch, E., Y. Yitzhak and Y. Chen. 1992. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58: 119-124.
- Kaplan, H.B. and E.P. Greenberg. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. J. Bacteriol. 63: 1210–1214.
- Karako, S. and N. Aksoz. 2005. Some optimal cultural parameters for gibberellic acid biosynthesis by *pseudomonas* sp. Turk. J. Biol. 30: 81-85.
- Karadeniz, A., S.F. Topcuog and S. Inan. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 22: 1061–1064.
- Katznelson, H., E.A. Peterson and J.W. Rovatt. 1962. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. Can. J. Bot. 40: 1181–1186.
- Khalid, A., M. Arshad and Z.A. Zahir. 2004. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. J. Appl. Microbiol. 96: 473-480.
- Kleerebezem, M., L.E. Quadri, O.P. Kuipers and W.M. Vos. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. Mol. Microbiol. 24: 895–904.
- Kloepper, J.W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, pp. 255–274. In F.B. Metting, ed. Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Kloepper, J.W., K. Lifshitz and M.N. Schroth. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Sci. Animal Plant Sci. 1: 60–64.

- Kole, S.C. and J.N. Hajra. 1997. Isolation and evaluation of tricalcium and rock phosphate solubilizing microorganisms from acidic terai and lateritic soils of West Bengal. J. Interacademia. 1: 126–128.
- Kucey, R.M.N., H.H. Janzen and M.E. Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. Adv. Agron. 42: 199–228.
- Lakha, S.S. and B.R. Glick. 2007. Plant growth promoting bacteria, pp. 503-516. In J.D. Elsas, J.K. Jansson and J.T. Trevors, eds. Modern microbiology. 2nd ed. CRC. Press, USA.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115–174. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley in Chichester, New York.
- Lazdunski, A.M., I. Ventre and J.N. Sturgis. 2004. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 2: 581-92.
- Lehino, S.V. and O. Vacek. 1994. Biosynthesis of auxin by phosphate solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). Microbiol. Res. 149: 31-35.
- Lemanceau, P., T. Corberand, L. Gardan, X. Latour, G. Laguerre, J.M. Boeufgras and C. Alabouvette. 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum Usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), on the diversity of soil populations of fluorescent *Pseudomonas*. Appl. Environ. Microbiol. 6: 1004-1012.
- Leong, J. and J.B. Neilands. 1976. Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria. J. Bacteriol. 126: 823-30.
- Leopold, A.C. 1975. Plant growth and development. McGram-Hi11 Publishing Co. Ltd, New Dehli.
- Lindsay, W.L. 1995. Chemical reaction in soil that affect iron availability to plant, pp. 7-14. In J. Abadia, ed. Iron nutrition in soils and plants, Developments in plant and soil sciences. Kluwer, Dordrecht, Netherland.
- Lindsay, W.L. 1979. Chemical Equilibria in Soils. John Wiley and Sons, Inc., New York
- Liu, T.S., L.Y. Lee, C.Y. Tai, C.H. Hung, Y.S. Chang, J.H. Wolfram, R. Rogers and A.H. Goldstein. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. J. Bacteriol. 174: 5814–5819.
- Liu, D., J. Diorio, B. Tannenbaum, C. Caldji, D. Francis, A. Freedman, S. Sharma, D. Pearson, P.M. Plotsky and M.J. Meaney. 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. Science. 277: 1659–1662.

- Lindsay, W. L. and A.P. Schwab. 1992. The chemistry of iron in soil and its availability to plant. J. Plant Nutr. 5: 821-840.
- Lim, S. 1991. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, USA.
- Loh, J., E.A. Pierson, L.S. Pierson and S.G. Chatterjee. 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. Curr. Opin. Plant Biol. 5: 285–290.
- Lucy, M., E. Reed and B.R. Glick. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie Leeuwenhoek. 86: 1–25.
- Lugtenberg, B. and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63: 541-556
- Ma, J.F. and D. Nomoto. 1996. Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants: The role of mugenic acids as phytosiderophores. Physiol. Plantarum. 97: 609–617.
- Ma, Y., M.N.V. Prasad, M. Rajkumar and H. Freitas. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. Biotechnol. Adv. 29: 248–258
- Macadam, J.W. 2009. Structure and function of plants. Wiley-Blackwell. Inc., Iowa.
- Machuca, R., L.B Jorgensen, P. Theilade and C. Nielsen. 2001. Molecular investigation of transmission of human immune deficiency virus type 1 in a criminal case. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8: 884-890.
- Macmillan, J. 2001. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. J. Plant Growth Regul. 20: 387–442.
- Manero, F.J.G., N. Acero, J.A. Lucas and A. Probanza. 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) growth. Plant Soil. 182: 67–74.
- Marilley, L. and M. Aragno. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. Appl. Soil Ecol. 13: 127–136.
- Marketon, M.M. and J.E. Gonzalez. 2002. Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 184: 3466–3475.
- Marques, A., C. Pires, H. Moreira, A.O.S. Rangel and P.M.L. Castro. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. Soil Biol. Biochem. 42: 1229-1235.
- Marschner, P., C.H. Yang, R. Lieberei and D.E. Crowley. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biol. Biochem. 33: 1437–1445.
- Masalha, J., H. Kosegarten, O. Elmaci and K. Mengal. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. Biol. Fertil. Soils. 30: 433–439.

- Mayville, P., G. Ji, R. Beavis, H. Yang, M. Goger, R.P. Novick and T.W. Muir. 1999. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 1218–1223.
- Metha, S. and C.S. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Curr. Microbiol. 43: 51-56.
- Meyer, J.M. and M.A. Abdallah. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physiochemical properties. J. Gen. Microbiol. 107: 319–328.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Miranda, P.S., N. Cabirol, R.G. Téllez, L.S.Z. Rivera and F.J. Fernández. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. J. Microbiol. Met. 70: 127-131.
- Mirleau, P., S. Delorme, L. Philippot, J.M. Meyer, S. Mazurier and P. Lemanceau. 2001. Involvement of nitrate reductase and pyoverdine in competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 in soil. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2627–2635.
- Muhammad, H., S.A.Khan, H.Y. Kim, M.F. Chaudhary, Y.H. Hwang, D.H. Shin, I.K. Kim, B.H. Lee and I.J. Lee. 2009. Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *scoleobasidium tshawytschae*. J. Microbiol. Biotechnol. 19: 560–565
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170: 65-270.
- Patten, C.L. and B.R. Glick. 2001. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3795-3801.
- Paleg, L.G. 1965. Physiological effect of gibberellins. Ann. Rev. Plant physiol. 16: 291-293
- Payne, S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. Meth. Enzymol. 235: 329–344.
- Pinton, R.Z. Veranini and P. Nannipieri. 2007. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Taylor and Francis Group, New York.
- Podbielski, A. and B.B. Kreikemeyer. 2004. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of gram-positive cocci. Int. J. Infect. Dis. 8: 81–95.
- Raghu, K. and I.C. MacRae. 1966. Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. J. Appl. Bacteriol. 29: 582–586.
- Ramette, A., Y.M. Looco and G. Defago. 2003. Prevalence of fluorescent *Pseudomonas* producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soil naturally suppressive or condition to tobacco black root rot. FEMS Microbiol. Ecol. 44: 35-43.
- Reading, N.C. and V. Sperandio. 2005. Quorum sensing: the many languages of bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 254: 1–11.

- Ribeiro, M.C. and E.J.B.N. Cardoso. 2011. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). Microbiol. Res. 2541: 1-10.
- Ribinky, D., J. Cohn, W.S. Hu and T. Cooke. 2002. An extraordinary auxin surge following fertilization in carrot: its significance for plant totipotency. Plant. 214: 505-509.
- Richardson, A.E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Aust. J. Plant Physiol. 28: 897-906.
- Rajkumar, M., N. Ae, M. Prasad and H. Freitas. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends Biotechnol. 28: 142-149.
- Rodriguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17: 319-339.
- Romheld, V. and H. Marschner. 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species, pp. 155-204. In B. Tinker and A. Lauchlin, eds. Advances in plant nutrition. 2nd ed. Praeger, New York.
- Romheld, V. and M. Nikolic. 2007. Iron, pp. 329-350. In A.V. Barker and D.J. Pilbeam, eds. Handbook of plant nutrient. CRC. Press, New York.
- Rosemeyer, V., J. Michiels, C. Verreth and J. Vanderlinden. 1998. *luxI* and *luxR* homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. J. Bacteriol. 180: 815-821.
- Ross, I.L., Y. Alami, P.R.W.H. Achovak and M.H. Ryder. 2000. Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related *Pseudomonas* isolated from wheat field soil in south Australia. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1609-1616.
- Salehrastin, N. 1999. Biological Fertilizers, Soil and Water Research Institute of Iran. J. Soil Water Sci. 12: 35-42.
- Schwyn, B. and B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160: 46-56.
- Sequeira, L. and P.H. Williams. 1964. Synthesis of indole-acetic acid by *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology. 54: 1240-1246.
- Sharma, A. and B.N. Johri. 2003. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. Microbiol. Res. 158: 243-248.
- Sharma, A., B.N. Johria, A.K. Sharmab and B.R. Glickc. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). Soil Biol. Biochem. 35: 887-894.
- Shama, C.P. 2006. Plant micronutrients. Science publishers, New Hampshire.

- Shaw, P.D., G. Ping, S.L. Daly, C. Cha, J.E. Cronan, and K.L. Rinehart. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6036–6041.
- Siddiqui, Z.A. 2006. *Biocontrol and biofertilization*. Springer, Netherlands.
- Skrary, F.A. and D.C. Cameron. 1998. Purification and characterization of a *Bacillus licheniformis* phosphatase specific for d-alphaglycerphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 349: 273-35.
- Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer and G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4742–4751.
- Solano, B.R., J. Barriuso and F.J.G. Manero. 2008. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), pp. 41–54. *In* I. Ahmad, J. Pichtel and S. Hayat, eds. *Plant bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Somers, E., J. Vanderleyden and M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 26: 91-110.
- Sorkin, R.D., C.J. Hays and R. West. 2001. Signal detection analysis of group decision making. *Psychol. Rev.* 108: 183-203.
- Sperberg, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust. J. Agric. Res.* 9: 778.
- Stowe, B.B. and T. Yamaki. 1957. The history and physiological action of the gibberellins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 8: 181–216.
- Subba, R.N.S. 1982. Advances in agricultural microbiology, pp. 295–303. *In* N.S. Subba Rao, ed. *Studies in the Agricultura and Food Sciences*. Butterworth Scientific, London.
- Tamas, M.J. and E. Martinoia. 2006. *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification: from microbes to man*. Springer berlin heidelberg, New York.
- Tanimoto, E. 2005. *Critical reviews in plant sciences*. Springer berlin heidelberg, New York.
- Teaumroong, N. and N. Boonkerd. 1996. Iron element, siderophores and microbes. *Suranaree J. Sci. Technol.* 3: 95-100.
- Tempe, J., A. Petit, M. Holsters, M. Montagu and J. Schell. 1977. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: possible relation to transformation in crown gall. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 2848–2849.
- Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdyntseva, S.G. Botina and A.I. Netrusov. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Res. Microbiol.* 162: 69–76.

- Tudzynski, B. 2005. Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 597–611.
- Ulrich, R.L., D. Deshazer, E.E. Brueggemann, H.B. Hines, P.C. Oyston and J.A. Jeddloh. 2004. Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Med. Microbiol.* 53: 1053-64.
- Vancura, V. 1987. Microorganisms, their mutual relation and function in the rhizosphere, pp. 219-233. *In* V. Vancura and F. Kunc, eds. *Soil microbial associations*. Academia Prague, Czechoslovakia.
- Vasconcellos, R.L.F., M.C.P. Silva, C.M.R. Ribeiro and E.J.B.N. Cardoso. 2010. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere. *Soil. Sci. Agric.* 67: 743–746.
- Vassilev, N., A. Medina, R. Azcon and M. Vasslev. 2006. Microbial solubilization of rock phosphate media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant Soil.* 287: 77-84.
- Verma, S.C., J.K. Ladha and A.K. Tripathi. 2001. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127–141.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255: 571–586.
- Vikram, A., H. Jamzehzarghani, A.R. Alagawadi, P.U. Krishnaraj and B.S. Chandrashekar. 2007. Production of plant growth promoting substances by phosphate solubilizing bacteria isolated from Vertisols. *J. Plant sci.* 2: 326-333.
- Weidner, S., W. Arnold and A. Puhler. 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 766–771
- Whipps, J.M. 1990. *The rhizosphere*. Chichester, UK.
- Williams, P., K. Winzer, W. Chan, and M. Camara. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 362: 1119–1134.
- Winkelmann, G. 2007. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals.* 20: 379-392.
- Winkelmann, G. and H. Drechsel. 1997. Iron chelation and siderophore, pp. 1-40. *In* G. Winkelmann and C.J. Carrano, eds. *Transition metals in microbial metabolism*. Harwood academic, Amsterdam.

- Woodward, A. and B. Bartel. 2005. Auxin: regulation action and interaction. Ann. Bot. 95: 707-735.
- Xie, H., J.J. Pasternak and B.R. Glick. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indole acetic acid. Curr. Microbiol. 32: 67-70.
- Yabuta, T. and Y. Sumiki. 1938. On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 14: 1526.
- Yadav, K.S. and K.R. Dadarwal. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganism. pp. 351. In K.R. Dadarwal ed. Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production. Scientific Publishers, USA
- Yang, C.H., D.E. Crowley and J.A. Menge. 2001. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. FEMS Microbiol. Ecol. 35: 129–136.
- Yasmin, F., R. Othman, M.S. Saad and K. Sijam. 2007. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. Biotechnology. 6: 49–52.
- Yehuda, Z., M. Shenker, V. Ramheld, H. Marschner, Y. Hadar and Y. Chen. 1996. The role of ligand exchange in uptake of iron from microbial siderophores by graminaceous plants. Plant Physiol. 112: 1273–1280.
- Zhao, Y., S.K. Christensen, C. Frankhauser, J. Cashman, J.D. Cohen, D. Weigel and J. Chory. 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science. 291: 306-309.
- Zhu, J., J.W. Beaver, M.I. Mor, C. Fuqua, A. Eberhard, and S.C. Winans. 1998. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 180: 5398–5405.

ภาคผนวก

การแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียผลิตซิเดอรอฟอร์

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SIDEROPHORE-PRODUCING BACTERIA

หทัยรัตน์ แดงเจริญ¹, กรรณิการ์ สัจจาพันธ์¹, เพชรดา เจริญมิตร¹, ศิริลักษณ์ จิตรอักษร²

Hatairat Dangjarean¹, Kannika Sajjaphan¹, Pechrada Jareonmit¹, Siriluck Jitaksorn²

¹Department of Soil Science, Faculty of Agriculture and Center for Advanced Studies in Agriculture and Food, KU Institute for Advanced Studies, Kasetsart University, 50 Phahon Yothin Rd., Cha-tuchak, Bangkok 10900, Thailand.

²Department of Agriculture, 50 Phahon Yothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.
e-mail: agrkks@ku.ac.th

บทคัดย่อ: พบแบคทีเรีย 110 ไอโซเลต จากดินบริเวณรอบๆ รากของผักชนิดต่างๆ (บรอกโคลี, คอส, มะเขือเทศ, ปวยเล้ง และ บัตเตอร์เฮด) โดยใช้อาหาร King B ในการคัดแยก การวิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient จากข้อมูลการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้ในการเจริญได้ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียได้เป็น 6 กลุ่มที่ระดับความเหมือนสูงสุด 65% เมื่อนำแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนจำนวน 60 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการผลิตซิเดอรอฟอร์ การผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน และการละลายฟอสเฟต พบว่า จำนวน 22 ไอโซเลต (36%) มีความสามารถในการผลิตซิเดอรอฟอร์ จำนวน 53 ไอโซเลต (88%) มีความสามารถในการผลิตออกซิน และจำนวน 14 ไอโซเลต (23%) มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลตมีความสามารถในการผลิตซิเดอรอฟอร์ ออกซิน และละลายฟอสเฟต

Abstract: A total of 110 bacterial isolates were obtained from the rhizosphere of different varieties of vegetables (broccoli, cos, tomato, spinach and butter head) by using King B medium. UPGMA analysis using simple matching binary coefficient of antibiotic resistance patterns and carbon source utilization and morphology indicated that the bacterial isolates could be categorized into 6 clusters with a maximum similarity value of 65%. Sixty of 110 isolates were also screened for their siderophore producing ability, indole-acetic acid (IAA) producing ability and phosphate solubilizing ability. The results revealed that 22 isolates (36%) could produce siderophore, 53 isolates (88%) could produce IAA and 14 isolates (23%) could able to solubilize tricalcium phosphate. Moreover, there were 14 isolates which had ability to produce siderophore, auxin and solubilize tricalcium phosphate.

Introduction: Iron is an essential trace element for almost all living microorganisms, plants and animals hence, shortage of this element could limit primary productivity.¹ Despite the abundance of iron in the earth's crust, most of the iron is not readily available for living organisms due to its solubility (solubility of $\text{Fe}(\text{OH})_3 = 10^{-39} \text{ M}$).^{2,3} For this reason, microorganisms, fungi and plants have evolved different strategies to scavenge and to absorb iron from soil. One of the most common strategies for iron acquisition is siderophore production.

Siderophores are low molecular weight extracellular organic compounds⁴ produced by bacteria and fungi growing under low iron stress. They are chelating agents and ferric ion specific. Bacteria of the genus *Pseudomonas* represent one subgroup that is capable to produce siderophores and play important roles in using this substance in probing for iron in the agricultural ecosystems. In addition, some rhizobacteria also exhibit plant growth-promoting properties and disease suppression in plants.⁵ Rhizobacteria can stimulate growth by one or a combination of mechanisms including siderophore production, phosphate-solubilization and plant growth hormones production including the production of IAA, gibberellins and ACC deaminase. Rhizobacteria can also stimulate growth of plants through indirect mechanisms including the suppression of phytopathogens through the release of HCN and antibiotics.⁶ This study is aimed to isolate and to characterize siderophore-producing rhizobacteria from the rhizosphere of vegetables as well as to determine their abilities in producing plant growth promotion factors e.g. IAA and solubilizing tricalcium phosphate.

Methodology:

Soil sample collection and isolation of siderophore producing bacteria

Soil samples were collected from the rhizosphere of vegetables (broccoli, cos, tomato, spinach and butter head) from organic farming. Soil samples were serially diluted in saline solution (0.85% (w/v) NaCl) and plated on the King B medium.⁷ Colonies were picked and further purified by re-streaking. Pure cultures were stored at -20 °C in 25% glycerol.

Identification and characterization of the bacterial isolates

Microscopic examination

A pure culture of isolates was grown in King B agar for 48 h at 30°C. One drop of culture was subjected to a Gram stain and placed on a glass microscopic slide for cell morphology determination by using bright field illumination and an Olympus optical microscope equipped with a 100X objective.

Determination of physiological characteristics

The resistance profiles of 110 bacteria isolates were determined for each of the isolates. Strains were grown in King B broth containing antibiotics at 30°C for 48 hr. The four antibiotics tested were chloramphenicol (5, 15, 25, 30 mg/l), kanamycin (5, 10, 15, 20 mg/l), streptomycin (5, 10, 15, 20 mg/l) and tetracycline (at 5, 10, 15, 20 mg/l). These 110 isolates were also examined for carbon source utilization, malic acid, glucose, mannitol, glycerol, ascorbic acid, sucrose, citric acid and sorbitol. Isolates were categorized as being resistant or sensitive to each concentration of antibiotic or use source of carbon, and assigned a value of 1 or 0, respectively. The antibiotic resistance and carbon source utilization profiles of 110 isolates were used for dendrogram analyses. The UPGMA (Unweighted Pair Group Mathematical Average) algorithm was used to perform hierarchical cluster analysis.

Plant growth promoting activity

Determination of siderophore production

Siderophore production of these bacterial isolates were detected through the formation of orange halos surrounding the bacterial colonies cultured on the Chrome Azurol S (CAS) agar plates after incubation at 30°C for 48 h. CAS agar plates were prepared according to the procedure described by Alexander and Zuberer (1991).⁸

Quantitative assay of the siderophore production was carried out using CAS broth. 250 µl of bacterial culture ($OD_{600}=1$) was inoculated in 5 ml of CAS broth and incubate at 30°C for 48 h in the incubator shaker at the speed of 180 rpm. The bacterial cells were removed from the culture medium through centrifugation at 10,000xg for 5 min, and 0.5 ml of supernatant was added to 0.5 ml of CAS indicator solution. This mixture was incubated at room temperature for 30 minutes before determining the absorbance of the mixture at 630 nm. CAS broth processed through the same procedure and under the same conditions but without inoculation with the bacteria was used as controls. Siderophore content in the solution can be calculated as described by Payne (1994).⁹

IAA production

All bacterial isolates were cultured in King B broth supplemented with 5 mM L-tryptophan at 30°C for 48 h. The bacterial cells were removed from the culture medium using centrifugation at 10,000xg for 5 min. One ml of the supernatant was mixed vigorously with 1.5 ml of Salkowski's reagent (15 ml 0.5 M $FeCl_3$, 300 ml conc. H_2SO_4 and 500 ml H_2O).¹⁰ Incubate this mixture at room temperature for 30 min before determining the absorbance of the solution at 535 nm.¹¹ The concentration of IAA was determined by comparing with the standard curve processed using the same procedure and conditions. The amount of IAA produced was expressed as µg/ml.

Determination of tricalcium phosphate solubilizing ability

Ability to solubilize tricalcium phosphate of each bacterial isolate was determined through the formation of transparent halos surrounding bacterial colonies on the National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) agar medium¹². This medium contains 5 g of $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 g of $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0.2 g of KCl, 0.1 g of $(NH_4)_2SO_4$, 5 g of $Ca_3(PO_4)_2$ and 10 g of glucose. The medium should show the halos after inoculation at 30°C for 48 h.

Quantitative determination of tricalcium phosphate solubilizing was carried out in NBRIP broth. 250 µl of bacterial culture ($OD_{600}=1$) was inoculated in 5 ml of NBRIP broth and incubated at 30°C for 48 h in an incubator shaker shaking at 180 rpm. The phosphorus content in culture was determined by the vanado-molybdate method.¹³ Bacterial cells were removed from the culture medium through centrifugation at 10,000xg for 5 min. 3.5 ml of supernatant were added with 1 ml of vanado-molybdate indicator solution. The autoclaved broth without inoculation with the bacteria but was processed using the same procedure and conditions used as the control. The amount of phosphate solubilizing is expressed as µg/ml in comparison with the control.

Results, Discussion and Conclusion:

Isolation of siderophore producing bacteria

Total of 110 bacterial isolates were obtained from different vegetable rhizospheric soils. 14, 9, 26, 26 and 35 isolates were obtained from broccoli, cos, tomato, spinach and butter head respectively. The numbers of bacteria found from each plant indicated that the bacteria populations associated with plants species, plant root exudates excreting by different plants were known to cause differentiation among populations of bacteria.¹⁴

Identification and characterization of the bacterial isolates

Most of bacterial cells were rod shapes. All of the isolates were Gram-negative bacteria. The 110 isolates were determined resistance profile of four antibiotics; bacteria were resistant to four antibiotics in different concentrations (data not shown). Approximately fifty percent of isolates was able to grow on malic acid, glucose, mannitol, glycerol, ascorbic acid, sucrose, citric acid and sorbitol. These isolates were resistant to, kanamycin, streptomycin, tetracycline at 20 mg/l and chloramphenicol at 30 mg/l. The remaining isolates vary in capable of antibiotic resistance and use of carbon sources. To determine the relatedness of bacteria, a dendrogram based on resistance profile data, carbon source utilization and morphology was constructed using the UPGMA (Unweighted Pair Group Mathematical Average) algorithm. While most of bacteria had close similarity values based on antibiotic resistance, carbon source utilization and morphology, they could be arranged into 6 clusters with a similarity range of 65% as shown in Figure1.



Figure 1. Dendrogram analysis of 110 bacterial isolates showing the relatedness of these bacteria. The dendrogram was generated from carbon source utilization, antibiotic resistance, Gram stain reaction and morphology

Production of siderophore and other plant growth promoting activity

In investigating the siderophore producing ability of 60 isolates, we found 22 of these isolates (36%) produced orange halo zones against a dark blue background, indicating siderophore producing ability. At the same time, 53 isolate (88%) was found to be able to produce IAA with color changes in the Salkowski assay. For tricalcium phosphate-solubilizing ability, 14 isolate (23%) of bacteria showed clear halos on the NBIRP agar plates with different sizes. Total of 14 bacterial isolates with all siderophore and IAA production and phosphate-solubilization abilities were selected for quantitative test.

It was found that siderophore production ranged between 36-85%. Isolate Co18 and Bu 95 showed maximum siderophore production about 85% (Table 1). The isolates exhibited with varying levels of siderophore production, irrespective of plants species. IAA, a member of the group of phytohormones, is generally considered to be the most important native auxin. IAA is a major mechanism of plant growth promotion this has important implication for the development. In this study, IAA-production ranged between 1.38 - 6.36 $\mu\text{g/ml}$ (Table 1). Isolate To27 showed maximum IAA production at 6.36 $\mu\text{g/ml}$. It has been reported that IAA production by rhizobacteria can vary among different species and strains, and it is also influenced by culture condition, growth stage and substrate availability.¹⁵ Phosphorus is one of the major nutrients, second only to nitrogen in requirement for plants. Most of phosphorus in soil is present in the form of insoluble phosphates and cannot be utilized by the plants.¹⁶ The ability of bacteria to solubilize tricalcium phosphate has been of interest to soil microbiologists as it can enhance the availability of phosphorus for plant growth. In our experiments, phosphate solubilizing ability ranged between 205.69 – 517.63 $\mu\text{g/ml}$ (Table 1). Isolates To27 showed maximum production at 517.63 $\mu\text{g/ml}$. It seems to be that the bacterial isolates were able to solubilize tricalcium phosphate also produce high siderophore. This may be related with the fact that phosphate solubilizing organic acids secreted by bacteria also have siderophore like functions¹⁷ and they are released in response to iron stress.^{18,19}

Table 1. Quantity of siderophore production, IAA production and phosphate solubilizing ability by each of the bacterial isolates.

Isolate	Siderophore production (%)	IAA production (µg/ml)	Phosphate solubilizing ability (µg/ml)
Br1	47.10	4.12	385.59
Br4	43.87	5.00	345.64
Br9	51.61	3.54	329.83
Co18	85.81	3.32	314.85
Co23	58.06	3.72	352.58
To27	61.29	6.36	517.63
To34	45.16	4.45	383.65
Sp60	37.42	5.04	371.44
Sp61	63.87	4.05	360.62
Sp76	36.77	1.38	339.82
Bu84	60.65	5.33	328.44
Bu95	85.81	2.62	299.31
Bu98	25.16	5.26	205.69
Bu110	26.45	5.30	368.12

References:

1. Nair, A.; Juwarkar, A.A.; Singh, S.K. Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* **2007**, *180*, 199–212.
2. Martin, J.H.; Gordon R.M. Northeast Pacific iron distribution in relation to phytoplankton productivity. *Deep Sea Research.* **1988**, *35*, 177.
3. Fox, L.L. The solubility of colloidal ferric hydroxide and its relevance to iron concentration in river water. *Geochim.Cosmochim. Acta.* **1988**, *52*, 771.
4. Hider, R.C.; Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
5. O’Sullivan, D. J.; O’Gara, F. Traits of fluorescent pseudomonas spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 662–676.
6. Glick, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **1995**, *41*, 109–117.
7. King, E.O.; Ward, M.K.; Raney, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J of Laboratory and Clinical Medicine* **1954**, *44*, 301–307.
8. Alexander, D.B.; Zuberer, D.A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils.* **1991**, *2*, 39-45.
9. Payne, S.M. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.* **1994**, *235*, 329.

10. Sarwar, M.; Arshad, D.A.; Martens, W.T.; Frankenberger, J.R. Tryptophan dependent biosynthesis of auxins in soil. *Plant and Soil*. **1992**, *147*, 207-215.
11. Benizri, E.; Courtade, A.; Picard, C.; Guckert, A. Tryptophan dependent biosynthesis of auxins in soil. *Soil Biol Biochem*. **1998**, *30*, 1481–1484.
12. Nautiyal, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening of phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. **1999**, *170*, 265–270
13. Jackson, M.L. Determination of phosphorus concentration in hydroponics solution. *Soil chemical analysis*. **1973**.
14. Rajni, V.; Ajit S. N.; Sanjay K.; Ramdeen P.; Shanmugam V. Influence of soil reaction on diversity and antifungal activity of fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres. *Bioresource Technology*. **2007**, *98*, 1346–1352.
15. Mirza, MS.; Ahmad, W.; Latif, F.; Haurat, J.; Bally, R.; Normand, P.; Malik, K.A. Isolation, partial characterization, and effect of plant growth promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil*. **2001**, *237*, 47-54.
16. Pradhan, N.; Sukla, L.B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol*. **2006**, *5*, 850-854.
17. Vassilev, N.; Vassileva, M.; Nikolaeva, I. Simultaneous p-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2006**, *71*, 137–144.
18. Guerinot, M.L.; Meidl, E.J.; Plessner, O. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol*. **1990**, *172*, 3298–3303.
19. Machuca, A.; Napoleao, D.; Milagres, A.M.F. Detection of metal-chelating compounds from wood-rotting fungi *Trametes versicolor* and *Wolfiporia cocos*. *World J Microbiol Biotechnol*. **2001**, *17*, 687–690.

Acknowledgements: This work was supported, in part, by Center for Advanced Studies in Agriculture and Food, KU Institute for Advanced Studies, Kasetsart University and Commission on Higher Education and a grant from the Kasetsart University Research and Development Institute, Kasetsart University. We would like to thank Professor Michael J. Sadowsky and John Ferguson for dendrogram analysis and suggestions.

Keywords: Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), Siderophore, Phosphate solubilization, Phytohormones, Iron