

## บรรณานุกรม

- กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ “เทคโนโลยีภูมิปัญญาท้องถิ่น” ชุมนุมสหกรณ์  
การเกษตรแห่งประเทศไทย ตุลาคม 2544. ISBN :974-436-099-2
- พงษ์เดช ภิรมย์อยู่ และคณะ (2553). การใช้ *Bacillus subtilis* เพื่อการผลิตเม็ดพันธุ์ข้าวโพดฝัก  
อ่อน. วารสารแก่นเกษตร. 38(2):155-162.
- Bai, Y., Pan, B., Charles, T. C. and Smoth, D. L. (2002). Co-inoculation dose and root  
zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean  
[*Glycine max* (L.) Merr] grown in soil-less media. *Soil Biology&Biochemistry*.  
34:1953-1957.
- Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. J.J. (2001). Molecular basis of plant growth  
promotion and biotecontrol by rhizobacteria. *Curr. Opi. In Plant Bio.* 4 : 343-  
350.
- Glick, B. R., Patten , C. L., Holguin, G. and Penrose, D. M. (1999). Biochemical and  
Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial  
College Press. Waterloo, Ontario, Canada.
- Jetiyanon , K. and Kloepper, J. W. (2002). Mixtures of plant growth-promoting  
rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant  
diseases. *Biological Control*. 24:285-291.
- Kurek, E. and Jaroszuk-Scisel, J. (2003) Rye (*Secale cereale*) growth promotion by  
*Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium*  
*culmorum* under various soil conditions. *Biological Control*. 26:48-56.
- Piromyou, P et. al., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)  
inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn  
cultivated in Thailand. *Eu. J. of Soil. Biol.* 47:44-54.
- Probanaza , A., Lucas Garcia , J. A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B., Gutierrez Manero, F.  
J. (2002). *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure  
after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B.*  
*pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology*. 20:75-84.
- Ramos, B., Lucas Garcia , J. A., Probanza , A., Barrientos, M. L., and Guterrez Manero,  
F. J. (2002). Alterations in the rhizobacterial community associated with

European alder growth when inoculated with PGPR strain *Bacillus licheniformis*. *Environmental and Experimental Botany*. 49:61-68.

von der Weid, I., Paiva, E., Nobrega, A., van Elsas, J. D. and Seldin, L. (2000). *Res. Microbiol.* 151:369-381.

## การใช้ *Bacillus subtilis* เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน

### Application of *Bacillus subtilis* for baby corn seed production

พงษ์เดช ภิรมย์อยู่<sup>1</sup>, อาภากร หล่องทองหลาง<sup>2</sup>, สมพร ชุนห์ลือชานนท์<sup>3</sup>, พรรณดา ติตะบุตร<sup>1</sup>,  
โสภณ วงศ์แก้ว<sup>2</sup>, นันทกร บุญเกิด<sup>1</sup>, หนึ่ง เตียอำรุง<sup>1\*</sup>

Pongdet Piromyou<sup>1</sup>, Aphakorn Longtonglang<sup>2</sup>, Somporn Chunleuchanon<sup>3</sup>,

Panlada Tittabutr<sup>1</sup> Sopone Wongkaew<sup>2</sup>, Nantakorn Boonkerd<sup>1</sup>, Neung Teaumroong<sup>1\*</sup>

**บทคัดย่อ:** การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหา Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์แปซิฟิก 283 โดยดำเนินการแยกเชื้อ แบคทีเรีย จากตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวโพดในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ สระบุรี และนครราชสีมา แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานในการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแบคทีเรียจำนวน 153 ไอโซเลต มีความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช (Indole-3-acetic acid: IAA) จำนวน 16 ไอโซเลต ได้คัดเลือกเชื้อ 6 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญของรากข้าวโพดมา คือ ทดสอบในระดับกระถาง พบว่า ได้ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดสูงสุด คือ ไอโซเลต SUT2 และ SUT3 เมื่อนำไปทดลองในระดับแปลงที่มีการจัดการวิธีใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมี โดยลดอัตราส่วนปุ๋ยเคมีลง 25% และ 50% จากอัตราส่วนแนะนำ พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ลดอัตราส่วนลง มีแนวโน้มทำให้ต้นข้าวโพดมีการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำเพียงอย่างเดียว การจำแนกชนิดของไอโซเลต SUT3 โดยใช้การอ่านลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus subtilis*

**คำสำคัญ:** PGPR, ข้าวโพดฝักอ่อน, ปุ๋ยเคมี

**ABSTRACT:** The objective of this study was to select highly effective Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for maize (Pacific 283) cultivation. The PGPR were isolated from maize rhizosphere from Chiang Mai, Lampang, Nakhon Sawan, Saraburi and Nakhon Ratchasima provinces. From 153 isolates, the isolates SUT2 and SUT3 showed the highest plant growth promotion from pot experiments. The true isolates selected for further study in the field experiment were mixed with the 25% and 50% reduction from the recommended chemical fertilizer rate. The results showed that the plant yield and biomass reduced amount of chemical fertilizer mixing with isolate SUT3 of was not significantly different from these of recommended chemical fertilizer rate. In addition, the isolate SUT3 was identified as one closely related to *Bacillus subtilis* sp., and there was reasonable evidence to show this isolate SUT3 could reduce the amount of chemical fertilizer used in maize field.

**Keywords:** PGPR, Baby Corn, Chemical fertilizer

<sup>1</sup> สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000.

School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000.

<sup>2</sup> สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000.

School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000.

<sup>3</sup> สาขาวิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษ์ศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

Department of Soil Science and Conservation, Faculty of Agriculture, Chiangmai University, Chiangmai, 50200.

\* Corresponding author: neung@sut.ac.th

## บทนำ

ในปัจจุบันจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในระบบการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของแบคทีเรียที่เรียกว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ได้มีการศึกษาจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้อย่างกว้างขวาง เพราะมีคุณสมบัติที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การเป็นปุ๋ยชีวภาพ (Biofertilizers) ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การผลิตฮอร์โมนพืช ได้แก่ IAA (Indole-3-acetic acid) และคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ระบบรากพืช การประยุกต์ใช้ PGPR ในระบบเกษตรในรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่อง เพราะสามารถใช้ทดแทน หรือลดการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคพืช โดยเฉพาะกับระบบเกษตรอินทรีย์ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ PGPR ทั้งในทวีปยุโรป และสหรัฐอเมริกาอย่างกว้างขวาง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2548)

ข้าวโพดฝักอ่อนนั้นจัดเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศไทย มูลค่าการส่งออกมากกว่า 1,500 ล้านบาทต่อปี พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ภาคเหนือตอนล่าง และภาคกลาง ปุ๋ยเคมีที่ใช้ในการเพาะปลูก ได้แก่ปุ๋ยสูตร 46-0-0, 15-15-15 และ 16-20-0 การใช้สารเคมี หรือปุ๋ยเคมีมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในดิน น้ำ ห่วงโซ่อาหาร และสุขภาพของมนุษย์เอง หากสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมี โดยนำแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR มาใช้ร่วม น่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชได้ มีรายงานว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* บางสายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตในข้าวโพดอาหารสัตว์ได้ (Baby et al, 2006) และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีความสามารถป้องกันระบบรากของข้าวโพดอาหารสัตว์จากเชื้อราก่อโรค เช่น *Fusarium* และ *Rhizoctonia* เป็นต้น ดังนั้น การใช้แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR จึงเป็นอีกทางเลือกที่ดีสำหรับใช้เป็นปัจจัยการผลิตข้าวโพดฝักอ่อน

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็น PGPR ที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถลดอัตราการใช้ปุ๋ยเคมี โดยมีประสิทธิภาพในส่งเสริมการเจริญเติบโต และผลผลิตของข้าวโพดได้เทียบเท่า หรือดีกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีในอัตราปกติ

## วิธีการศึกษา

### การรวบรวมสายพันธุ์ PGPR

ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวโพดในแปลงข้าวโพดฝักอ่อนในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ สระบุรี และนครราชสีมา เพื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย ตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 90 มล. แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 15 นาที จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่  $10^4$  ถึง  $10^7$  ดูดสารละลายดังกล่าว 0.2 มล. แล้วเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งอาหารไนโตรเจน สูตร LG และ NFB medium (Meunchang et al, 2005) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3 วัน เก็บรวบรวมแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่ต่างกัน เพื่อการทดลองต่อไป

### การทดสอบประสิทธิภาพการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่เติม Tryptophan 2 กรัมต่อลิตร บ่มที่ 28 °ซ เขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์จากสารละลายนำส่วนใส 1 มล. ไปวิเคราะห์ปริมาณ IAA โดยเติมสารละลาย Salkowsky reagent (0.01 M FeCl<sub>2</sub> ใน HClO<sub>4</sub>) 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที โดยทำเช่นเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่ไม่ใส่เชื้อลงไปและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน IAA บริสุทธิ์ (Costacurta et al, 1998)



**การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน**

ทดสอบหาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay (ARA) (Hardy et al., 1968) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ไม่เติมแหล่งอาหารไนโตรเจนปริมาตร 7 มล. ในหลอดขนาด 21 มล. บ่มที่ 28 °ซ เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นแทนที่อากาศในหลอดด้วยก๊าซ อะเซทิลีนในปริมาตรร้อยละ 10 ของปริมาตรอากาศ (Head space) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 °ซ) เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจวัดปริมาณเอธิลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gas Chromatography ที่มี Flame Ionization detector และ PE-Alumina column ขนาด 50 ม. x 0.03 มม. x 0.25 ไมโครเมตร (Perkin Elmer, USA) จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวมาย่อยด้วยสารละลาย 10% SDS และทำให้เซลล์แตก ด้วยเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Ultrasonic Processor) รุ่น GE100-watt (Sonics and Material Inc.) เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry et al. (1951) และเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสกับปริมาณเอธิลีนบริสุทธ์

**การทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคพืช**

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 สายพันธุ์ คือ *Rhizoctonia solani*, *Verticillium sp.*, *Didymella sp.*, *Fusarium oxysporum* และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 1 สายพันธุ์ คือ *Ralstonia solanaceae* โดยเลี้ยงเชื้อราก่อโรคดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato dextrose agar: PDA) ให้เชื้อราอยู่ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน โดยใช้ก้านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มเชื้อเกลี่ยให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อไอโซเลต SUT3 ที่เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3 วัน หยดลงในจานเลี้ยงเชื้อให้ห่างจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช 2 ซม. และตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อในส่วนของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช บ่มไว้จนกว่าเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียจะเจริญบนที่กข้อมูลเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Clear zone) (Lawongsa et al, 2008)

**การทดสอบอิทธิพลของแบคทีเรียต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพด**

ทำผิวเมล็ดข้าวโพดสายพันธุ์แปซิฟิก 283 จำนวน 100 เมล็ด ให้ปลอดเชื้อ โดยล้างด้วยเอทานอล 95% เวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง แล้วแช่ใน 2% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5-6 ครั้ง นำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเพาะในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษเพาะเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อเช่นกัน ใส่เชื้อแบคทีเรีย PGPR จำนวน 10<sup>6</sup> เซลล์ต่อเมล็ด นำไปวางไว้ที่มืด 6 วัน ตรวจสอบการงอกของเมล็ด และวัดความยาวของราก

**การทดสอบผลของเชื้อ PGPR ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในระดับกระถาง**

นำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด 6 ไอโซเลตจากการทดลองในข้อ 5 มาทดสอบกับข้าวโพดพันธุ์แปซิฟิก 283 ในกระถางที่มีดิน 10 กก. (pH 6.84, % อินทรีย์วัตถุ (OM) 1.87, ไนโตรเจนรวม (Total N) 0.28%, ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) 631.33 ppm และ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K; 358.83 ppm) วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) 4 ซ้ำ มี 10 กรรมวิธี ได้แก่ Control 1 คือ กรรมวิธีไม่ปลูกเชื้อ, Control 2 คือ ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ, CF คือ กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีในอัตราส่วนแนะนำ โดยใช้ปุ๋ยผสมอัตรา 10-10-5 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) กก.ต่อไร่, MI คือ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อร่วมกันทุกไอโซเลต และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแต่ละไอโซเลต คือ SUT1, SUT2, SUT3, SUT4, SUT5 และ SUT6 ใส่เชื้อในอัตรา 10<sup>6</sup> เซลล์ต่อเมล็ด

**การทดสอบผลของเชื้อ PGPR ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในระดับแปลงทดลอง**

คัดเลือกกรรมวิธีในกระถางซึ่งมีแนวโน้มทำให้ข้าวโพดเจริญเติบโตได้ดี นำมาใช้ทดลองในสภาพแปลงทดลอง ได้แก่กรรมวิธีที่มีการใช้แบคทีเรียไอโซเลต SUT2, SUT3 และเชื้อผสมระหว่าง SUT2 และ SUT3 โดยใช้ผงพีทเป็นวัสดุพาหะ (carrier) มีปริมาณเชื้อ 1.5x10<sup>8</sup>

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ห้องสมุดงานวิจัย  
วันที่..... 05 ต.ค. 2555 .....  
เลขทะเบียน..... 249199 .....  
เลขเรียกหนังสือ.....

เซลล์ต่อกรัมพืช โดยใช้ในปริมาณ 350 กรัมต่อไร่ (มีแบคทีเรีย PGPR ต่อเมล็ด ประมาณ  $10^6$  เซลล์) ปลูกร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมี แต่ลดการใช้ปุ๋ยเคมีลง 25% และ 50% โดยใช้ปุ๋ยผสมอัตรา 10-10-5 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) 30 กก.ต่อไร่ แบ่งใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง คือ ไร่ก่อนปลูกและใส่ครั้งที่ 2 เมื่อข้าวโพดอายุได้ 30 วัน และขนาดแปลงทดลองแต่ละตำรับคือ 5x5 ตรม. วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) โดยทำการทดลองที่จังหวัดเชียงใหม่

#### การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต SUT3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LG ที่ 28 °ซ เวลา 2 วัน จากนั้นนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี (Microgen™ Bacillus-ID System) สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลตดังกล่าว (Lawongsa et al., 2008) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้ FD1 (5' CCG AAT TCG TCG ACA AC GAG TTT GAT C-CT GGC TCA G \*3) และ RP2 (5' CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGC TAC CTT GT-T ACG ACT T \*3) (Weisburg et al., 1991) และตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยวิธี Electrophoresis ใน 1% w/v agarose gel แล้วย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอดังกล่าว (Macrogen, Korea) ด้วย Big Dye terminator cycle sequencing Kit (Applied BioSystems, USA) และเครื่องรุ่น 3730XL automated DNA sequencing system (Applied BioSystems, USA) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล (GenBank) ด้วยโปรแกรม BlastN 2.0.13

#### ผลการศึกษาและวิจารณ์

##### การรวบรวมและทดสอบประสิทธิภาพของ PGPR ในการสังเคราะห์ IAA และการตรึงไนโตรเจน

การแยกเชื้อจากดินบริเวณรากข้าวโพดในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ สระบุรี และนครราชสีมา ได้เชื้อ 153 ไอโซเลต และเมื่อนำมาทดสอบความ

สามารถของเชื้อแบคทีเรียในการสังเคราะห์ IAA พบว่าจากแบคทีเรียจำนวน 153 ไอโซเลต มีเพียง 16 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต IAA ระหว่าง 7.00-3,985.58 ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงสุดคือ SUT1 รองลงมาคือ SUT2 ซึ่งผลิต 3,985.58 และ 1,143.12 ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่วิเคราะห์โดยวิธี ARA อยู่ในช่วง 28-360.49 นาโนโมลอะซีตีสต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง โดยเชื้อไอโซเลต SUT7 ตรึงไนโตรเจนได้มากที่สุดคือ 360.49 นาโนโมลอะซีตีสต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การศึกษาค้างนี้ไม่ได้มุ่งเน้นไอโซเลตที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน เพราะกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่อย่างอิสระสามารถให้ธาตุอาหารไนโตรเจนแก่พืชได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับพืชแบบ symbiosis เช่น กลุ่มไรโซเบียม ดังนั้นในการคัดเลือกขั้นต้น จึงใช้เกณฑ์ของการสร้าง IAA เป็นเกณฑ์แรก

##### ผลของเชื้อ PGPR ต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพด

จากการนำ PGPR 16 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ PGPR ต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพด พบว่า เชื้อมีผลทำให้ความยาวส่วนรากและส่วนลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) โดยการปลูกเชื้อไอโซเลต SUT3 และ SUT4 ทำให้ข้าวโพดมีความยาวส่วนรากมากที่สุด (11.23 และ 10.52 เซนติเมตร ตามลำดับ) รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต SUT2 และ SUT5 (8.56 และ 8.43 เซนติเมตร ตามลำดับ) ส่วนไอโซเลต SUT4 ทำให้ออดข้าวโพดยาวที่สุด (3.81 ซม.) รองลงมาคือ SUT3 และ SUT6 (2.72 และ 2.69 ซม. ตามลำดับ) ไอโซเลต SUT3 สามารถส่งเสริมความยาวรากข้าวโพดได้มากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสังเคราะห์ IAA พบว่า ไอโซเลต SUT3 สามารถผลิต IAA ได้ 21 ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลต SUT1 และ SUT2 โดยความเข้มข้นของ IAA ส่งผลต่อการเจริญของรากข้าวโพดได้ดีที่สุดที่ 10 ไมโครโมลาร์

และเมื่อความเข้มข้นที่สูงกว่า 10 มิลลิโมลาร์จะเริ่มยับยั้งการเจริญของรากข้าวโพด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Elosra et al. (2004) แต่อย่างไรก็ตามการทดลองนี้พบว่าไอโซเลต SUT2 สามารถส่งผลต่อการเจริญของรากข้าวโพดรองลงมาจาก SUT3 ทั้งที่ผลิต IAA สูงกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญของรากข้าวโพดมาก อาจเป็นไปได้ว่า IAA ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญเพียงปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการงอกและการยืดยาวออกของรากข้าวโพด

**ผลของเชื้อ PGPR ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในระดับกระถาง**

เมื่อปลูกเชื้อ PGPR กับข้าวโพดในระดับกระถางพบว่า ต้นข้าวโพดมีความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) การเจริญของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR (Control 1) ที่ 30 วัน และการเจริญของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR แต่มีการให้เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ LG ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ (Control 2) พบว่ามีความสูงเท่ากันคือ 27.5 ซม. ในส่วนของกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT4 และเชื้อผสม (MI) ทำให้ต้นข้าวโพดมีความสูงมากที่สุด

เท่ากับ 32.25 ซม. รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT2, SUT3, SUT6 และการใส่ปุ๋ยเคมี ส่วนกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT1 และไม่ใส่เชื้อ (Control 1 และ Control 2) ต้นข้าวโพดมีความสูงน้อยที่สุด และเมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวโพดเมื่ออายุ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ใส่เชื้อทำให้ความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) กล่าวคือ ต้นข้าวโพดจากกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อผสมให้ความสูงมากที่สุด คือ 118.50 ซม. รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT2 ส่วนการที่ใส่เชื้อ SUT3, SUT4, SUT5 และ SUT6 ต้นข้าวโพดมีความสูงไม่ต่างจากปุ๋ยเคมีสูตรแนะนำ (Table 1) ในส่วนของการผสมน้ำหมักต้น พบว่าต้นข้าวโพดในทุกกรรมวิธีมีน้ำหนักส่วนเหนือดินทั้งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นในส่วนของราก โดยกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT3 มีน้ำหนักสดรากสูงที่สุด รองลงมาคือการใส่ปุ๋ยเคมี ส่วนกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT1, SUT2, SUT5 และ SUT6 มีน้ำหนักรากสดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่เชื้อผสมมีน้ำหนักรากสดต่ำสุด แต่มีค่ามากกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อ (Control 1 และ Control 2) ในส่วนน้ำหนักแห้งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับน้ำหนักสด (Table 1)

**Table 1** Effect of PGPR inoculation on shoot length and plant weight in pot experiment.

Treatment	Shoot length (cm)		Shoot/Root weight					
	30 days	90 days	Aerial part fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Biomass fresh weight (g)	Aerial part dry weight (g)	Root dry weight (g)	Biomass Dry weight (g)
Control 1	27.50 <sup>c</sup>	90.00 <sup>1</sup>	500.00	156.75 <sup>1</sup>	656.75 <sup>c</sup>	92.38	20.64 <sup>c</sup>	113.04 <sup>c</sup>
Control 2	27.50 <sup>c</sup>	90.25 <sup>1</sup>	540.00	182.5 <sup>1a</sup>	722.50 <sup>bc</sup>	94.34	37.81 <sup>bc</sup>	132.15 <sup>abc</sup>
SUT1	28.75 <sup>bc</sup>	97.75 <sup>1a</sup>	612.00	277.5 <sup>abc</sup>	890.00 <sup>ab</sup>	103.48	36.81 <sup>bc</sup>	140.28 <sup>ab</sup>
SUT2	31.50 <sup>ab</sup>	116.50 <sup>1a</sup>	625.00	245.0 <sup>abc</sup>	870.00 <sup>ab</sup>	110.27	36.40 <sup>bc</sup>	146.67 <sup>ab</sup>
SUT3	31.00 <sup>ab</sup>	106.00 <sup>1bc</sup>	650.00	310.0 <sup>a</sup>	960.00 <sup>a</sup>	105.57	54.36 <sup>a</sup>	159.92 <sup>a</sup>
SUT4	32.25 <sup>a</sup>	107.50 <sup>1bc</sup>	550.00	167.5 <sup>a</sup>	717.50 <sup>bc</sup>	103.37	27.65 <sup>bc</sup>	131.01 <sup>abc</sup>
SUT5	29.25 <sup>abc</sup>	99.00 <sup>1bc</sup>	527.50	212.5 <sup>abcd</sup>	740.00 <sup>bc</sup>	96.99	28.66 <sup>bc</sup>	125.65 <sup>bc</sup>
SUT6	30.75 <sup>ab</sup>	99.75 <sup>1bc</sup>	587.50	252.5 <sup>abcd</sup>	840.00 <sup>abc</sup>	103.07	35.37 <sup>bc</sup>	138.43 <sup>abc</sup>
MI	32.25 <sup>a</sup>	118.50 <sup>1</sup>	583.25	190.0 <sup>1a</sup>	773.25 <sup>abc</sup>	113.60	33.47 <sup>bc</sup>	147.04 <sup>ab</sup>
100%CF	31.50 <sup>ab</sup>	108.50 <sup>1bc</sup>	600.00	290.0 <sup>ab</sup>	890.00 <sup>ab</sup>	115.12	39.41 <sup>ab</sup>	154.54 <sup>ab</sup>
F-test	**	*	ns	**	*	ns	*	*
C.V. (%)	6.72	11.78	13.15	26.02	14.93	12.98	30.17	13.42

<sup>a,b,c</sup> Mean values within a column followed by different letters were significantly different according to DMRT,  $P \leq 0.05$

(\*),  $P \leq 0.01$  (\*\*), ns = non significant, Control1 = uninoculated, MI = mixed strains and, CF = chemical fertilizer

### ผลของเชื้อ PGPR ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในแปลงทดลอง

การปลูกเชื้อ PGPR ไอโซเลต SUT2, SUT3 และเชื้อผสม (MI) ร่วมกับปุ๋ยเคมีในอัตราต่างๆ ในแปลงทดลอง ระหว่างฤดูแล้ง และฤดูฝน (มกราคม-มิถุนายน และกรกฎาคม-พฤศจิกายน 2550 ตามลำดับ) (Table 2) ในฤดูแล้ง การเจริญของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR ที่ 30 วัน พบว่ามีความสูงเท่ากับ 3.72 ซม. ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของต้นข้าวโพดที่มีการปลูกเชื้อ PGPR ไอโซเลต SUT2, SUT3 และเชื้อผสม (MI) พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) แต่ไม่แตกต่างกันเมื่อ 60 วันขึ้นไปจนถึง 90 วัน (ระยะเก็บเกี่ยว) โดยที่อายุ 30 วัน กรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อผสมร่วมกับปุ๋ยเคมี 75% ทำให้ต้นข้าวโพดมีความสูงมากที่สุด รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT2 และ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 75% แต่ไม่แตกต่างกับการใช้เชื้อผสมร่วมกับปุ๋ยเคมี 50% และการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว ส่วนในระยะที่อายุ 60-90 วัน ความสูงของต้นข้าวโพดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการใช้เชื้อร่วมกับปุ๋ยเคมีทั้ง 2 อัตรา และการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว มีความสูงมากกว่าที่ไม่ใส่ปุ๋ยและเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) นำหนักแห้งต้นข้าวโพดในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่ากรรมวิธีที่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมีในอัตรา 75% ของอัตราแนะนำ ทำให้ต้นข้าวโพดมีน้ำหนักแห้งมากกว่ากรรมวิธีที่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา 50% สำหรับผลผลิตของเมล็ดข้าวโพดแห้งที่ความชื้น 15% พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ การใช้เชื้อ SUT2 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 75% ของอัตราแนะนำ ทำให้ข้าวโพดมีผลผลิตมากที่สุด รองลงมาได้แก่ การใช้เชื้อ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 75% และการใช้เชื้อ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 50% ขณะที่การใช้ปุ๋ยเคมีอย่างเดียวทำให้ข้าวโพดมีผลผลิตอยู่ในระดับเดียวกับการใช้เชื้อ SUT2 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 50% และการใช้เชื้อผสมร่วมกับปุ๋ยเคมี 50% แต่ขนาดของเมล็ดจากน้ำหนัก 100 เมล็ด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเจริญเติบโตของข้าวโพดในฤดูฝน (กรกฎาคม-พฤศจิกายน 2550) พบว่าข้าวโพดมีความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ในทุกระยะของการเจริญเติบโต โดยความสูงของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR ที่ 30 วัน เท่ากับ 27.95 เซนติเมตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของต้นข้าวโพดที่มีการปลูกเชื้อ PGPR ไอโซเลต SUT2, SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ MI ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% พบว่าความสูงไม่แตกต่างกัน ส่วน 60 และ 90 วัน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสูงของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR กับกรรมวิธีอื่น ๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่มีการใส่ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียวให้ค่าความสูงมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ MI ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% และกรรมวิธีที่ให้ค่าความสูงน้อยที่สุด คือ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 50% เมื่อพิจารณาที่น้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพด พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) และเป็นที่น่าสนใจว่าการใส่ปุ๋ยเคมีอย่างเดียว ทำให้ต้นข้าวโพดมีน้ำหนักแห้งน้อยกว่ากรรมวิธีที่ใส่เชื้อทุกกรรมวิธี ส่วนผลผลิตที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) คือกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75%, กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ MI ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ MI ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% ให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากการใส่ปุ๋ยเคมีอย่างเดียว แต่มากกว่าการไม่ใส่เชื้อ

เนื่องจากไอโซเลต SUT3 แสดงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดฝักอ่อนมากที่สุด จึงได้จำแนกชนิด โดยการอ่านลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ จากยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลตดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่ร้อยละ 99 (GU971415) รวมทั้งการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ (Microgen™ Bacillus-ID System) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis* ที่ร้อยละ 97.38 และไอโซเลต SUT3 สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช คือ *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* sp., *Fusarium oxysporum* (Table 3) ซึ่งเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการงอกและความสมบูรณ์ของเมล็ดและกล้าข้าวโพด เนื่องจากเชื้อรากลุ่มดังกล่าวเป็นเชื้อรา

**Table 3** Characterization of *Bacillus subtilis* (SUT 3).

Isolate	ARA <sup>1/</sup>	IAA (µM/mg protein)	P-solubilization <sup>2/</sup>	Plant Pathogen Antagonism <sup>2/</sup>			
				<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Verticillium sp.</i>	<i>Didymella sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
SUT3	14.01	21	+	+	+	-	+

<sup>1/</sup> ARA unit = nmole of acetylene/mg protein/day

<sup>2/</sup> + = can inhibit plant pathogen, - = cannot inhibit plant pathogen



ที่อาศัยอยู่ในดินแล้วก่อให้เกิดโรคในพืช (Soil born disease) เช่น โรคเมล็ดเน่า รากเน่า (seed rots, seedling disease) ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งในข้าวโพด โดยมีรายงานในทำนองเดียวกันในข้าวโพดอาหารสัตว์ ซึ่งพบว่า *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้ง *Fusarium verticillioides*, *F. moniliforme* และ *Rhizoctonia solani* (Marco et al, 2006) และสามารถผลิตฮอร์โมน (IAA และ cytokinin) ที่ส่งผลต่อการเจริญของข้าวโพดอาหารสัตว์ และผักกาดหอม (Elsorra et al, 2004; Arkhipova et al, 2004) ได้เช่นกัน นอกจากนี้ เอนไซม์ ACC-deaminase ที่ถูกผลิตโดย *B. subtilis* สามารถช่วยลดระดับการสร้างเอทิลีนในพืชส่งผลในการลดความเครียดของพืช ดังนั้นจึงสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัยด้วย (Baby et al. 2006)

### สรุป

จากการประยุกต์ใช้ PGPR ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์แปซิฟิก 283 นั้นพบว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมี โดยลดอัตราส่วนปุ๋ยเคมีลง 25% และ 50% ทำให้ข้าวโพดมีการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตไม่แตกต่างกับการใส่ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว ซึ่งน่าจะเกิดจากคุณสมบัติของ PGPR ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดฝักอ่อน เช่น การผลิตฮอร์โมนพืช การผลิตเอนไซม์ ACC-deaminase และสามารถยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวโพดบางชนิดได้ เช่น *Fusarium* และ *Rhizoctonia* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมล็ดเน่าและรากเน่า (seed rots, seedling disease) ดังนั้นจึงมีศักยภาพในการผลิตเป็นหัวเชื้อ เพื่อใช้ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีป้องกันโรคสาเหตุจากเชื้อรา และแบคทีเรียบางชนิดในข้าวโพดได้ในอนาคต

### คำขอบคุณ

ขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

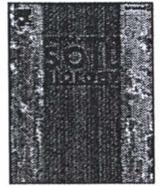
- หนึ่ง เตียอำรุง, กมลลักษณ์ เทียมโรสง และนันทกร บุญเกิด. 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). วารสารสุนารี่ 12:252-261.
- Arkhipova, T. N., S. U. Veselov, A. I. Melentiev, E. V. Martynenko. and G. R. Kudoyarova. 2004. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant Soil. 272:201-209.
- Baby, S., A. Muhammad, Z. A. Zahir, and K. Azeem. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. Soil Biol. Biochem. 38:2971-2975.
- Costacurta, A., P. Mazzafera, and Y. B. Rosato. 1998. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts. FEMS Microbiol. Lett. 159:215-220.
- Elsorra, E. I., H. Bochow., H. Ross, and R. Borriss. 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone like action of culture filtrates prepared from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. J. Plant Dis. Protect. 111: 583-597.
- Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson, and R. C. Burns. 1968. The Acetylene ethylene assay for  $N_2$ -fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. 43:1185-1207.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrogh, A. L. Farr, and R. J. Raldall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The J. Biol. Chemical. 193:265-275.
- Marco, K., U. Effmert., G. Berg, and B. Piechulla. 2006. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Arch. Microbiol. 187:351-360.
- Meunchang, S., S. Panichsakpatana, and R. W. Weaver. 2005. Inoculation of sugar mill by-products compost with  $N_2$ -fixing bacteria. Plant Soil. 271:219-225.
- Lawongsa, P., N. Boonkerd., S. Wongkaew., F. O'Gara, and N. Teaumroong. 2008. Molecular and phenotypic characterization of potential plant growth-promoting *Pseudomonas* from rice and maize rhizospheres. World J. Microbiol. Biotechnol. 24:1877-1884.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelleliet, and D. J. Lone. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## European Journal of Soil Biology

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejsobi>

## Original article

## Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand

Pongdet Piromyou<sup>a</sup>, Bancha Buranabanyat<sup>a</sup>, Piyada Tantasawat<sup>b</sup>, Panlada Tittabutr<sup>a</sup>, Nantakorn Boonkerd<sup>a</sup>, Neung Teaumroong<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Road, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand<sup>b</sup> School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 August 2010

Received in revised form

9 October 2010

Accepted 12 November 2010

Available online 1 December 2010

Handling editor: Kristina Lindström

## Keywords:

PGPR

Forage corn

Inoculum

Rhizosphere microbial community structure

## ABSTRACT

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) play an important role in agricultural systems, especially as biofertilizer. The objectives of this study were to select effective PGPR for forage corn (*Zea mays* L.) cultivation and to investigate the effect of their inoculation on indigenous microbial community structure. The putative genera *Pseudomonas* sp. SUT 19 and *Brevibacillus* sp. SUT 47 were selected for determining their efficiency in forage corn growth promotion in both pot and field experiments. In field experiment, PGPR amended with compost gave the highest results in comparison to all treatments. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) fingerprints of 16S rDNA amplified from total community DNA from rhizosphere confirmed that our isolates existed in rhizosphere throughout this study. The microbial community structures were slightly different among all treatments whereas major changes depended on stages of plant growth. In order to evaluate whether PGPR have effect on species diversity in rhizosphere, DNA sequencing of excised DGGE bands was done. The results demonstrated that dominant species in microbial community structure were not interfered by PGPR, but strongly influenced by plant development.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Forage corn is one of five major crops in Thailand. It occupies a major portion (about 33%) of Thai farmlands. The forage corn area began to decline and occupied around 1.35 million ha by 2000. From 2002 to present, production of forage corn averages 4.5 million tons per year. At present, Northern Thailand is the largest maize producing region, accounting for about 49% of the national acreage, followed by the Northeast region with 26%. Fertilizer prices for maize are around 33–45 USD per a 50-kg bag. The most common fertilizers used in maize production are urea (46-0-0), Triple 15 (15-15-15), and 16-20-0, which cost 40, 43 and 34 USD per a 50-kg bag, respectively. Therefore, the farmers spend money for chemical fertilizer around 74–100 USD ha<sup>-1</sup> for forage corn cultivation ([http://www.oae.go.th/download/download\\_journal/fundamation-2552.pdf](http://www.oae.go.th/download/download_journal/fundamation-2552.pdf)). An alternative to increase agricultural productivity in a sustainable manner, there is increasing reliance on manipulation of microorganisms that benefit soil and plant health. For decades, rhizobacteria beneficial to plants are often referred as

plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) [1]. PGPR can promote plant growth either directly or indirectly through various mechanisms, such as providing the N source for plant through the N<sub>2</sub> fixation [2,3]; exerting a biological control of soil-borne pathogens [4] as well as producing the plant-stimulating growth substances (phytohormone) that improve growth development by the production of auxin, cytokinin and gibberellins [2]. Moreover, ethylene is known as phytohormone and might inhibit elongation of root in some plants, therefore PGPR containing ACC-deaminase activity might promote plant growth as well as reduce the stress imposed by excessive ethylene to the plant [2].

The large-scale application of PGPR to crop as inoculants would be attractive as it would substantially reduce the use of chemical fertilizers and pesticides, which often pollute the environment. This has a heavy impact on the natural and human environment, as well as on human health, through the pollution of soils, waters, and the whole food supply chain. The PGPR can promote growth of several types of plants. For example, *Azospirillum* can associate with roots of monocots, including important crops such as wheat, corn, and rice. In addition, there are some applications of *Pseudomonas* sp. for improvement of growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in field [5] and of *Bacillus subtilis* for effective protection of maize from the pathogens *Fusarium* and *Rhizoctonia* [6]. Furthermore, PGPR inocula

\* Corresponding author. Tel.: +66 44 223389; fax: +66 44 216345.  
E-mail address: [neung@sut.ac.th](mailto:neung@sut.ac.th) (N. Teaumroong).

of *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. have been commercialized for various crops in Thailand by Suranaree University of Technology [7].

Thus, this research aimed to select the appropriate PGPR strains that perform higher plant growth promotion than those of commercial strains (*Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp.) when forage corn (*Z. mays* L.) cv. Suwan 5 was used as a crop representative. In addition, the effects of selected inoculant strains on microbial community structure in the rhizosphere of forage corn were also investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Soil sampling and bacterial isolation

153 bacterial strains were isolated from the root of forage corn (*Z. mays* L.) grown at different provinces i.e. Chiangmai (18°47'25"N/98°58'54"E), Lampang (18°17'25"N/99°30'25"E), Nakhon Sawan (15°41'0"N/100°7'0"E), Saraburi (14°51'0"N/100°91'0"E), and Nakhon Ratchasima (14°58'0"N/102°7'0"E) in Thailand. Plants were uprooted along with good amount of rhizosphere soil, brought immediately to the laboratory in polyethylene bags and air-dried within 2 h. The soil was removed from the roots, then dipped and gently shaken in sterilized water under aseptic conditions for 5 min. This step was repeated and only root samples were collected. The root suspension was obtained by dipping the root and vigorously vortexing in 10 ml of 1% sterilized tween 80 for 5 min. The obtained root suspension was then further diluted with ten-fold dilution technique prior to spreading on LG (N-free) medium (10 g glucose, 0.41 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.52 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g CaCl<sub>2</sub>, 0.05 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0025 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O per liter) [8]. The higher dilutions between 10<sup>6</sup> and 10<sup>8</sup> were focused in order to obtain bacterial isolates representing high density of root-adhering bacteria. The plates were incubated for 2 days at 30 °C and colonies showing morphological difference were collected for further analysis.

### 2.2. Selection of appropriate bacterial strains

Seeds of forage corn were surface sterilized by soaking in 70% ethanol for 1 min followed by incubation in 1% sodium hypochlorite for 10 min. The bleach solution was suctioned off and the seeds were thoroughly rinsed with sterilized distilled water at least five times. The seeds were germinated on sterilized filter paper sheets in the Petri dish. Each seed was inoculated with ~10<sup>8</sup> CFU/ml of single rhizobacterial isolate. Seeds inoculated with sterilized 0.85% NaCl solution were used as control. The seeds were covered with other sterilized filter paper sheets, and 10 ml of sterilized distilled water was added to each Petri dish to moist the filter paper sheets and allow the germination. The plates were incubated at room temperature for a week, and the root growth (root elongation and root weight) was examined. This was conducted as five replicates. The top ten bacterial isolates that can promote the root length were selected at one week after germination.

### 2.3. Acetylene reduction assay (ARA)

The N<sub>2</sub>-fixing activity of the selected bacterial culture was examined by acetylene reduction assay (ARA). The reactions were carried out in a 21-ml test tube containing 7 ml of bacterial culture in LG (N-free) medium and incubated at 28 °C for 2 days [9]. Ten percentages (v/v) of gas phase in the headspace was replaced with acetylene and further incubated at 28 °C for 24 h. Ethylene production was measured by using gas chromatograph (GC) with a flame ionization detector and PE-Alumina column equipped, 50 m × 0.32 mm × 0.25 μm (Perkin Elmer, USA). After completion

of the ARA, the cells were predigested by adding 10% SDS (W/V) and sonicated briefly. Total protein concentration of the cell suspension was determined according to Lowry's method [10]. One unit of nitrogenase enzyme refers to the activity to form 1 nmol of ethylene per hour under this condition. The activity of the enzyme was calculated as nmol of ethylene forming/h/mg of protein. Standard curve of ethylene was constructed by varied concentration of pure ethylene.

### 2.4. Indole-3-acetic acid (IAA) production

Production of indole-3-acetic acid (IAA) was colorimetrically determined as described by Fukuhara et al. [11]. The isolates were grown in LG (N-free) broth medium supplemented with L-tryptophan (100 mg/L) at 28 °C. The supernatant of the stationary phase culture was obtained by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min. IAA produced per ml culture was estimated by mixing 5 ml Sal-kowsky reagent (0.01 M FeCl<sub>2</sub> in HClO<sub>4</sub>), followed by measuring the color changes at 530 nm [12]. Varied amounts of pure indole-3-acetic acid were used as standard.

### 2.5. ACC-deaminase activity assay

Selected bacterial isolates were cultured in LG (N-free) medium at 28 °C for 2 days with shaking at 200 rpm until cell reached the early stationary phase. The cells were collected by centrifugation at 5000 rpm for 5 min and washed twice with minimal medium [13]. Cell pellets were suspended in 15 ml of minimal medium supplemented with 1 mM ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate), and further incubated at 28 °C for 24 h with shaking at 200 rpm to induce ACC-deaminase enzyme production. ACC-deaminase activity was measured as described by Penrose et al. [13].

### 2.6. P-solubilization

Phosphate-solubilization test was conducted qualitatively by inoculating the bacteria into agar containing precipitated tricalcium phosphate. The medium was a modification of Pikovskaya medium, consisted of 10 g glucose, 5 g tribasic phosphate (Ca<sub>5</sub>HO<sub>13</sub>P<sub>3</sub>), 0.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 g KCl, 0.1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, trace of MnSO<sub>4</sub> and FeSO<sub>4</sub>, 0.5 g yeast extract, and 15 g agar, in 1000 ml distilled water. Bacterial culture was streaked on the surface of Pikovskaya medium. The presence of clearing zone around bacterial colony after 24 h incubation was used as indicator for positive P-solubilization [14].

### 2.7. 16S rRNA gene analysis

The PGPR isolates SUT 19 and SUT 47 were analyzed by cloning and nearly sequencing of the 16S rRNA gene. Both DNA were extracted [15] and used as a DNA template in PCR reactions. 16S rRNA gene was amplified by using the primers pair [16]. The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The amplicons were ligated into the pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega, USA) and then further transformed into *Escherichia coli* DH5α competent cells, following the manufacturer's protocol. Cells were grown overnight at 37 °C on Petri plates containing 5-gal<sup>®</sup>/LB agar blend (Sigma–Aldrich) supplemented with 100 μg ml<sup>-1</sup> ampicillin (Sigma–Aldrich). White colonies (transformants) were picked randomly from the plates for colony PCR using the SP6 and T7 primers (Promega). Twenty-five microliter PCR reactions containing 0.1 U μl<sup>-1</sup> GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Promega), 1 × PCR buffer and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> supplied with the enzyme, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM of each primer were performed using an PERKIN ELMER, GeneAmp PCR System 2400 under the

following reaction conditions: 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 48 °C for 45 s, and 72 °C for 45 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were evaluated by running a small volume of product in an agarose gel. DNA sequencing was performed by MACROGEN company (Korea). The DNA sequences were generated and the most closely related sequences were obtained from the NCBI database.

## 2.8. Plant experiment

### 2.8.1. Leonard jar experiment

Since the preliminary experiment showed that the original formula of Hoagland solution could not distinguish the forage corn growth performance in every treatments, thus half strength of Hoagland solution was found more appropriate later. Plastic jar (383 cm<sup>3</sup>) was filled with sand, and a half strength Hoagland solution (150 ml) [17] was applied through a wick to provide nutrients to plants. The whole apparatus was autoclaved (25 min at 121 °C) prior to the transplantation of seedlings. Surface-disinfected forage corn seeds from National Corn and Sorghum Research Center (NRCCS), Thailand were germinated on sterilized filter sheets in Petri dish. Uniformly germinated seeds were transplanted to the plastic jar containing sand under aseptic conditions (single plant per plastic jar). One milliliter of 2-day-old inoculum (10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) was applied to the seedling, 2 days after transplanting. This was conducted as three replicates per single bacterial isolate. Plants were grown under controlled environmental conditions of 28 ± 2 °C on 16/8 h day/night cycle at four light intensities (full light, 639 μE m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup>). The shoot and root were harvested after one month of planting. The isolates SUT 19 and SUT 47 displayed the highest forage corn biomass when compared with commercial strains (*Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp.), then both isolated strains were collected for further analysis. In addition, to enumerate the number of root colonizing cell, root samples were collected and vigorously vortexed in 20 ml of 1% sterilized tween 80 for 5 min. The obtained suspension was then diluted with ten-fold dilution technique prior to spreading on LG (N-free) medium. The plates were incubated for 2 days at 30 °C before colony counting.

### 2.8.2. Pot and field experiments

Both pot and field experiments were conducted from January 2009 to March 2009 as first crop (average rainfall = 40 mm and temperature range 27.1–38 °C) and July 2009 to September 2009 as second crop average (rainfall = 150 mm and temperature range 23–32 °C). For the pot experiments, the same soil samples used in field experiment from Suranaree University of Technology farm (14°59'0"N/102°7'0"E) were collected, air-dried, sieved (2-mm/10-mesh) and analyzed for physico-chemical characteristics before filling the pots. The soil was clay loam having pH 7.26; electrical conductivity (EC), 192.5 μS cm<sup>-1</sup>; available phosphate (Bray II), 65.73 ppm; potassium (NH<sub>4</sub>OAc), 180 ppm; and organic matter [18], 1.64%. The selected bacterial isolates (SUT 19 and SUT 47) and commercial strains were inoculated with and without the compost. The compost was applied a ton per ha to both pot and field experiments. The compost was analyzed for physico-chemical characteristics before applied into pots and field. The compost was having pH 8.26; electrical conductivity (EC), 4.18 μS cm<sup>-1</sup>; phosphorus (wet digestion), 2.87%; potassium (wet digestion), 0.95%; nitrogen (Kjeldahl method) [19], 1.03%; and organic matter [18], 15.01%. The forage corn seeds were sown in soil filled pots (12 kg soil per pot) receiving nutrient inputs of N, P and K at 120, 75 and 50 kg in form of urea, diammonium phosphate and muriate of potash, respectively. The forage corn was inoculated (10<sup>8</sup> CFU seed<sup>-1</sup>) with the isolated strains and commercial strains (*Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp.) after a day and five days of sowing. The pots were arranged

randomly with four replications at ambient light. The plants were harvested after two, five and eight weeks. The field experiments were conducted along with university farm agronomic practices (watering around 1.5 mm day<sup>-1</sup>). Seeds of forage corn were sown with a single row seed drill keeping row to row distance of 25.0 cm. Each experiment was conducted in randomized complete block design (RCBD) with four replications. The forage corn was harvested after two, five and eight weeks after sowing. Data of plant biomass were recorded and the samples from each rhizosphere soil were collected for PCPR microbial community analyses.

### 2.9. Total community DNA isolation and PCR amplification of universal 16S rRNA of eubacterial, archeobacterial and fungal genes fragment and DGGE analysis

DNA extraction was performed using the Ultra Clean Soil DNA kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, California, USA). A portion of 0.25 g of forage corn rhizosphere was processed according to the protocol provided by the manufacturer with an additional bead-beating step using as cell homogenizer (Braun, Melsungen, Germany) to achieve a harsh cell lysis. Amplification of eubacterial 16S rRNA gene was performed using universal primers PBA338F (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') and PRUN518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') which yielded products of approximately 200 base pairs [16]. The GC-clamps (5'-CCC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGG GCG GGG GCA CGG GCC G-3') [20] were added to the 5' end of the forward primer. The PCR reaction contained 50 ng of DNA from soil samples, 0.5 μmol of each primer, 0.2 mM dNTP, 1 × PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 0.05 U Taq DNA polymerase (Promega, USA). The thermal cyclers were performed using a PERKIN ELMER, GeneAmp PCR System 2400 under the following reaction conditions: 94 °C for 5 min (1 cycle), 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s (35 cycles) and final 72 °C for 10 min (1 cycle).

Archaeal 16S rRNA genes were amplified by using the forward primer PARCH340F (5'-CCC TAC GGG G(C/T)G CA(G/C) CAG-3') and a reverse primer PRAH519R (5'-TTA CCG CGG C(G/T)G CTG-3') which yielded products of approximately 200 base pairs [21]. The GC-clamp [20] was added to the 5' end of the forward primer. The PCR reaction contained 50 ng of DNA from soil sample, 0.5 μmol of each primer, 0.2 mM dNTP, 1 × PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 0.05 U Taq DNA polymerase (Promega, USA). The PCR amplifications were performed in the following condition: 5 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 95 °C for 45 s, 53.5 °C for 45 s, and 72 °C for 2 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

The PCR products of eubacteria and archaeobacteria were separately subjected to DGGE analyses. PCR product (50 μl) was loaded onto 10% (w/v) polyacrylamide (Acrylamide:Bisacrylamide ratio, 37.5:1) gel in 1.0 strength Tris-acetate-EDTA (TAE, pH 8.5) buffer. The polyacrylamide gel was prepared with a denaturing gradient ranging from 30% to 70%. DGGE was performed at 60 °C. The electrophoresis was run for 12 h at 120 V. Subsequently, the gel was stained with SYBR Green solution and documented on gel documentation and analysis.

The fungus-specific primers NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') and FR1 (5'-AIC CAT TCA ATC GGT AIT-3') were used for amplification of 18S rRNA gene fragments (1650 bp) [22]. The reaction mixture (50 μl) consisted of 1 ml of template DNA (ca. 20 ng), Stoffel buffer (10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.3]), 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates, 3.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 2% (w/v) dimethyl sulfoxide, 0.2 M concentration of each primer (NS1 and FR1-GC), and 2 U of Taq DNA polymerase (Stoffel fragment; Applied Biosystems, Foster City, Calif.). A GC-rich sequence (5'-CCC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGG GCG GGG GCA CGG GCC G-3') was attached to the primer FR1 to prevent complete melting of PCR products during separation in the denaturing gradient gel. Dimethyl

sulfoxide was added to the reaction mixture to improve specificity and facilitate the amplification of GC-rich templates [22]. After 8 min of denaturation at 94 °C, 35 thermal cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 48 °C, and 3 min at 72 °C were performed, followed by an extension step at 72 °C for 10 min. DGGE analysis was performed as previously described with a denaturing gradient of 18–43% denaturant. Aliquots of PCR samples (50 µl) were applied to the DGGE gel, and DGGE was performed in 1× Tris–acetate–EDTA (TAE) buffer at 58 °C with constant voltage of 180 V for 16 h. The gel was stained with SYBR Green solution and documented on gel documentation and analysis.

### 2.10. Cloning and sequencing

The microbial community composition in DGGE gel was analyzed by cloning and partial sequencing of the 16S rDNA and 18S rDNA genes. Interested bands from DGGE gel were used as a DNA template in PCR reactions as followed by Prakamhang et al. [15]. 16S rDNA and 18S rDNA genes were amplified by using the primers pair PRBA338F-PRUN518R, PRAH519R-PARCH340F, and NS1-FR1 for eubacteria, archeobacteria and fungi, respectively. The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The amplicons were ligated into the pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega, USA) and then further transformed into *E. coli* DH5<sup>∞</sup> competent cells, following the manufacturer's protocol. Cells were grown overnight at 37 °C on Petri plates containing S-gal<sup>®</sup>/LB agar blend (Sigma–Aldrich) supplemented with 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin (Sigma–Aldrich). White colonies (transformants) were picked randomly from the plates for colony PCR using the SP6 and T7 primers (Promega, USA). Twenty-five microliter PCR reactions containing 0.1 U µl<sup>-1</sup> GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Promega, USA), 1× PCR buffer and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> supplied with the enzyme, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM of each primer were performed using an PERKIN ELMER, GeneAmp PCR System 2400 under the following reaction conditions: 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 48 °C for 45 s, and 72 °C for 45 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were evaluated by running a small volume of product in an agarose gel. DNA sequencing was performed by MACROGEN company (Korea). The DNA sequences were generated and the most closely related sequences were obtained from the NCBI database.

### 2.11. Statistical analyses

The experimental data were statistically analyzed according to Stell et al. [23], and means were compared by Duncan's Multiple Range Test [24]. The cluster analysis and dendrogram generation were carried out by the NTSYSpc (2.2, Exeter Software, USA) [25]. The cluster analysis was performed according to the presence and absence of bands that occurred in DGGE gels. The presence or absence of a nucleic acid band at the same height in each lane was marked with a 1 or 0, respectively. The similarities between the DGGE patterns were analyzed using the Pearson correlation coefficient, and displayed graphically as a dendrogram based on UPGMA algorithms (unweighted pair group method with arithmetic averages). NTSYSpc version 2.2 was also used to perform principle coordinate analysis (PCA) to perform multiple dimensions of microbial community structure.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effect of inoculum size on root colonization and plant biomass

Since *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. have been commercialized as PGPR inocula for various crops cultivation by Suranaree

University of Technology (SUT) [7], the aim of this study was to select the appropriate PGPR strains which provide better plant promoting efficiency than both of the commercial strains. In this study, forage corn was selected as crop representative. In order to obtain the most abundant root-adhering bacteria, the roots of forage corn were used as source of PGPR isolation. In addition, N-free medium was used in order to obtain nitrogen fixing PGPR. Since most of the N input in soil is in the form of polymers, which first have to be broken down into smaller units by extracellular enzymes [26], in soil where N and C are often of low availability, it is crucial for organisms to tightly regulate the synthesis and activity of the different enzyme systems [27]. Thus, the selected nitrogen fixer strains might have more chances to persist and provide some nitrogen to plants in N-deprived soil than non-nitrogen fixing bacteria. However, some other active PGPR were also excluded from this protocol. The bacteria isolated from higher dilution between 10<sup>6</sup> to 10<sup>8</sup> folds were collected. The top two (SUT 19 and SUT 47) bacterial strains from 153 isolated strains were selected on the basis of their efficiency to promote better forage corn growth in Leonard's jar condition (data not shown). Subsequently, the inoculation size of strains SUT 19 and SUT 47 on forage corn was determined before applied as inocula. The effect of bacterial inoculum size on the root colonization and forage corn biomass was summarized in Table 1. Even though the low amount of bacterial cells at 10<sup>3</sup> CFU ml<sup>-1</sup> seed<sup>-1</sup> was applied, the number of bacterial root colonization could reach to 10<sup>6</sup> CFU g root dry weight<sup>-1</sup>. This again confirms the benefit of bacterial isolation approach which is conducted on the principle bacteria appeared in higher dilution represented of high number of root-adhering bacteria (as mentioned in Materials and methods). In addition, all of the 4 bacterial strains demonstrated higher root colonization efficiency when inoculum size was increased. The inoculum size in the range of 10<sup>5</sup>–10<sup>7</sup> CFU ml<sup>-1</sup> showed that SUT 47 was able to colonize root of forage corn higher than other strains, whereas root colonization of SUT 19 was not significantly different when compared with *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. In comparison, the plant biomass of plant inoculated with the isolates SUT 19 and SUT 47 at population number at 10<sup>4</sup> CFU ml<sup>-1</sup> was 36.3% and 41.6%, respectively, which is higher than with the uninoculated control plant. Moreover, the ability to promote plant growth of isolate SUT 47 was higher than that of other inoculated strains at 10<sup>4</sup> CFU ml<sup>-1</sup> (0.72 g of plant dry weight). Besides, inoculum size at 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> displayed that all inoculated strains promoted the plant growth significantly better than the control. Most of the PGPR strains could promote plant biomass at inoculum level 10<sup>4</sup>–10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> seed<sup>-1</sup> except *Azotobacter* sp. Generally, PGPR inoculants in this experiment that were inoculated at 10<sup>4</sup> CFU ml<sup>-1</sup> seed<sup>-1</sup> raised the level of bacterial root colonization up to 10<sup>7</sup> CFU g root dry weight<sup>-1</sup>. And this level could promote higher forage corn biomass than other degree of inoculum size. However, the inoculum size at 10<sup>4</sup> CFU ml<sup>-1</sup> only showed good results in sterilized condition, therefore, when PGPR strains of this size were applied in the field, higher number of PGPR is needed. As experienced by El Zembrany et al., 2006 [28], the inoculum level of *Azospirillum lipoferum* CRT1 at 2.8 × 10<sup>7</sup> CFU per seed of maize in large-scale application could be recovered to be as high as 108 CFU g root<sup>-1</sup> at 35 days after planting.

### 3.2. Characterization of selected PGPR

The abilities of plant growth promotion such as N-fixation ability, IAA production and ACC-deaminase activity of the tested strains were determined. The isolates SUT 19 and SUT 47 showed less efficiency of nitrogen fixation than *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. while IAA production was not significantly different



Table 1

Effect of PGPR inoculum size on plant dry weight and root colonization of forage corn in Leonard's jar experiment at one month of planting.

Treatments	Dilutions (CFU/ml)					
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
	Root colonization (CFU/g root dry weight)					
Control	—	—	—	—	—	—
<i>Azotobacter</i> sp.	4.0 × 10 <sup>6</sup> ± 8.9 × 10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>	8.3 × 10 <sup>7</sup> ± 1.6 × 10 <sup>7</sup> <sup>c</sup>	2.4 × 10 <sup>8</sup> ± 1.4 × 10 <sup>8</sup> <sup>b</sup>	8.0 × 10 <sup>8</sup> ± 1.0 × 10 <sup>8</sup> <sup>b</sup>	3.0 × 10 <sup>9</sup> ± 1.2 × 10 <sup>9</sup> <sup>b</sup>	3.7 × 10 <sup>9</sup> ± 6.7 × 10 <sup>8</sup> <sup>a</sup>
<i>Azospirillum</i> sp.	9.0 × 10 <sup>6</sup> ± 4.2 × 10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>	3.7 × 10 <sup>7</sup> ± 5.3 × 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	4.9 × 10 <sup>7</sup> ± 8.0 × 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	1.4 × 10 <sup>8</sup> ± 4.3 × 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	5.6 × 10 <sup>8</sup> ± 1.4 × 10 <sup>8</sup> <sup>a</sup>	4.8 × 10 <sup>9</sup> ± 3.6 × 10 <sup>9</sup> <sup>a</sup>
SUT 19	4.0 × 10 <sup>6</sup> ± 4.6 × 10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>	5.2 × 10 <sup>7</sup> ± 1.2 × 10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>	6.5 × 10 <sup>6</sup> ± 1.1 × 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	3.7 × 10 <sup>7</sup> ± 3.1 × 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup> ± 9.0 × 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	2.5 × 10 <sup>9</sup> ± 1.6 × 10 <sup>9</sup> <sup>ab</sup>
SUT 47	7.0 × 10 <sup>6</sup> ± 1.4 × 10 <sup>6</sup> <sup>ab</sup>	4.0 × 10 <sup>7</sup> ± 2.3 × 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	5.5 × 10 <sup>8</sup> ± 2.4 × 10 <sup>8</sup> <sup>c</sup>	9.5 × 10 <sup>8</sup> ± 2.0 × 10 <sup>8</sup> <sup>c</sup>	3.3 × 10 <sup>9</sup> ± 1.5 × 10 <sup>9</sup> <sup>b</sup>	4.1 × 10 <sup>9</sup> ± 1.7 × 10 <sup>9</sup> <sup>a</sup>
	Plant biomass (g of total plant dry weight)					
Control	0.41 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.09 <sup>a</sup>
<i>Azotobacter</i> sp.	0.49 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.53 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.55 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.06 <sup>a</sup>
<i>Azospirillum</i> sp.	0.45 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.55 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.13 <sup>a</sup>
SUT 19	0.47 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.09 <sup>a</sup>
SUT 47	0.60 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.64 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.15 <sup>a</sup>

Within a column for each dilution of plant biomass and root colonization, the data were separately investigated. Means followed by different letter are significantly different at 0.05 probability level according to least significant difference (LSD) test.

among all bacteria tested. However, strains SUT 19 and SUT 47 performed the activity of ACC-deaminase enzyme at 0.25 and 0.19 μmol of a-ketobutyrate mg protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectively while this property could not be detected in the *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. Moreover, only isolate SUT 19 had the ability to solubilize inorganic phosphate (Table 2). Based on 16S rRNA sequence analysis, the isolates SUT 19 and SUT 47 were closely related to *Pseudomonas* sp. and *Brevibacillus* sp. with homology 98% (HM446471) and 97% (HM453885), respectively. However, these two isolates are still putative genera since further biochemical characteristics and sequencing of housekeeping genes are required for confirming their identification. Even though the isolates SUT 19 and SUT 47 can fix atmospheric nitrogen with lower amount than the commercial strains (*Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp.), when comparing all tested isolates with the Rhizobium–legume symbiosis, all of PGPR strains in this study still have lower nitrogen fixing ability [29]. This indicated that plant growth promotion is caused by some other factors rather than nitrogen fixation. Whereas one advantage of these isolates may be that they can survive in N-deprived condition, other factors such as phytohormones production, phosphate solubilization and ACC-deaminase would be the key factors for plant growth promotion.

The mechanism most often invoked to explain the direct effects of plant growth promoting bacteria on plants is the production of phytohormones, including auxins such as indole acetic acid or IAA [30,31]. We found that the efficiency to produce plant hormone (IAA) of the strains SUT 19 and SUT 47 was not significantly different when compared to *Azotobacter* sp., in spite of their different plant biomass. However, lower amount of IAA produced by *B. subtilis* 101 could promote more tomato biomass than higher amount of IAA from *Azospirillum brasilense* Sp245 [32]. Thus, in this case, IAA might not play an important role for forage corn growth

promotion. Interestingly, the isolates SUT 19 and SUT 47 were found to produce ACC-deaminase enzyme. These results imply that the ACC deaminase may help to promote the forage corn growth. The ACC-deaminase can cleave the plant ethylene precursor ACC, and thereby lower the level of ethylene in a developing or stressed plant [33,34]. The inoculation with rhizobacterial strains containing ACC-deaminase activity significantly promoted root, shoot and other growth contributing parameters of wheat at all salinity levels both under axenic and pot condition [35]. However, organisms with higher levels of ACC-deaminase activity, which is from 300 to 400 nmol a-ketobutyrate mg protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, do not necessarily promote root elongation of *Brassica campestris* to any greater extent than the strains that contain less enzyme activity [31]. Therefore, the role of ACC-deaminase activity of strains SUT 19 and SUT 47 on forage corn growth promotion should be further elucidated. As widely recognized that soil inoculation with phosphate solubilizing bacteria (PSB) can improve solubilization of fixed soil phosphates and applied phosphates resulting in higher crop yields [36], the highest forage corn biomass caused by strain SUT 19 inoculation may possibly be promoted via phosphate-solubilization trait.

### 3.3. The effect of PGPR on plant biomass in pot and field experiments

In this experiment, compost was amended since nutrients available in compost might support the growth of PGPR during the less developed root period. The results showed no effect of compost on shoot and root dry weight in all treatments. Inoculation of forage corn with selected PGPR strains in pot and field experiments for both crops (January to March 2009 and July to September 2009) resulted in a visible increase in root and shoot development, especially during the establishment of the plant. The results of effect of PGPR on plant biomass in pot/field experiments in first crop are shown in supplementary data (S1). The analysis of shoot and root dry weights using the F-test revealed that inoculation of PGPR resulted in a significant ( $P \leq 0.05$ ) increase in the biomass of roots and shoot as compared to uninoculated controls (Table 3).

For the results in pot experiment, shoot biomass performed at 2nd week showed no significant differences in all treatments, whereas at 5th week, strains SUT 19, SUT 47 and *Azospirillum* sp. amended with compost were able to increase shoot dry weight of forage corn when compared to the compost amendment alone (strain SUT 19 with compost: 43%, strain SUT 47 with compost: 45%, and *Azospirillum* sp. with compost: 44%, respectively). However, both commercial strains and isolated strains (strain SUT 19, strain SUT 19 with compost and strain SUT 47 with compost) were able to promote

Table 2

Some characteristics of PGPR.

Treatments	Characterization			
	ARA	IAA	ACC-deaminase activity	P-solubilization
<i>Azotobacter</i> sp.	0.30 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	—
<i>Azospirillum</i> sp.	0.60 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	—
SUT 19	0.07 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.19 <sup>b</sup>	+
SUT 47	0.11 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.19 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.16 <sup>ab</sup>	—

ARA unit = nmole of acetylene/mg protein/day, ACC-deaminase activity unit = μmol of a-ketobutyrate/mg protein/h, IAA unit = μM/mg protein, + = can solubilize P and — = cannot solubilize P. Different letters in the same column indicate a significant different among treatments ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 3**  
Effect of PGPR on plant biomass in pot/field experiment.

Treatments	July 2009–September 2009								
	Pot experiments						Field experiments		
	Shoot dry weight (g)			Root dry weight (g)			Shoot dry weight (g)		
	2nd week	5th week	8th week	2nd week	5th week	8th week	2nd week	5th week	8th week
Control	0.59 ± 0.26 <sup>a</sup>	11.81 ± 0.57 <sup>a</sup>	29.61 ± 2.64 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.54 <sup>a</sup>	11.29 ± 2.93 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.34 <sup>a</sup>	9.80 ± 1.89 <sup>a</sup>	215.62 ± 29.66 <sup>a</sup>
Compost	0.77 ± 0.16 <sup>ab</sup>	13.72 ± 0.91 <sup>ab</sup>	30.65 ± 6.63 <sup>ab</sup>	0.45 ± 0.10 <sup>ab</sup>	3.04 ± 0.32 <sup>abc</sup>	14.93 ± 1.43 <sup>abc</sup>	0.95 ± 0.20 <sup>a</sup>	11.80 ± 2.70 <sup>ab</sup>	261.07 ± 37.87 <sup>ab</sup>
<i>Azotobacter</i> sp.	0.81 ± 0.32 <sup>ab</sup>	16.45 ± 3.49 <sup>ab</sup>	33.27 ± 7.46 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.07 <sup>ab</sup>	3.01 ± 0.53 <sup>ab</sup>	15.95 ± 1.73 <sup>abc</sup>	1.04 ± 0.20 <sup>a</sup>	12.94 ± 3.38 <sup>abc</sup>	260.00 ± 12.78 <sup>ab</sup>
<i>Azotobacter</i> sp. + Compost	0.89 ± 0.19 <sup>ab</sup>	23.07 ± 2.48 <sup>cd</sup>	34.05 ± 6.97 <sup>ab</sup>	0.66 ± 0.16 <sup>b</sup>	3.51 ± 1.23 <sup>abc</sup>	17.43 ± 1.51 <sup>bc</sup>	1.09 ± 0.16 <sup>a</sup>	18.92 ± 3.14 <sup>de</sup>	273.18 ± 33.13 <sup>ab</sup>
<i>Azospirillum</i> sp.	0.80 ± 0.31 <sup>ab</sup>	16.92 ± 4.21 <sup>ab</sup>	33.68 ± 5.34 <sup>ab</sup>	0.61 ± 0.22 <sup>ab</sup>	2.86 ± 0.36 <sup>a</sup>	14.99 ± 1.57 <sup>abc</sup>	1.05 ± 0.19 <sup>a</sup>	17.09 ± 0.23 <sup>cd</sup>	242.83 ± 63.42 <sup>ab</sup>
<i>Azospirillum</i> sp. + Compost	0.92 ± 0.30 <sup>ab</sup>	24.35 ± 3.92 <sup>d</sup>	34.36 ± 10.26 <sup>ab</sup>	0.63 ± 0.11 <sup>ab</sup>	3.60 ± 0.75 <sup>abc</sup>	16.38 ± 2.43 <sup>bc</sup>	1.20 ± 0.22 <sup>a</sup>	20.26 ± 4.42 <sup>de</sup>	276.42 ± 53.13 <sup>abc</sup>
SUT 19	0.77 ± 0.22 <sup>ab</sup>	20.25 ± 4.88 <sup>bcd</sup>	31.94 ± 4.54 <sup>ab</sup>	0.59 ± 0.25 <sup>ab</sup>	5.05 ± 0.21 <sup>bcd</sup>	13.54 ± 3.67 <sup>ab</sup>	0.97 ± 0.28 <sup>a</sup>	16.39 ± 2.67 <sup>bcd</sup>	282.04 ± 21.26 <sup>abc</sup>
SUT 19 + Compost	0.90 ± 0.33 <sup>ab</sup>	24.25 ± 4.26 <sup>d</sup>	38.35 ± 7.13 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.24 <sup>b</sup>	5.82 ± 1.11 <sup>d</sup>	19.44 ± 0.74 <sup>c</sup>	1.06 ± 0.31 <sup>a</sup>	24.15 ± 3.71 <sup>e</sup>	341.13 ± 91.56 <sup>c</sup>
SUT 47	0.82 ± 0.23 <sup>ab</sup>	17.57 ± 3.42 <sup>abc</sup>	31.04 ± 1.09 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.06 <sup>ab</sup>	3.70 ± 0.48 <sup>abc</sup>	14.59 ± 1.27 <sup>abc</sup>	0.99 ± 0.24 <sup>a</sup>	16.17 ± 1.38 <sup>bcd</sup>	275.73 ± 16.22 <sup>abc</sup>
SUT 47 + Compost	0.95 ± 0.27 <sup>b</sup>	25.04 ± 6.89 <sup>d</sup>	35.55 ± 7.65 <sup>ab</sup>	0.65 ± 0.22 <sup>b</sup>	5.55 ± 2.12 <sup>cd</sup>	19.33 ± 2.74 <sup>c</sup>	1.11 ± 0.25 <sup>a</sup>	24.61 ± 3.17 <sup>e</sup>	301.15 ± 23.66 <sup>bc</sup>
F-test	*	**	*	*	**	**	ns	**	*

Mean values within a column followed by different letters were significantly different according to the DUNCAN's test,  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*), ns = non-significant.

growth of forage corn significantly better than uninoculated control. Especially at 8th week after planting, only strain SUT 19 amended with compost demonstrated the ability to promote higher growth of forage corn than uninoculated control. In case of root dry weight, the results showed that at 2 weeks after planting, a commercial strain (*Azotobacter* sp.) and isolated strains (SUT 19 and SUT 47) amended with compost significantly increased the root dry weight of forage corn when compared to uninoculated control. At 5 weeks after planting, the isolates strain SUT 19, strain SUT 19 with compost, and strain SUT 47 with compost similarly gave better results in promoting growth of forage corn than uninoculated control. Moreover, strain SUT 19 amended with compost more positively affected the root dry weight of forage corn when compared to compost amendment alone. At 8 weeks after planting, all of inoculated strains amended with compost enhanced forage corn growth significantly better than uninoculated control except compost amendment alone.

The results in field experiment displayed only the effect of PGPR on shoot biomass because of limitation of root sampling. The tendency of shoot biomass was similar to the pot experiment. At 2 weeks after planting, the effects from all of inoculated strains treatments were not significantly different when compared with uninoculated control, whereas, at 5 weeks after planting, all of inoculated strains were significantly different from uninoculated control except *Azotobacter* sp. treatment. Nevertheless, commercial strains (*Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. and *Azospirillum* sp. with compost) and selected strains (19 with compost and SUT 47 with compost) showed high efficiency to promote the forage corn growth when compared with compost amendment alone. At the 8 weeks after planting, the ability to promote forage corn growth of the strains SUT 19 and SUT 47 amended with compost was higher than that of uninoculated compost at 30.7% and 15.3%, respectively. In addition, the strain SUT 19 amended with compost is the best among all treatments in terms of promoting growth of forage corn. In addition, the results from first crop cultivation (see S1) were also similar to the second crop even though the plantation period was conducted for only 5 weeks. Our results are in accordance with some reports that *A. lipoferum* CRT1 could promote growth of maize (*Z. mays* L.) [5,20,28,37–39].

#### 3.4. Comparative PCR–DGGE and PCA analyses of microbial populations

The effect of PGPR inoculation on soil microbial community structure in forage corn rhizosphere in both pot and field

experiments was evaluated using PCR–DGGE approach. DGGE fingerprints confirmed that our isolates are able to establish in the forage corn rhizosphere throughout the plantation period (Fig. 1A) and the DGGE patterns obtained from rhizosphere in first crop are similar to the second crop (data not shown). The community structures of all eubacteria, archeobacteria and fungi from bulk soil showed absolutely different DGGE patterns when compared to other treatments. Both of eubacterial DGGE patterns obtained from pot and field consisted of a large amount of bands representing huge variety of ribotype at rhizosphere soil (Figs. 1A and 2A). The DGGE fingerprints of archeobacteria in both pot and field showed that the amounts of bands slightly increase along with plant age. Each treatment of DGGE patterns consisted of a few stronger bands and a large number of fainter bands representing less dominant ribotypes, whereas the relative abundance of several ribotypes was enhanced in the 8 weeks after planting (Figs. 1B and 2B). The DGGE fingerprints of fungi were similar to the archeobacterial fingerprint in terms of the amount of bands, which slightly increased when time of plantation was increased (Figs. 1C and 2C). However, the results from DGGE analysis revealed that relative abundance of eubacterial, archeobacterial and fungal populations in the rhizosphere of forage corn strongly shifted during plant growth.

In order to determine the microbial community shifting more clearly, PCA was used to demonstrate multidimensional relationships derived from portions of the DGGE fingerprints. The results in pot experiment revealed that eubacterial community structure was separated from eubacterial community in the bulk soil (Fig. 3A), whereas, the compost amendments did not have any influence on the eubacterial community structure. In addition, it was clearly demonstrated that the state of plant growth showed great influence on the bacterial community structure. In the case of archeobacterial community in pot experiment, it was revealed that the community structure of bulk soil was absolutely separated from rhizosphere soil (Fig. 3B). For fungal community structure, the community changes at 5th and 8th week were grouped together and community structure in bulk soil of each time was separated from rhizosphere soil (Fig. 3C).

The results in field experiments showed that eubacterial community structure from rhizosphere was different from that of eubacterial community structure of bulk soil (Fig. 3D). In addition, when considering archeobacterial and fungal community structure, it was found that the community changes were strongly influenced by plant age (Fig. 3E and F). Since the aim of setting pot experiment was to observe the effect of plant intensive care such as watering,

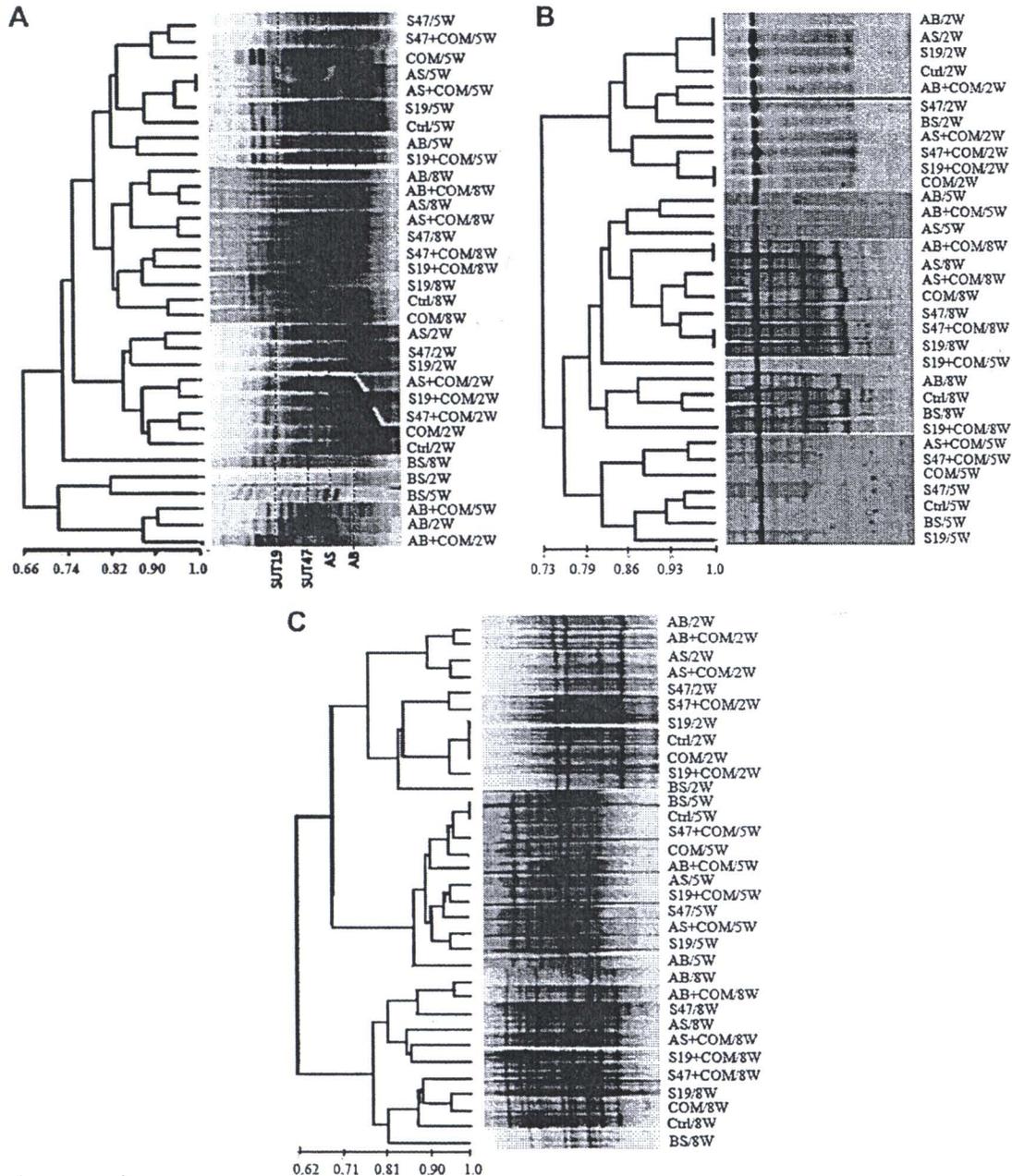
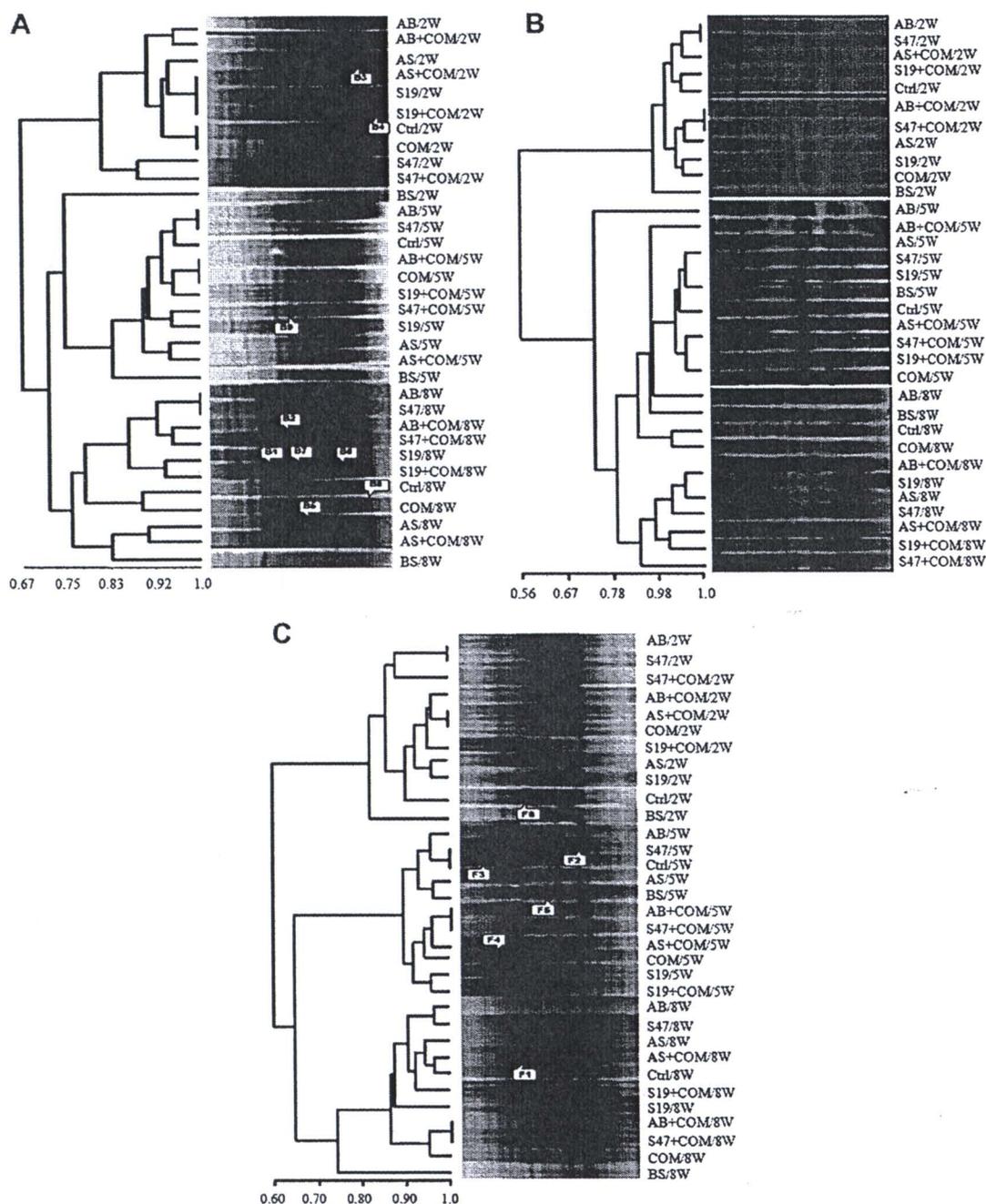


Fig. 1. Community structure of soil microorganism from pot experiment. Dendrograms of soil microorganism based on PCR–DGGE bands. (A) Bacterial community structure; (B) Archaeobacterial community structure; (C) Fungal community structure. Letters indicate the inoculated treatments; (AB) *Azotobacter* sp.; (AS) *Azospirillum* sp.; (S19) strain SUT 19; (S47) strain SUT 47; (COM) compost; (Ctl) control; (BS) bulk soil; (2, 5, 8) weeks after inoculation. Each strain is indicated by dash lines.

the effects of more roots developed in soil volume might bring about changes in microbial community structure. The results obtained from PCA analysis demonstrated that each archaeobacterial and fungal community structure at 5th and 8th week was not as clearly shifted as in DGGE. This might be due to higher rhizosphere/bulk soil ratio cause more active soil or special soil properties than in the field. For the DGGE and PCA, results from field experiment conducted between January and March 2009 showed the similar results with the crop in July to September 2009 (S2 and S3).

To understand the ecological impact of PGPR on microbial community structure is an important issue when attempting to

better define usage conditions for these inoculants. The DGGE fingerprints displayed that compost did not have any influence on microbial community structure. Our result correspond to Inbar et al. [40] who found similar response of microbial community structure that was detected when compost was applied to soil at high levels. However, all stages of plant growth showed the distinct profile characteristics. This also implies that plant age is a major factor influencing rhizobacterial community structure [41]. The biological processes in the rhizosphere are strongly influenced by plant root exudates, which consist of easily degradable organic compounds that might attract and stimulate microbial growth [42]. In addition, changing of root morphology and root exudation



**Fig. 2.** Community structure of soil microorganism from field experiment. Dendrograms of soil microorganism based on PCR–DGGE bands. (A) Bacterial community structure; (B) Archeobacterial community structure; (C) Fungal community structure. Letters indicate the inoculated treatments; (AB) *Azotobacter* sp.; (AS) *Azospirillum* sp.; (S19) strain SUT 19; (S47) strain SUT 47; (COM) compost; (Ctrl) control; (BS) bulk soil; (2, 5, 8) weeks after inoculation.

driving maize development might dictate the community patterns of eubacteria and fungi [43]. Some previous studies also report that the plant development is a major cause for microbial community changes in rhizosphere soil [44,45].

### 3.5. DGGE analysis of forage corn rhizosphere microbial community

Some of DGGE bands in Fig. 2A and C were excised and subsequently sequenced (Table 4). The major eubacterial groups from forage corn rhizosphere soil in field experiment were gamma

proteobacteria and members of the uncultured bacteria. Root associated bacterial population was diverse but some species certainly appeared in all plant development such as bacterial species closely related to *Enterobacter* sp. and uncultured cyanobacterium (B2 and B7, respectively). Both species of uncultured bacteria and *Paenibacillus* sp. (B3 and B4, respectively) appeared only at 2nd week of planting. Only Uncultured Firmicutes bacterium (B9) was found at 5th week of planting and disappeared at 8th week. Several species were found at only 8th week of planting such as uncultured bacteria and uncultured *Chloroflexi* bacterium (B1, B5,



B6, and B8, respectively). Some previous studies also report that the *Enterobacter* sp. can colonize root and promote growth of maize in pot experiment [46]. The result displayed that the *Enterobacter* sp. appeared in all stages of plant development. These results implied that the *Enterobacter* sp. might be indigenous species in SUT farm soil. In addition, *Enterobacter* sp. 12J1 could promote growth of maize and reduce pyrene contamination in soil sample [46]. *Pae-nibacillus polymyxa* [47] and cyanogenic bacteria [48] are also widely recognized as PGPR since they could produce IAA and hydrogen cyanide (HCN), respectively.

The fungal population in field experiment showed various species on fungal community structure in rhizosphere soil. The *Thanatephorus cucumeris* was found at all stages of plant development (F2). This result implies that *T. cucumeris* is indigenous fungus in SUT farm soil. The *Basipetospora chlamydospora*, *Madurella* sp., and *Ceratobasidium* sp. (F3, F4, and F5, respectively) appeared only at 5th week of planting and *Psathyrella spadicea* (F6) persisted only 2nd week of planting. The species of *Corioliopsis gallica* (F1) appeared only at 8th week of planting. *T. cucumeris* (anamorph *Rhizoctonia solani*) is a soilborne basidiomycete that occurs worldwide and causes economically important diseases to a large variety of vegetable and field crops [49,50]. In the Philippines, this fungus causes banded leaf and sheath blight in maize [51]. However, there is no report from SUT farm regarding this disease. Most of the sampling fungal sequences in this study belong to basidiomycete genera [52–56] except *Madurella* sp. that is ascomycota [57]. They were also reviewed as general soil fungi. The results also demonstrated that our inoculated PGPR do not mainly interfere fungal community. The DGGE fingerprint revealed that the effect of PGPR inoculation was much less pronounced in the plant growth development. However, the exact mechanism of maize–microbe and microbe–microbe interactions remain to be further explored.

#### 4. Conclusions

In conclusion, inoculation of forage corn seeds with putative *Pseudomonas* sp. SUT 19 and putative *Brevibacillus* sp. SUT 47 amended with compost promotes growth and biomass of forage corn better than the commercial strains, thus they might be applied as inocula. The roles of forage corn growth promotion by PGPR might come from some other factors as ACC-deaminase, P-solubilization, etc. The impact of all tested PGPR on the indigenous soil microorganisms does not seem to have prominent effect on the structure of microbial population with respect to the control treatments. Recovered and sequenced DGGE bands showed homology with some important eubacterial and fungal groups which confirmed that inoculated PGPR do not mainly interfere with other microbes in rhizosphere. However, the plant age mainly caused a shift in the structure of indigenous microbial community at 2nd, 5th and 8th weeks after planting. Such mechanisms as plant–microbe and microbe–microbe interaction still remain to be elucidated.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by Suranaree University of Technology and the Thailand Research Fund Master Research Grants (TRF-MAG). Thanks are also extended to Dr. Issra Pramoolsook for advice and comments on the language of the manuscript.

#### Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ejsobi.2010.11.004.

#### References

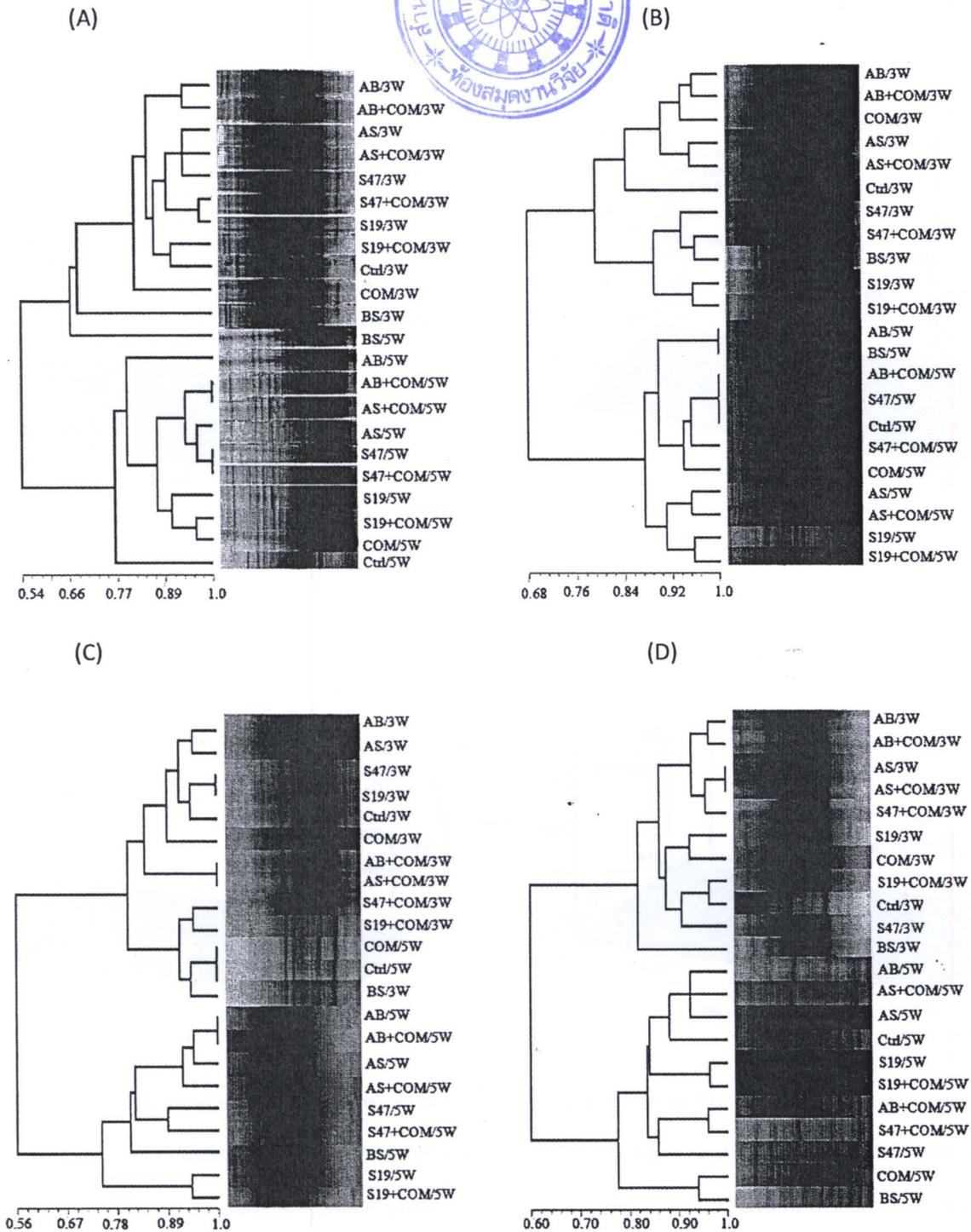
- [1] J.W. Kloepper, R. Lifshitz, R.M. Zablutowicz, Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity, *Trends Biotechnol.* 7 (1989) 39–44.
- [2] B.R. Glick, The enhancement of plant growth by free-living bacteria, *Can. J. Microbiol.* 41 (1995) 109–117.
- [3] M. Park, C. Kim, J. Yang, H. Lee, W. Shin, S. Kim, T. Sa, Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea, *Microbiol. Res.* 160 (2005) 127–133.
- [4] K.S. Andersen, A. Winding, Non-target effects of bacterial biological control agents on soil Protozoa, *Biol. Fertil. Soils* 40 (2004) 230–236.
- [5] B. Shaharoon, M. Arshad, Z.A. Zahir, A. Khalid, Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer, *Soil Biol. Biochem.* 38 (2006) 2971–2975.
- [6] P.A. Backman, P.M. Brannen, W.F. Mahaffee, Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*, in: M.H. Ryder, P.M. Stephens, G.D. Bowen (Eds.), *Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-promoting Rhizobacteria*. CSIRO Division of Soil, Adelaide, Australia, 1994, pp. 3–8.
- [7] N. Teaumroong, C. Wanapu, Y. Chankum, W. Arjham, S. Sang-Arthit, K. Teaimthaisong, N. Boonkerd, Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: a case study, in: H. Insam, I. Franke-Whittle, M. Goberna (Eds.), *Microbes at Work*. Springer, Berlin Heidelberg, 2010, pp. 293–312.
- [8] J.G. Lipman, Soil bacteriological studies. Further contributions to the physiology and morphology of the members of the *Azotobacter* group, *New Jersey Agr. Exp. Sta. Ann. Rpt.* 25, 1904, 237–289.
- [9] R.W.F. Hardy, R.D. Holsten, E.K. Jackson, R.C. Burns, The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation, *Plant Physiol.* 43 (1968) 1185.
- [10] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [11] H. Fukuhara, Y. Minakawa, S. Akao, K. Minamisawa, The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation, *Plant Cell Physiol.* 35 (1994) 1261–1265.
- [12] A. Costacurta, P. Mazzafera, Y.B. Rosato, Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts, *FEMS Microbiol. Lett.* 159 (2006) 215–220.
- [13] D.M. Penrose, B.R. Glick, Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria, *Physiol. Plant.* 118 (2003) 10–15.
- [14] E. Husen, Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro, *Indian J. Agric. Sci.* 4 (2003) 27–31.
- [15] J. Prakamhang, K. Minamisawa, K. Teaimthaisong, N. Boonkerd, N. Teaumroong, The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.), *Appl. Soil Ecol.* 42 (2009) 141–149.
- [16] L. Ovrea, L. Forney, F.L. Daee, V. Torsvik, Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saellenannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3367–3373.
- [17] D.R. Hoagland, D.I. Aron, The water culture method for growing plants without soil, *Calif. AES Circular* 347, 1950, 32–39.
- [18] A. Walkley, I.A. Black, An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method, *Soil Sci.* 37 (1934) 29–38.
- [19] J.M. Bremner, Nitrogen total, in: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston, M.E. Sumner (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods*. Soil Science Society of America Inc., Madison, 1996, pp. 1085–1122.
- [20] R. Costa, M. Götz, N. Mroczek, J. Lottmann, G. Berg, K. Smalla, Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds, *FEMS Microbiol. Ecol.* 56 (2005) 236–249.
- [21] M.M. Moeseneder, J.M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, G.J. Herndl, Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3518–3525.
- [22] M. Oros-Sichler, N. Gomes, G. Neuber, K. Smalla, A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities, *J. Microbiol. Methods* 65 (2006) 63–75.
- [23] R.G.D. Stell, J.H. Torrie, D.A. Dickey, *Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach*. McGraw-Hill, New York, 1980.
- [24] D.B. Duncan, Multiple range and multiple F tests, *Biometrics* 11 (1955) 1–42.
- [25] F.J. Rohlf, NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2 User Guide. Applied Biostatistics, Inc., New York, 2000.
- [26] J.P. Schimel, J. Bennett, Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm, *Ecology* 85 (2004) 591–602.
- [27] G. Daniel, W.R. Horwath, R.G. Joergensen, B. Ludwig, Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – a review, *Soil Biol. Biochem.* (2010) 1–10.
- [28] H. El Zemrany, J. Cortet, M. Peter Lutz, A. Chabert, E. Baudoin, J. Haurat, N. Maughan, D. Félix, G. Défago, R. Bally, Y. Moëgne-Loccoz, Field survival of the phytoestrogen *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in

- a context of decreasing nitrogen fertilisation, *Soil Biol. Biochem.* 38 (2006) 1712–1726.
- [29] F. O'Gara, K.T. Shanmugam, Control of symbiotic nitrogen fixation in rhizobia regulation of  $\text{NH}_4^+$  assimilation, *BBA Gen. Subj.* 451 (1976) 342–352.
- [30] C.L. Patten, B.R. Glick, Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid, *Can. J. Microbiol.* 42 (1996) 207–220.
- [31] C.L. Patten, B.R. Glick, Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3795.
- [32] C. Felici, L. Vettori, E. Giraldi, L.M.C. Forino, A. Toffanin, A.M. Tagliasacchi, M. Nuti, Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: effects on plant growth and rhizosphere microbial community, *Appl. Soil Ecol.* 40 (2008) 260–270.
- [33] B.R. Glick, D.M. Penrose, J. Li, A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria, *J. Theor. Biol.* 190 (1998) 63–68.
- [34] C.B. Jacobson, J.J. Pasternak, B.R. Glick, Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2, *Can. J. Microbiol.* 40 (1994) 1019–1025.
- [35] Z.A. Zahir, U. Ghani, M. Naveed, S.M. Nadeem, H.N. Asghar, Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions, *Arch. Microbiol.* 191 (2009) 415–424.
- [36] Y.P. Chen, P.D. Rekha, A.B. Arun, F.T. Shen, W.A. Lai, C.C. Young, Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities, *Appl. Soil Ecol.* 34 (2006) 33–41.
- [37] E. Baudoin, S. Nazaret, C. Mougel, L. Ranjard, Y. Moënné-Loccoz, Impact of inoculation with the phyto-stimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize, *Soil Biol. Biochem.* 41 (2009) 409–413.
- [38] B. Kumar, P. Trivedi, A. Pandey, *Pseudomonas corrugata*: a suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region, *Soil Biol. Biochem.* 39 (2007) 3093–3100.
- [39] M. Mar Vazquez, S. Cesar, R. Azcón, J.M. Barea, Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants, *Appl. Soil Ecol.* 15 (2000) 261–272.
- [40] E. Inbar, S.J. Green, Y. Hadar, D. Minz, Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*, *Microb. Ecol.* 50 (2005) 73–81.
- [41] S. Castro-Sowinski, Y. Herschkovitz, Y. Okon, E. Jurkevitch, Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms, *FEMS Microbiol. Lett.* 276 (2007) 1–11.
- [42] T.S. Walker, H.P. Bais, E. Grotewold, J.M. Vivanco, Root exudation and rhizosphere biology, *Plant Physiol.* 132 (2003) 44.
- [43] N.C.M. Gomes, H. Heuer, J. Schönfeld, R. Costa, L. Mendonca-Hagler, K. Smalla, Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis, *Plant Soil* 232 (2001) 167–180.
- [44] Y. Herschkovitz, A. Lerner, Y. Davidov, Y. Okon, E. Jurkevitch, *Azospirillum brasilense* does not affect population structure of specific rhizobacterial communities of inoculated maize (*Zea mays*), *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 1847–1852.
- [45] Y. Herschkovitz, A. Lerner, Y. Davidov, M. Rothballer, A. Hartmann, Y. Okon, E. Jurkevitch, Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*), *Microb. Ecol.* 50 (2005) 277–288.
- [46] X. Sheng, X. Chen, L. He, Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge, *Int. Biodegradation Biodegradation* 62 (2008) 88–95.
- [47] F.F. Da Mota, E.A. Gomes, L. Seldin, Auxin production and detection of the gene coding for the Auxin Efflux Carrier (AEC) protein in *Paenibacillus polymyxa*, *J. Microbiol.* 46 (2008) 257–264.
- [48] A. Owen, R. Zdor, Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine, *Soil Biol. Biochem.* 33 (2001) 801–809.
- [49] M.C. Julián, J. Acero, O. Salazar, J. Keijer, Mating type-correlated molecular markers and demonstration of heterokaryosis in the phytopathogenic fungus *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) AG 1-IC by AFLP DNA fingerprinting analysis, *J. Biotechnol.* 67 (1999) 49–56.
- [50] A.F. Justesen, D. Yohalem, A. Bay, M. Nicolaisen, Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers, *Mycol. Res.* 107 (2003) 1323–1331.
- [51] C.B. Pascual, T. Todab, A.D. Raymond, M. Hyakumachib, Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize, *Plant Pathol.* 49 (2001) 108–118.
- [52] J.M. Carbajo, H. Junca, M.C. Terrón, T. González, S. Yagüe, E. Zapico, A.E. González, Tannic acid induces transcription of laccase gene *cglc1* in the white-rot fungus *Coriolopsis gallica*, *Can. J. Microbiol.* 48 (2002) 1041–1047.
- [53] A.M. Hietala, K. Korhonen, R. Sen, An unknown mechanism promotes somatic incompatibility in *Ceratobasidium bicorne*, *Mycologia* 95 (2003) 239.
- [54] D.I.L. Murray, L.L. Burpee, *Ceratobasidium cereale* sp. nov., the teleomorph of *Rhizoctonia cerealis*, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82 (1984) 170–172.
- [55] M. Vašutová, Taxonomic studies on *Psathyrella* sect. *Spadiceae*, *Czech Mycol.* 60 (2008) 137–171.
- [56] J. Sllgiyama, H. Ogawa, Plectomycetes: biotechnological importance and systematics. in: D.K. Arora, P.D. Bridge, D. Bhatnagar (Eds.), *Handbook of Fungal Biotechnology*. Marcel Dekker, New York, 2004, p. 429.
- [57] A. Ahmed, W. Van De Sande, H. Verbrugh, A. Fahal, A. Van Belkum, *Madurella mycetomatis* strains from mycetoma lesions in Sudanese patients are clonal, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 4537.

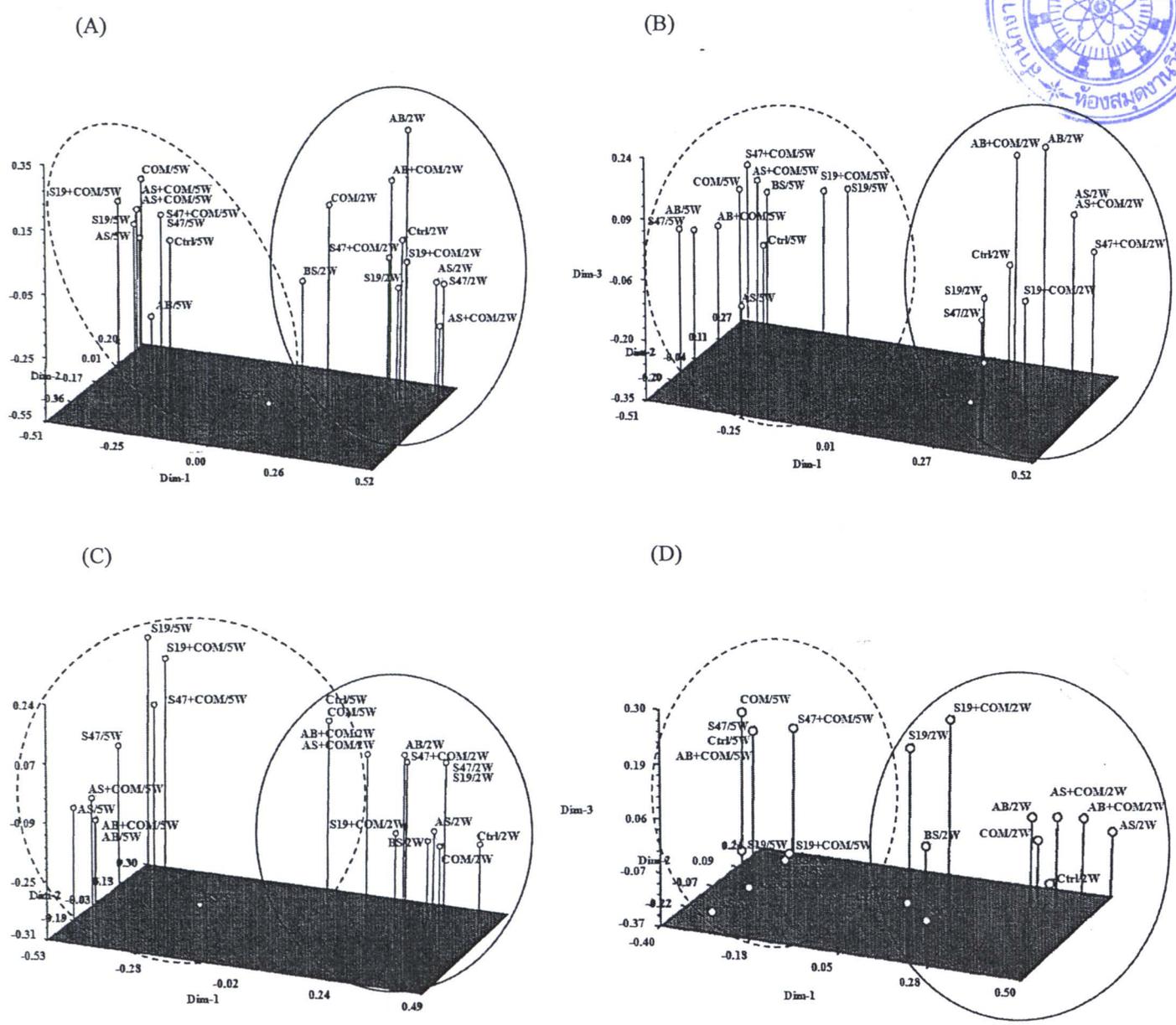
**Table S1.** The effect of PGPR on plant biomass in pot/field experiment

Treatments	January 2009 – March 2009					
	Pot experiments				Field experiments	
	Shoot dry weight (g)		Root dry weight (g)		Shoot dry weight (g)	
	2 <sup>nd</sup> week	5 <sup>th</sup> week	2 <sup>nd</sup> week	5 <sup>th</sup> week	2 <sup>nd</sup> week	5 <sup>th</sup> week
Control	1.04±0.30 <sup>a</sup>	11.52±3.15 <sup>a</sup>	0.63±0.15 <sup>a</sup>	1.24±0.10 <sup>a</sup>	1.04±0.21 <sup>a</sup>	8.69±3.78 <sup>a</sup>
Compost	1.02±0.10 <sup>ab</sup>	13.54±1.79 <sup>a</sup>	0.65±0.21 <sup>a</sup>	1.59±0.09 <sup>abc</sup>	1.02±0.14 <sup>a</sup>	10.09±2.17 <sup>ab</sup>
<i>Azotobacter</i> sp.	0.96±0.17 <sup>ab</sup>	14.56±3.25 <sup>a</sup>	0.65±0.10 <sup>a</sup>	1.37±0.19 <sup>a</sup>	0.96±0.08 <sup>a</sup>	10.87±1.04 <sup>ab</sup>
<i>Azotobacter</i> sp. + Compost	1.06±0.19 <sup>b</sup>	15.28±4.58 <sup>a</sup>	1.75±0.35 <sup>a</sup>	1.48±0.11 <sup>ab</sup>	1.06±0.14 <sup>a</sup>	12.61±2.39 <sup>b</sup>
<i>Azospirillum</i> sp.	1.00±0.32 <sup>ab</sup>	13.78±1.57 <sup>a</sup>	0.74±0.11 <sup>a</sup>	2.02±0.11 <sup>cde</sup>	1.00±0.18 <sup>a</sup>	9.97±1.60 <sup>ab</sup>
<i>Azospirillum</i> sp. + Compost	1.07±0.24 <sup>ab</sup>	14.27±1.29 <sup>a</sup>	0.78±0.23 <sup>a</sup>	2.31±0.10 <sup>def</sup>	1.07±0.28 <sup>a</sup>	9.76±1.67 <sup>ab</sup>
SUT19	0.85±0.13 <sup>ab</sup>	14.09±2.27 <sup>a</sup>	0.71±0.23 <sup>a</sup>	1.89±0.13 <sup>bcd</sup>	0.85±0.26 <sup>a</sup>	11.49±1.37 <sup>ab</sup>
SUT19 + Compost	0.92±0.18 <sup>ab</sup>	16.87±3.50 <sup>ab</sup>	0.91±0.52 <sup>a</sup>	2.77±0.26 <sup>f</sup>	0.92±0.16 <sup>a</sup>	12.95±2.37 <sup>b</sup>
SUT47	1.01±0.32 <sup>ab</sup>	15.67±1.27 <sup>a</sup>	0.96±0.19 <sup>a</sup>	1.55±0.33 <sup>abc</sup>	1.01±0.17 <sup>a</sup>	9.47±2.17 <sup>ab</sup>
SUT47 + Compost	1.14±0.17 <sup>b</sup>	22.15±2.88 <sup>b</sup>	0.90±0.40 <sup>a</sup>	2.44±0.53 <sup>cf</sup>	1.14±0.18 <sup>a</sup>	11.27±2.47 <sup>b</sup>
F- test	*	*	ns	**	ns	*
%CV	21.61	26.11	29.18	12.77	19.26	20.79

Mean values within a column followed by different letters were significantly different according to the DUNCAN's test,  $P \leq 0.05$  (\*),  $P \leq 0.01$  (\*\*), ns = non significant



**Fig. S2** Community structure of soil microorganism from pot and field experiment. Dendrograms of soil microorganism based on PCR-DGGE bands. (A) Bacterial community structure from pot experiment; (B) Bacterial community structure from field experiment; (C) Fungal community structure from pot experiment; (D) Fungal community structure from field experiment. Letters indicate the inoculated treatments; (AB) *Azotobacter* sp.; (AS) *Azospirillum* sp.; (S19) strain SUT19; (S47) strain SUT47; (COM) compost; (Ctrl) control; (BS) bulk soil; (2, 5) weeks after inoculation.



**FIG. S3** The community analysis derived three-dimensional plot based on the first three principal coordinates from a principal coordinates analysis (PCA) of maize rhizosphere. (A) PCA of bacteria in pot experiment; (B) PCA of fungi in pot experiment; (C) PCA of bacteria in field experiment; (D) PCA of fungi in field experiment. Letters indicate the inoculated treatments; (AB) *Azotobacter* sp.; (AS) *Azospirillum* sp.; (S19) strain SUT19; (S47) strain SUT47; (COM) compost; (Ctrl) control; (BS) bulk soil; (2, 5) weeks after inoculation; —, and show a trend of 2 and 5 week, respectively after inoculation are different from each other.

