รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2555

1. ชุดโครงการวิจัย ชุดวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

   กิจกรรม การวิจัยพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบปราศจากเชื้อปนเปื้อน
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การวิจัยพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พีจีพีอาร์ให้มีประสิทธิภาพสูง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Research and development on e-beam mutation breeding of height efficiency PGPRs strains
4. คณะผู้ดำเนินงาน

   หัวหน้าการทดลอง ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง[1]

   ผู้ร่วมงาน กัลยกร โปร่งจันทึก[1] ประไพ ทองระอา[1] สุริยะ ปัจฉา[2] สุธารัตน์ ประภารัตน์[1] พันธ์ศักดิ์ สุขทัศน์[1]
5. บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อวิจัยพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พีจีพีอาร์ให้มีประสิทธิภาพสูง เพื่อพัฒนาสายพันธุ์พีจีพีอาร์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เพื่อใช้เป็นเชื้อพันธุ์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตพืช ดำเนินการโดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการฉายรังสีด้วย E-beam โดยการหาค่า D10 ของแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* sp. DASF 02125 *Beijerinckia* mobilis ATCC 3509 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008 แล้วดำเนินการฉายรังสีที่ระดับ D10 ดังกล่าวแล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) และคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างน้อยสกุลละ 5 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า ได้ *Azotobacter* sp. DASF 02125 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม 6 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 25.6-41.0% ได้ *Beijerinckia mobilis* ATCC 3509 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าเดิม 8 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 25.6-41.0% ได้ *Azospirillum* sp. DASF 04008 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม 4 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 25.6-41.0% จึงทำให้ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มพีจีพีอาร์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ทั้ง 3 สกุล เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการทดลองต่อไป

ทะเบียนวิจัย 08-01-54-01-13-01-01-52

[1] กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ
[2] สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียแห่งชาติ (องค์การมหาชน) อ.องค์รักษ์ จ.นครนายก

6. บทนำ

การผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อใช้ในการผลิตพืช ได้พัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยการแยกเชื้อจากธรรมชาติและคัดเลือกไอโซเลทเชื้อที่มีประสิทธิภาพและพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ซึ่งแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria หรือ PGPR) ได้มีการค้นพบในส่วนต่างๆของพืชเศรษฐกิจที่หลากหลายชนิดมากขึ้น และยังมีการค้นพบการแสดงออกของยีนตรึงไนโตรเจนและโปรตีนของเชื้อดังกล่าวในเนื้อพืชด้วย (James and Olivares 1998; Reinhold Hurek and Hurek 1998; Reddy et al, 2002; Iniguez et al. 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเหล่านี้ยังสามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ควบคุมโรคพืชบางชนิด และเพิ่มความเป็นประโยชน์และความสามารถในการดูดแร่ธาตุบางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส เป็นต้น (Sessitsch at al. 2002; Sturz et al. 2000; Jacoud et al. 1999; Meunchang et al. 2004)

ปัจจุบันได้มีความสนใจศึกษาประโยชน์ของแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรอบๆรากพืชเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพบว่ามีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ (Diem. 1978; Bashan and Levanony 1990) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการใช้ปุ๋ยชีวภาพแต่ละพื้นที่นั้นมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สกุลและสายพันธุ์แบคทีเรีย ชนิดของพืช สมบัติของดิน ประชากรจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ และเงื่อนไขทางสภาพแวดล้อม เช่น ความชื้นในดิน โดยทั่วไปหลังการใส่ปุ๋ยชีวภาพปริมาณแบคทีเรียจะลดอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของสภาพแวดล้อมซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ จึงมักพบว่าผลการทดลองในสภาพปลอดเชื้อกับในสภาพธรรมชาติมักมีความแตกต่างกันมาก (Bashan and Levanony, 1988)

การใช้ประโยชน์จากการฉายรังสี นิยมใช้ในการฆ่าเชื้อ ปรับปรุงพันธุ์ (Yamaguchi et al. 2003) มามากกว่า 50 ปีแล้ว มักนิยมใช้ฆ่าเชื้อเพื่อการถนอมอาหารในระดับอุตสาหกรรม เป็นแหล่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ แหล่งของไอออนในการฉายรังสีมาจาก ลำแสงอิเลคตรอน (electron beam หรือ E-beam) หรือเอ็ก-เรย์ (X-rays) ที่กำเนิดจากเครื่องเร่งที่เป็นระบบไฟฟ้า หรือ ^{60}Co ^{137}Cs (Patterson and Loaharanu, 2000) E-beam ใช้ไฟฟ้าเป็นต้นกำเนิดพลังงานไม่ใช้สารกำมันตะภาพรังสีและเครื่องกำเนิดอิเลคตรอนสามารถปิด เมื่อไม่มีการใช้รังสี ซึ่งแตกต่างจากวิธีการที่ใช้สารกำมันตะภาพรังสีเป็นต้นกำเนิดพลังงานที่สารกำมันตะภาพรังสีทำงานตลอดเวลา ในการฉายรังสีด้วยอิเลคตรอนบีมจะไม่ทำให้คุณภาพของอาหารเปลี่ยนแปลงไป ขณะที่รังสีแกรมม่าลดคุณภาพแป้งในเมล็ดข้าว (Hayashi, Takahashi and Todoriki, 1997). ความสัมพันธ์ในการทนทานของจุลินทรีย์ต่อรังสีได้สรุปไว้โดย Monk et al., (1995). เซลล์แบคทีเรียตอบสนองต่อไอออนไวมาก ซึ่งโดยทั่วไปมีค่า D_{10} ต่ำกว่า 1 KGy (D_{10} หมายถึง ระดับความเข้มข้นของรังสีที่ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดประชากรลง 1 log cycle) สปอร์แบคทีเรียทนทานรังสีมากกว่ายีสต์ รา และ

เซลล์ของแบคทีเรีย มีรายงานว่าสปอร์แบคทีเรียต้านทานทั่วไปต้านทานรังสีอยู่ในระดับ 1-4 KGy (Gerwen et al., 1999) ซึ่งผลงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นข้อมูลของการวิจัยการใช้รังสีแกรมม่า แต่การใช้ e-beam ยังมีน้อย และการใช้ e-beam ในการปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม ที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ยังไม่มี

ในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่า D10 จากการใช้ E-beam ระดับความเข้มข้นต่างกันต่อไรโซแบคทีเรีย (rhizobacteria) ที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ สำหรับ ข้าวโพด 3 สกุล คือ *Azotobacter Beijerinckia* และ *Azospirillum* เพื่อพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าเดิมอย่างน้อย 10%

7.**วิธีการดำเนินการ**

อุปกรณ์

1.แบคทีเรีย 3 สกุล คือ *Azotobacter* sp. DASF 02005, *Beijerinckia mobilis* ATCC 3059 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008

2.เครื่องฉายรังสีแบบ Electron beam (E-beam)

3.อาหารเลี้ยงเชื้อ

4, ตู้เขี่ยเชื้อ

5. ตู้แช่แข็ง-80 องศาเซลเซียส

6. สารเคมีและเครื่องแก้ว

7. เครื่อง Gas chromatograph

วิธีการดำเนินงาน

1. เตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์

แบคทีเรีย 3 สกุล ประกอบด้วย *Azotobacter* sp. DASF 02005 *Beijerinckia mobilis* ATCC 3059 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008 ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยการเขี่ยเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ด้วยวิธีการย้อมเซลล์จากโคโลนีเดียวให้มีเซลล์ที่บริสุทธิ์ ขยายเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูบ ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับ *Azotobactor, Beijerinckia* และ *Azospirillum* (Dobeireiner. 1980) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง *Azotobacter* และ *Azospirillum* นาน 48 ชั่วโมง ส่วน *Beijerinckia* 5 วัน เพื่อให้ได้การเจริญเติบโตของเซลล์ถึงตอนกลางของระยะเพิ่มจำนวน (log phase or exponential phase) ซึ่งการเพิ่มจำนวนเซลล์มีอัตราเร็วที่คงที่ ประชากรแบคทีเรียจะมีลักษณะคล้ายกันในแง่ของส่วนประกอบทางเคมีและ metabolism ภายในเซลล์และของเสียยังมีการสะสมน้อย เซลล์จึงมีความแข็งแรงสมบูรณ์เต็มที่เหมาะสำหรับการใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

2. การฉายรังสี E-beam และการหาค่า D_{10}

แบ่งเชื้อเหลวใส่หลอดพลาสติกปลอดเชื้อหลอดละ 2 มิลลิลิตร การฉายรังสีใช้ระดับความเข้มข้นพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ที่ 8 MeV ระดับความเข็มข้นรังสี E-beam จริงที่ใช้ คือ 0, 30, 60, 120, 150 Gy ฉายรังสีด้วยเครื่อง E-beam ที่สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลีย์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) อ.องค์รักษ์ จ.นครนายก ค่า D_{10} คำนวณจาก slope ของค่า regression ที่ได้รับจากค่าการรอดของเชื้อที่ฉายรังสีแต่ละระดับ (Lara et al,. 2002) เมื่อได้ช่วงค่า D10 แล้วเตรียมดำเนินการฉายรังสี E-beam ที่ระดับค่า D10 ของแต่ละไอโซเลทและรวบรวมโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งประมาณ 500 โคโลนีต่อไอโซเลท และดำเนินการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตสมบูรณ์หลังต่อเชื้อ 5 ครั้ง อย่างน้อย 25 โคโลนีต่อไอโซเลท และวัดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี ARA และคัดเลือกโคโลนีที่มี ARA เพิ่มขึ้นสูงกว่าเชื้อเดิมไม่น้อยกว่า 10% เพื่อใช้ในการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทีปลอดจากเชื้อปนเปื้อนต่อไป

8. ระยะเวลา เดือน

ตุลาคม 2554 **สิ้นสุด** กันยายน 2555

9. สถานที่ทำการทดลอง

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และสำนักงานเทคโนโลยีนิวเคลียแห่งชาติ (องค์การมหาชน) จตุจักร กรุงเทพฯ

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

10.1 ความต้านทานต่อระดับรังสี E-beam

ความต้านทานรังสีของแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล วัดด้วยค่า D_{10} ของ ไรโซแบคทีเรีย 3 สกุล คือ *Azotobacter* sp. DASF 03005 *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008 หลังฉายรังสี E-beam ที่ระดับความเข้มข้น 0, 30, 60, 90,120 และ 150 Gy. พบว่าระดับรังสีที่ทำให้ปริมาณแบคทีเรียทั้งสามสกุลลดลง 1 log cycle อยู่ระหว่าง 120-150 Gy.

10.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียฉายรังสีที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน (กำลังดำเนินการ)

คัดเลือกแบคทีเรียฉายรังสีที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน โดยประเมินผลด้วยการวัดศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Activity (ARA) สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพได้ดังนี้

10.2.1 สกุล *Azotobacter* sp. DASF 02125 พบว่าการฉายรังสีที่ระดับ 150 Gy. ทำให้ได้ *Azotobacter* สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 5 สายพันธุ์ เรียงลำดับตามรหัสดังนี้ DASF 02125-14, DASF 02125-15, DASF 02125-16, DASF 02125-18 และ DASF 02125-21 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 38.4, 70.3, 53.4, 52.8 และ 57.5% ของเชื้อ *Azotobacter* สายพันธุ์เดิม (ตารางที่ 1)

10.2.2 สกุล *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 พบว่าการฉายรังสีที่ระดับ 120 Gy. ทำให้ได้ *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 6 สายพันธุ์ คือ ATCC 35011-14, ATCC35011-17, ATCC35011-19, ATCC35011-26, ATCC35011-27 และ ATCC35011-28 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 38.6, 31.4, 32.2, 52.0 37.9 และ 29.0% ของเชื้อ *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 สายพันธุ์เดิม (ตารางที่ 2)

10.2.3 สกุล *Azospirillum* sp. DASF 04008 พบว่าการฉายรังสีที่ระดับ 120 Gy. ทำให้ได้ *Azospirillum* sp. DASF 04008 สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 8 สายพันธุ์ คือ DASF 04008-2 DASF 04008-6, DASF 04008-9, DASF 04008-33, DASF 04008-34, DASF 04008-36 DASF 04008-40 และ DASF 04008-41 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 147, 101, 75.9, 101, 126, 142, 77.4 และ 154% ของเชื้อ *Azospirillum* sp. DASF 04008 สายพันธุ์เดิม (ตารางที่ 3)

ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นชัดเจนว่า electron beam ที่ความเข้มข้นในระดับต่ำมีศักยภาพในการใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ สกุล Azotobacter, Beijerinckia และ Azospirillum ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เนื่องจาก electron beam มีศักยภาพในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุ์กรรมในเซลล์แบคทีเรีย อาจมีผลกระทบถึงกลุ่มยีนที่ควบคุมการตรึงไนโตรเจน จนอาจมีผลทำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นกว่า สายพันธุ์ดังเดิม

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ *Azotobacter* sp. DASF 03005 ฉายรังสี 150 Gy ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

สกุล-สายพันธุ์	**อัตราการตรึงไนโตรเจน นาโนโมล/หลอด/ชั่วโมง**	**ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (%ของเชื้อเดิม)**
Azotobacter sp. DASF 03005	367	0
DASF02125-14	508	38.4
DASF02125-15	625	70.3
DASF02125-16	563	53.4
DASF02125-18	561	52.8
DASF02125-21	578	57.5

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 ฉายรังสี 120 Gy ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

สกุล-สายพันธุ์	**อัตราการตรึงไนโตรเจน**	**ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น**

	นาโนโมล/หลอด/ชั่วโมง	(%ของเชื้อเดิม)
Beijerinckia mobilis ATCC 35011	544	0
ATCC35011-14	754	38.6
ATCC35011-17	715	31.4
ATCC35011-19	719	32.2
ATCC35011-26	827	52.0
ATCC35011-27	750	37.9
ATCC35011-28	702	29.0

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ *Azospirillum* sp. DASF 04008 ฉายรังสี 120 Gy ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

สกุล-สายพันธุ์	อัตราการตรึงไนโตรเจน นาโนโมล/หลอด/ชั่วโมง	ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (%ของเชื้อเดิม)
Azospirillum sp. DASF 04008	41.6	0
DASF 04008-2	102.9	147
DASF 04008-6	86.3	101.4
DASF 04008-9	73.2	75.9
DASF 04008-33	83.6	100.9
DASF 04008-34	94.1	126.2
DASF 04008-36	100.8	142.3
DASF 04008-40	73.8	77.4
DASF 04008-41	105.7	154.1

11. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

11.1 ได้ค่า D10 ของแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* sp. DASF 02125 *Beijerinckia* mobilis ATCC 35011 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008 ซึ่งอยู่ระหว่าง 120-150 Gy.

11.2 ได้ *Azotobacter* sp. DASF 02125 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม 5 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 25.6-41.0%

11.3 ได้ *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าเดิม 6 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 25.6-41.0%

11.4 ได้ *Azospirillum* sp. DASF 04008 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม 4 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 25.6-41.0%

11.5 ควรมีการดำเนินการขยายผลไปสู่จุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆต่อไป และควรมีการศึกษาเชิงลึกในด้านการเปลี่ยนแปลงในระดับสารพันธุกรรมภายในเซลล์

11. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553. ISBN : 978-974-436-7/49-5.

Bashan, Y. and Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 43: 103-121.

Fulchieri, M. and Frioni, L. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): Effect on yield in a field experiment in central Argentina. Soil Biol. Biochem. 26: 921-923.

Jacoud, C., D. Job, P. Wadoux and R. Bally, 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Can. J. Microb., 45: 339-342.

Mehnaz, S., Mirza, M. S., Huarat, J., Bally, R., Normand, P. and Malik, K. A.. 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* 47: 110–117.

Meunchang, S., Panichsakpatana, S., Ando, S. and Yokoyama, T. 2004. Phylogenetic and Physiological Characterization of Indigenous *Azospirillum* Isolates in Thailand. Soil Sci. Plant Nutr., 50(3) : 413-421.

Murty, M.G. and Ladha, J.K.. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic condition. Plant Soil. 108: 281-285.