ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2

Effect of Phosphate-Solubilizing Bacteria, *Burkholderia* sp. Strain Rs01, on Growth of Insee 2 Sweet Corn

สุภาพร จันรุ่งเรือง[1], เบญจมาส รสโสภา[1] และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์[1]*

Supaporn Junrungreang[1], Benjamas Rossopa[1] and Kannika Sajjaphan[1]

ABSTRACT

Bacteria that were able to solubilize phosphate available to plant from tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$), ferric phosphate ($FePO_4$) and aluminum phosphate ($AlPO_4$) were isolated and their effectiveness on promoting the growth of Insee2 sweet corn was studied. Paddy acid sulfate soils of Rangsit soil series were the sources of the bacteria which were isolated by using National Botanical Research Institue phosphate growth medium (NBRIP). NBRIP was used also for other purposes: acclimation, maintenance and cultivatuion of the bacteria. Six pure isolates encoded Rs01-06 were obtained and it was observed that isolate Rs01 best solubilized tricalcium phosphate releasing inorganic phosphate of approximately 878.5 mgP/l after three days of incubation. This isolate was taxonomically identified as *Burkholderia multivarans* according to Biolog microlog identification system and its effectiveness on promoting the growth of Insee2 sweet corn growing in Takli soil in pots was studied. The pot experiment was of completely ramdomized design (CRD) with 4 treatments (6 replications). The results showed that the inoculation of strain *Burkholderia multivarans* Rs01 in combination with the applications of urea and potassium chloride more supported ($p \leq 0.01$) growth of the tested sweet corn than chemical fertilizers when stem height, circumference and dried weights of leaves and stems of 54 days old Insee2 sweet corn were the growth parameters.

Key words: Phosphate solubilizing bacteria, Corn, Phosphorus

[1*] ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Soil Science, Kasetsart University, Cha-tuchak, Bangkok, 10900, Thailand.

* Corresponding author : Phone: 02-942-8104-5 Fax: 02-942-8106, E-mai address: agrkks@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งเป็นการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในรูปไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($Ca_3(PO_4)_2$ เฟอร์ริกฟอสเฟต ($FePO_4$) และอลูมินัมฟอสเฟต ($AlPO_4$) ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ และผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 จากการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินนากรดกำมะถัน (paddy acid sulfate soil) ชุดดินรังสิต ในอาหาร National Botanical Research Institue' phosphate growth medium (NBRIP) และใช้อาหาร NBRIP สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตตลอดการศึกษาในครั้งนี้ ผลการทดลองพบว่า คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้จำนวน 6 ไอโซเลต (Rs01-06) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 มีประสิทธิภาพในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต($Ca_3(PO_4)_2$)ได้ 878.5 มก.ฟอสเฟต/ล. หลังจากการบ่มเชื้อไว้ 3 วัน จากนั้นทำการจำแนกชนิดของสายพันธุ์ Rs01 โดยการทดสอบแหล่งคาร์บอนด้วยวิธี Biolog microlog system พบว่าเป็น *Burkholderia multivarans* จากนั้นทำการศึกษาผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต Rs01 ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ในชุดดินตาคลี โดยวางแผนการทดลองแบบ completely ramdomized design (CRD) มี 4 ตำรับการทดลอง จำนวน 6 ซ้ำ พบว่า การเติม *Burkholderia multivarans* สายพันธุ์ Rs01 ร่วมกับการใส่ยูเรียและโพแทสเซียมคลอไรด์ ทำให้ความสูง เส้นรอบวง น้ำหนักแห้งของลำต้นและใบของข้าวโพดหวานที่ระยะออกไหม (54 วัน) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) เมื่อเทียบกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมร่วมกัน

คำสำคัญ: แบคทีเรียละลายฟอสเฟต ข้าวโพด ฟอสฟอรัส

คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่จำกัดการเจริญเติบโตของพืช (Igual *et. al*., 2001) โดยฟอสฟอรัสจะทำให้พืชมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแป้ง กระบวนการถ่ายทอดพันธุกรรม การตรึงไนโตรเจน การออกดอก การออกผลและเมล็ด และการสุกของผล (Brady and Weil, 2008; Mehrvarz *et. al*., 2008) พืชที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสจะทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ลำต้นแคระแกร็น ผอม สูง ใบมีขนาดเล็กลง จำนวนใบลดลง และเป็นสีเขียวเข้มออกน้ำเงิน (Brady and Weil, 2008) ดินในประเทศไทยโดยภาพรวมพบว่ามีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ (Chinabut, 2003) การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็น การขาดธาตุฟอสฟอรัสในดินเป็นปัจจัยทางด้านเคมีที่สำคัญในการกำหนดผลผลิต การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายได้ (soluble phosphate fertilizer) เช่น ซูเปอร์ฟอสเฟต เป็นการทดแทนปริมาณฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในปริมาณน้อยในดิน แต่อย่างไรก็ตามปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายได้ที่ใส่จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับไอออนในดินและปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายได้จะถูกเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Stevenson, 1986; Mclaughlin *et. al*., 1988) พื้นที่การเกษตรส่วนใหญ่มีฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดินเป็นจำนวนมากซึ่งมาจากการสะสมอย่างต่อเนื่องของการใช้ปุ๋ยเคมี โดยส่วนมากฟอสเฟตที่ละลายได้ที่ใส่ลงไปในดิน จะถูกตรึงให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ และไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช ซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากการใส่ปุ๋ยเคมี (Lindsay, 1989) การตรึงและการตกตะกอนฟอสเฟตในดินขึ้นอยู่กับ pH ของดินและชนิดดิน ในดินกรดจะมีออกไซด์อิสระและไฮดรอกไซด์ของพวก Al และ Fe ที่ตรึงฟอสฟอรัสให้

อยู่ในรูปของ ferric phosphate ($FePO_4$) และ aluminum phosphate ($AlPO_4$) ในสภาพดินด่าง ฟอสฟอรัสจะถูกตรึงโดย Ca ทำให้เกิด calcium orthrophosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) สารประกอบเหล่านี้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้น้อย

จุลินทรีย์ดินมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนรูปของธาตุอาหารต่างๆในดิน รวมทั้งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตซึ่งมีอิทธิพลต่อการปลดปล่อยฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ดินที่สามารถละลายหรือปลดปล่อยฟอสเฟตจากรูปของสารอนินทรีย์หรืออินทรีย์ในดิน เพื่อประโยชน์ต่อจุลินทรีย์และพืช จุลินทรีย์ดินเองก็เป็นแหล่งของฟอสเฟตอินทรีย์ ซึ่งมีศักยภาพที่จะปลดปล่อยให้แก่พืชเมื่อตายและถูกย่อยสลาย จุลินทรีย์มีกลไกในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสให้เป็นประโยชน์กับพืชแตกต่างกันออกไป (Salehrastin, 1999) เช่น กระบวนทำให้เกิดกรด (acidification) กระบวนการคีเลต (chelation) และกระบวนการแลกเปลี่ยน (exchange) (Gerke, 1992 ; Dadarwal, 1997 ; Yadav and Dadarwal, 1997) แต่ส่วนใหญ่การละลายฟอสเฟตเป็นผลมาจากการสร้างกรดโดยจุลินทรีย์ (Illmer and Schinree, 1992) นอกจากนี้จุลินทรีย์ดินยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของรากพืชในการดูดซับฟอสเฟต แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากดินมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Burkholderia, Achromobacter, Agrobacterium, Micrococcus, Aerobacter, Flavobacterium* และ *Erwinia* แบคทีเรียละลายฟอสเฟตเหล่านี้พบได้ในดินและในดินบริเวณรอบรากพืช (Sperberg, 1958; Katznelson *et. al*., 1962; Raghu and MacRae, 1996; Alexander, 1977) ในดินส่วนใหญ่ที่ขาดฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช จะส่งผลต่อต้นทุนการผลิตที่สูงมากเนื่องจากการใช้ปุ๋ยฟอสเฟต ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นทั่วโลก การนำจุลินทรีย์ดินมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์นั้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษา ถึงแม้ว่าที่ผ่านมามีการคัดแยกและศึกษาจุลินทรีย์ดินที่มีความสามารถในการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์มากมาย แต่การนำไปใช้ยังอยู่ในวงจำกัด เนื่องจากไม่เข้าใจถึงปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) เฟอร์ริกฟอสเฟต (ferric phosphate, $FePO_4$) และอลูมินัมฟอสเฟต (aluminum phosphate, $AlPO_4$) ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์เหล่านี้ และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตสูงสุด เพื่อนำมาศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการละลายฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ในชุดดินตาคลี

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินประเภทดินนากรดกำมะถัน (paddy acid sulfate soils) ชุดดินตัวแทน คือ ชุดดินรังสิต ที่จะนำมาคัดแยกแบคทีเรีย บริเวณ ต.คลองเจ็ด อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี โดยเก็บดินที่ความลึก 0-10 ซม. แล้วนำตัวอย่างดินแช่น้ำแข็งในถังน้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งทำการคัดแยกแบคทีเรีย

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินด้วยเทคนิค enrichment culture

คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizing bacteria, PSB) ด้วยวิธี enrichment culture ทำโดยนำดินจำนวน 5 ก. ใส่ลงในขวดชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว NBRIP (National Botanical Research Institute phosphate growth medium) ที่มีการเติม $AlPO_4$ จำนวน 5 ก./ล. ปริมาตร 50 มล. นำไปบ่มให้เชื้อเจริญบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำสารละลายดินที่ได้ ปริมาตร 5 มล. มาใส่ลงในขวดชมพู่ขวดใหม่ที่บรรจุอาหารเหลวชนิดเดิม ปริมาตร 50 มล. นำไปบ่มให้เชื้อเจริญบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ทำการถ่ายเชื้อเช่นนี้ ทุก 7 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ภายหลังทำการถ่ายสารละลายดินครบ 6 สัปดาห์ นำสารละลายดินปริมาตร 0.1 มล. มาทำให้กระจายบนอาหารแข็ง NBRIP บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญของ PSB โดยสังเกตเห็นบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) ของเชื้อ

การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในรูปที่ละลายได้น้อย

นำโคโลนีที่มีความสามารถในการทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยแยกเชื้อซ้ำบนอาหารแข็ง NBRIP ที่มีการเติม $AlPO_4$ จานใหม่จนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ โดยสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 6 ไอโซเลตจากนั้นนำ PSB ทั้ง 6 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$ และ $AlPO_4$ โดยเลี้ยง PSB ในอาหารเหลว NBRIP ปริมาตร 30 มล. ที่เติม $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$ หรือ $AlPO_4$ จำนวน 5 ก. บ่มไว้ที่ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นเก็บอาหารเหลวดังกล่าวข้างต้น มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm แล้วนำสารละลายใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาตรฟอสเฟตที่ละลายได้โดยใช้วิธี molybdenum-blue method (Murphy and Riley, 1962)

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถละลายฟอสเฟต

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม

นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร NBRIP ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 มาสเมียร์บนสไลด์ จากนั้นนำมาลนบนเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ แล้วหยด crystal violet ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า หยดไอโอดีน ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยให้ไหลผ่านช้าๆ บนสไลด์จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ปนไปกับแอลกอฮอล์ จากนั้นย้อมทับด้วย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำเปล่า แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการติดสีและรูปร่างของแบคทีเรีย

การระบุชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 ด้วยวิธี Biolog microlog system

นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ Rs01 มาทำการระบุชนิดโดยการทดสอบด้วยวิธี Biolog microlog system โดยขั้นแรกเตรียมสายพันธุ์ Rs01 ตามวิธีปฏิบัติของ Biolog (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA) บนอาหารแข็ง Biolog Universal Growth (BUG) เมื่อแบคทีเรียเจริญบนอาหารแข็งนำมาใส่ใน GN2 MicroPlate™ ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ บรรจุอยู่ จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปอ่านค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและระบุชนิดของแบคทีเรียด้วย MicroLog™ System 4.20

การทดสอบผลของแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2

การวางแผนการทดลอง

การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน ได้ทำการทดลองในโรงเรือน ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับดินได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน โดยใช้ชุดดินตาคลี บริเวณจังหวัดนครราชสีมา ที่ระดับความลึก 0-20 ซม. ทำการวิเคราะห์สมบัติดินเบื้องต้น คือ ค่า pH (Mclean, 1982) ไนโตรเจนทั้งหมด (Jackson, 1958) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Bray and Krutz, 1945) ฟอสฟอรัสทั้งหมด โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Pratt, 1965) ชนิดของดินและความชื้นดินที่ 1/3 และ15 บรรยากาศ โดยสมบัติบางประการของดินก่อนการทดลอง พบว่า ดินที่นำมาทดลองนี้มีค่า pH 7.87 ซึ่งอยู่ในระดับเป็นด่างปานกลาง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.097% อยู่ในระดับต่ำมาก ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 249.51 มก./กก. ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 23.00 มก./กก. อยู่ในระดับค่อนข้างสูง ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 69.80 มก./กก. อยู่ในระดับปานกลาง ดินเป็นดินร่วนมีการกระจายตัวของอนุภาคขนาดทราย ทรายแป้ง และดินเหนียว 45.30, 24.40 และ 30.30% ตามลำดับ และความชื้นของดินที่ 1/3 และ 15 บรรยากาศ เท่ากับ 31.90 และ 23.10% ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Soil properties of Takli soil series based on analysis from Department of Soil Science, Kasetsart University, Bang Khen Campus.

Soil properties	Value
pH (1:1 H_2O)	7.87
Total nitrogen (%)	0.097
Total phosphorous (mg/kg)	249.51
Available phosphorous (mg/kg)	23.00
Available potassium (mg/kg)	69.80
Sand (%)	45.30
Silt (%)	24.40
Clay (%)	30.30
Soil water content at 1/3 atm	31.90
Soil water content at 15 atm	23.10

จากนั้นทำการวางแผนทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ตำรับการทดลอง ประกอบด้วย ตำรับการทดลองที่ 1 ควบคุม (ไม่มีการใส่ปัจจัยใดๆ)

ตำรับการทดลองที่ 2 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (NPK)

ตำรับการทดลองที่ 3 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน โพแทสเซียมร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 (NK+Rs01)

ตำรับการทดลองที่ 4 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน โพแทสเซียมร่วมกับหินฟอสเฟต และแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 (NK+RP+ Rs01)

ทำการทดลองตำรับการทดลองละ 6 ซ้ำ และอัตราปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่ใส่เท่ากับ 3.46 1.30 และ 1.73 ก./กระถาง ตามลำดับ ส่วนหินฟอสเฟตใส่ 2.5 ก./กระถาง และใส่แบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 จำนวน 10^8 CFU/กระถาง

การเตรียมแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 และการบ่มเชื้อลงในดิน

การเตรียมแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 ทำได้โดยเลี้ยงในอาหารเหลว NBRIP ที่มีการเติมฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 48 ชม. แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl แล้วปรับค่า OD_{600} ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.8 และประเมินจำนวนเซลล์โดยวิธีนับจำนวนโคโลนีในจานบนอาหารแข็งให้ได้เท่ากับ 10^8 CFU/มล. จากนั้นนำสารละลายของแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 ปริมาตร 1 มล. หยดลงดินบริเวณต้นกล้าข้าวโพดหวานในกระถางที่เตรียมไว้ เมื่อข้าวโพดอายุ 14 วัน

การเตรียมพืชทดสอบ

เพาะต้นกล้าข้าวโพดหวานในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกระดาษทิชชูและน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเมื่อต้นข้าวโพดหวานอายุ 7 วัน จึงย้ายไปปลูกในกระถางที่เตรียมดินไว้ปริมาณ 8 กก. จำนวน 4 ต้น/กระถาง เมื่อต้นกล้าอายุ 14 วัน จึงทำการถอนต้นกล้าให้เหลือ 1 ต้น/กระถาง

การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตของข้าวโพด

การเก็บข้อมูลพืช จะเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน ได้แก่ ความสูง และเส้นรอบวงต้น ที่ระยะการเจริญเติบโต 15, 30, 45 และ 54 วัน ส่วนผลผลิตวัดจากน้ำหนักแห้งของลำต้น และใบ ซึ่งเก็บข้อมูลที่อายุ 54 วัน (ระยะออกไหม) สำหรับตัวอย่างดินจะเก็บมาวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมด และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ หลังจากเก็บเกี่ยวที่ระยะ 54 วัน จากนั้นนำค่าวิเคราะห์ของดินและพืช ทั้งก่อนปลูกและหลังปลูกมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรม IRRI STAT เวอร์ชั่น DOS

ผลการทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยเทคนิค enrichment culture ในอาหาร NBRIP จากชุดดินรังสิตซึ่งเป็นดินนากรดกำมะถัน ที่ความลึก 0-10 ซม. พบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทั้งหมด 6 ไอโซเลต จากนั้นทดสอบการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทั้ง 6 ไอโซเลต ในอาหารเหลว NBRIP ที่มีการเติม $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$ หรือ $AlPO_4$ พบว่า แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่สามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้มากกว่า $FePO_4$ และ $AlPO_4$ โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้สูงสุด คือ สายพันธุ์ Rs01 สามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้ 878.5 มก. ฟอสเฟต/ล. รองลงมาอีก 4 อันดับ คือ แบคทีเรียสาย

พันธุ์ Rs02 Rs05 Rs06 Rs03 และ Rs04 โดยสามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้ 555.0, 155.0, 84.0, 46.0 และ 31.0 มก.ฟอสเฟต/ล. ตามลำดับ (Table2)

Table 2 Phosphate solubilizing effectiveness of tested bacteria, 3 days after inoculation.

Isolate Code	Solubilized Phosphate (mgP/l) from		
	$Ca_3(PO_4)_2$	$FePO_4$	$AlPO_4$
Rs01	878.5	0	36.5
Rs02	555.0	22.5	119.5
Rs03	46.0	0	0
Rs04	31.0	10.5	0
Rs05	155.0	22.0	0
Rs06	84.0	0	0

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 ด้วยวิธี Biolog Microlog system

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 ที่สามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้สูงสุด มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสี safranin O ในการย้อมแบบแกรมและมีลักษณะกลม (cocci) และเมื่อทำการจำแนกชนิดโดยการทดสอบด้วยวิธี Biolog microlog system พบว่า เป็น *Burkholderia multivorans* ด้วยค่าความเหมือน 99% โดยหลังจากระบุชนิดของแบคทีเรียแล้วจึงเรียกแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 ว่า *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01

ผลของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2

ความสูงของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2

เมื่อพิจารณาความสูงของข้าวโพดหวานที่อายุ 15, 30 และ 45 วัน พบว่า ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม (NPK) มีความสูง 12.13, 24.50 และ 45.25 ซม. ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 (NK+Rs01) ที่มีความสูง 11.88, 25.50 และ 44.50 ซม. โดยทั้ง 2 ตำรับการทดลองดังกล่าวข้างต้นแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) ในด้านความสูงของข้าวโพดหวานกับตำรับการทดลองควบคุม และตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับหินฟอสเฟตและ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01

(NK+RP+Rs01) และเมื่อพิจารณาความสูงของข้าวโพดหวานที่อายุ 54 วัน พบว่า ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม (NPK) มีความสูงสูงที่สุด 107.00 ซม. ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) กับตำรับการทดลองควบคุม ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 (NK+Rs01)และตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับหินฟอสเฟต และ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 (NK+RP+Rs01) (Figure 1)

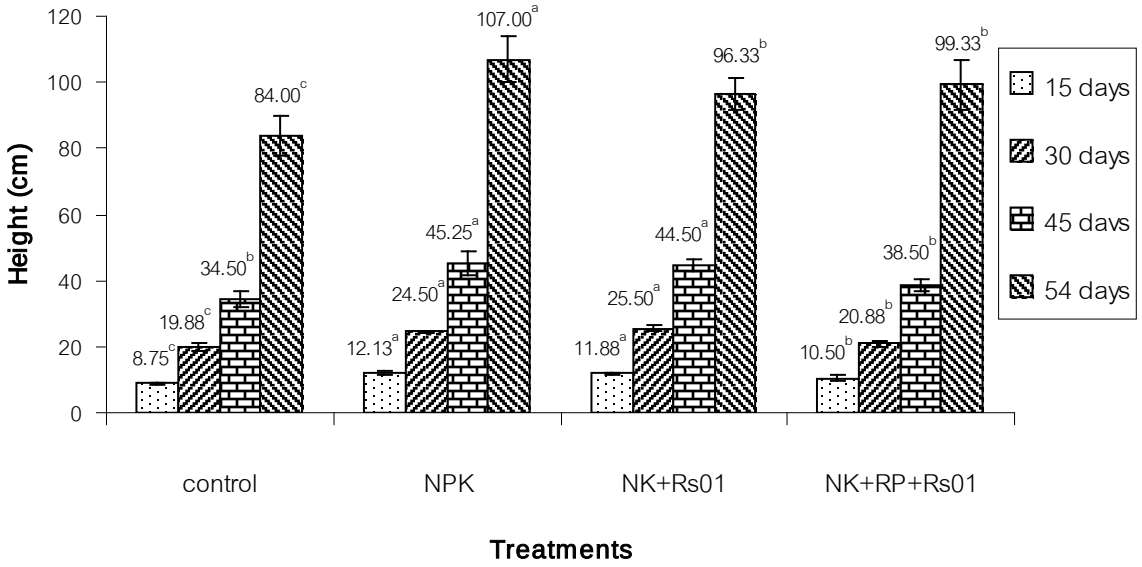

Figure 1 Stem heights (cm) of 15, 30, 45 and 54 days old Insee 2 sweet corn of the 4 treatments.

ขนาดเส้นรอบวงของลำต้นข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2

ขนาดเส้นรอบวงลำต้นของข้าวโพดหวาน ที่อายุ 15, 30, 45 และ 54 วัน พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 (NK+Rs01) มีขนาดเส้นรอบวงลำต้นของข้าวโพดหวานมากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกับตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม (NPK) ในขณะที่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) กับตำรับการทดลองควบคุม และตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และโพแทสเซียม ร่วมกับหินฟอสเฟตและ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 (NK+RP+Rs01) (Figure 2)

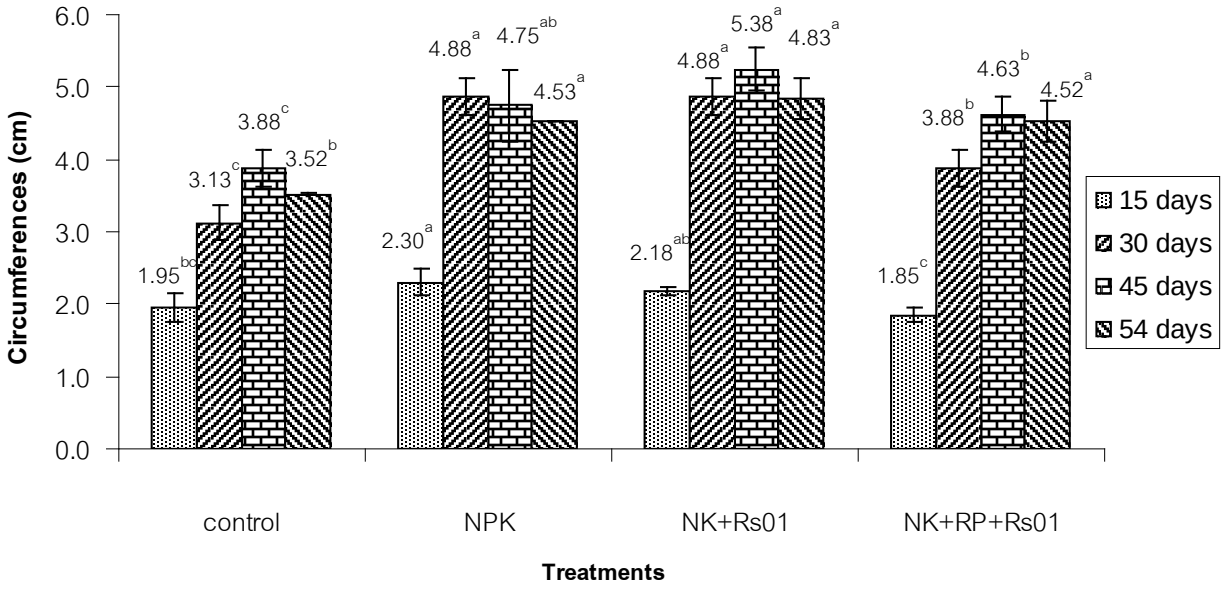

Figure 2 Stem circumferences (cm) of 15, 30, 45 and 54 days old Insee 2 sweet corn of the 4 treatments.

น้ำหนักแห้งที่อายุ 54 วัน (ระยะออกไหม)

เมื่อพิจารณาน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ที่อายุ 54 วัน พบว่า ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และโพแทสเซียมร่วมกับ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ทำให้น้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพดหวานสูงสุด โดยมีน้ำหนักแห้งของต้น 28.16 ก./ต้น ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และโพแทสเซียม ร่วมกับหินฟอสเฟตและ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 โดยทั้ง 3 ตำรับการทดลองดังกล่าวข้างต้น (NK+Rs01 NPK และ NK+RP+Rs01) มีน้ำหนักแห้งของต้นสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) ในด้านน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพดหวานกับตำรับการทดลองควบคุม

สำหรับน้ำหนักแห้งของใบข้าวโพดหวาน พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกับน้ำหนักแห้งของต้น ซึ่งพบว่าตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 (NK+Rs01) มีน้ำหนักแห้งของใบข้าวโพดหวานสูงสุดเฉลี่ย 15.63 ก./ต้น ซึ่งสูงกว่าตำรับการทดลองควบคุม ตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม (NPK) และตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียม ร่วมกับหินฟอสเฟตและ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 (NK+RP+Rs01) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) (Figure 3)

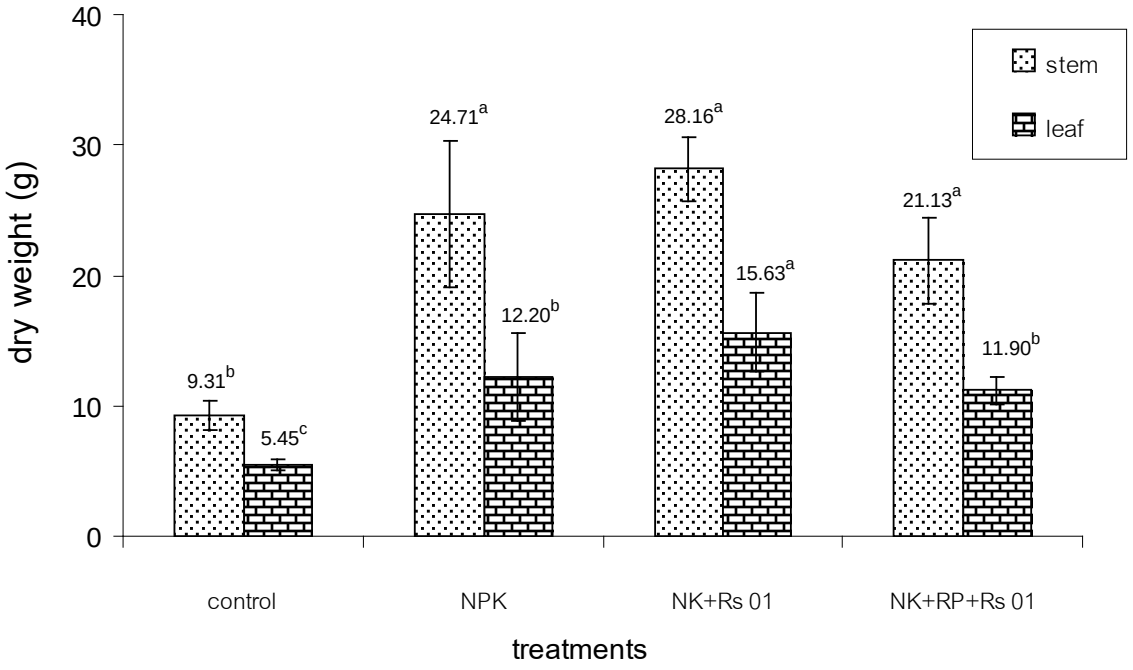

Figure 3 Dried weights stems and leaves (g) of 54 days old Insee 2 sweet corn of the 4 treatments.

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดและฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินหลังการเก็บเกี่ยวข้าวโพดหวาน พันธุ์อินทรี 2

จากการเก็บตัวอย่างดินหลังเก็บเกี่ยวข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 มาวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด และปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน จากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด พบว่า ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับหินฟอสเฟตและ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ส่งผลให้มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสูงสุด 312.3 มก./กก. โดยมีปริมาณมากกว่าตำรับการทดลองควบคุม ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม และตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ พบว่า ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับหินฟอสเฟตและ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ส่งผลให้มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงสุด 45.22 มก./กก. โดยมีปริมาณมากกว่าตำรับการทดลองควบคุม ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม และตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมร่วมกับ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการในตำรับการทดลองที่มีการใส่ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ร่วมด้วยมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินหลังการเก็บเกี่ยวข้าวโพดหวานมีปริมาณมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ตอนเริ่มต้น (Figure 4)

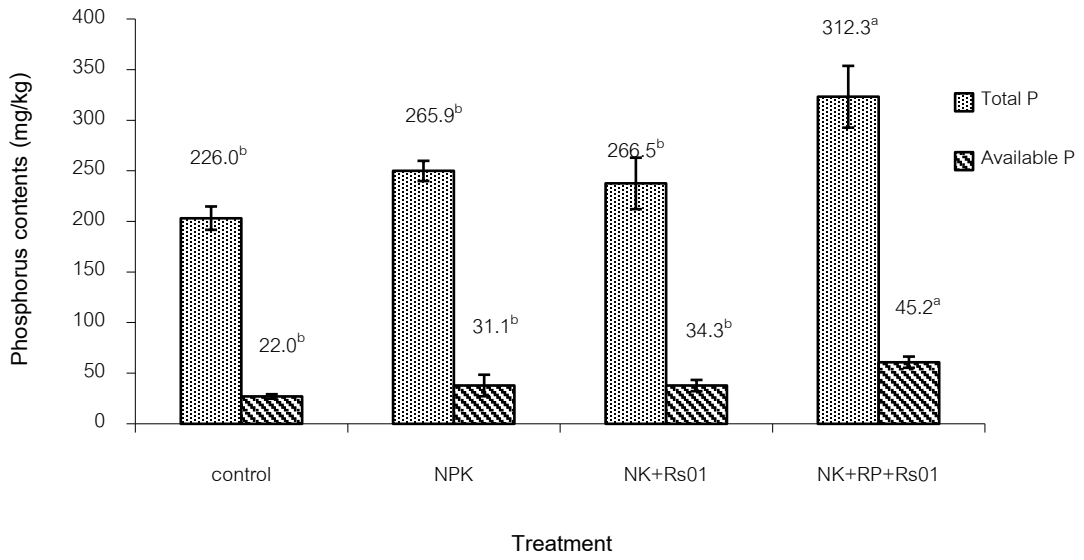

Figure 4 Total and available phosphorus (mg/kg) in Takli soil after the harvest of 54 days old corn.

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินนากรดกำมะถัน ชุดดินรังสิตพบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทั้งหมด 6 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบการละลายฟอสเฟต พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 สามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้สูงสุด 878.8 มก.ฟอสเฟต/ล. ใกล้เคียงกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากดินเขตอุทยานซึ่งสามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้สูงสุด 1,103 มก.ฟอสเฟต/ล. (วุฒิชัย และคณะ, 2550) และจากการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ Rs01 ด้วยวิธี Biolog Microlog system version 4.2 พบว่าเป็น *Burkholderia multivorans* ด้วยค่าความเหมือน 99% จากประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ มีประสิทธิภาพสูงกว่าฟอสเฟตในรูป $FePO_4$ และ $AlPO_4$ จึงนำ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ไปทดสอบการละลายฟอสเฟตในดินด่าง (ชุดดินตาคลี) ที่มีการปลูกข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 โดยทำการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน พบว่าการใส่ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมทำให้ความสูง เส้นรอบวง น้ำหนักแห้งของข้าวโพดหวานที่ระยะออกไหม (54 วัน) ไม่แตกต่างกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมร่วมกัน ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus megatherium* var. *Phosphaticum* ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของลำต้นอ้อยไม่แตกต่างกับการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส (Sundara *et.al.*, 2002) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทุกชนิดสามารถผลิต phytohormone และเอนไซม์ฟอสฟาเตส ซึ่งช่วยในการเจริญเติบโตของพืชโดยเพิ่มแร่ธาตุในดิน (Ponmurugan and Gopi, 2006) พืชจึงเจริญเติบโตดี นอกจากนี้การทดลองในครั้งนี้ ยังพบว่า ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และโพแทสเซียมร่วมกับ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs 01 มีน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพดหวานที่อายุ 54 มากกว่าตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และ

โพแทสเซียมร่วมกับหินฟอสเฟตและ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาที่ทำการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และโพแทสเซียมร่วมกับหินฟอสเฟตและแบคทีเรียละลายฟอสเฟตโดย Han *et. al*. (2006) พบว่าน้ำหนักแห้งของต้นของตำรับการทดลองที่ทำการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และโพแทสเซียมร่วมกับหินฟอสเฟตและแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมากขึ้นเมื่อเทียบกับตำรับการทดลองที่ปุ๋ยใส่ไนโตรเจน และโพแทสเซียมร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต สาเหตุที่ผลการทดลองในครั้งนี้ข้าวโพดหวานมีน้ำหนักแห้งของต้นน้อย ทั้งที่ใส่หินฟอสเฟตร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ควรจะทำให้ข้าวโพดหวานมีน้ำหนักแห้งของต้นมาก อาจเป็นเพราะปริมาณฟอสฟอรัสมีมากเกินกว่าความต้องการของข้าวโพดหวาน จึงส่งผลให้การเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานไม่เพิ่มขึ้น ดังนั้น การใส่ปุ๋ยนี้จะต้องพิจารณาถึงความต้องการของพืช เพราะถ้าหากปริมาณฟอสฟอรัสที่มากเกินความต้องการของพืช จะทำให้พืชไม่เจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายโดยเปล่าประโยชน์ ความพอเหมาะของการใส่ปุ๋ยนี้ต้องอาศัยหลักเกณฑ์และวิธีการต่างๆ หลายประการประกอบการพิจารณา อาทิ ชนิดของพืช ระดับความชื้น และความอุดมสมบูรณ์เดิมของดิน วิธีการปลูก การดูแลและบำรุงรักษา (สรสิทธิ์, 2537) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการใส่ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ร่วมด้วยมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินหลังการเก็บเกี่ยวข้าวโพดหวานมีปริมาณมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ตอนเริ่มต้น และมีปริมาณมากกว่าการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมร่วมกัน ดังนั้นการใส่ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมในการปลูกข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ในชุดดินตาคลี จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการช่วยเหลือเกษตรกรในการช่วยลดต้นทุนการผลิต รวมทั้งจะช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน ลดการสูญเสียเนื่องจากการถูกตรึงในดินและการถูกชะล้างลงสู่แหล่งน้ำ

เอกสารอ้างอิง

วุฒิชัย จันทรสมบัติ นวลจันทร์ ภาสดา และ มนต์ระวี พีราวัชร. 2550. การคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตร, น. 1-51. *ใน* รายงานผลการวิจัยส่วนสำรวจและจำแนกดิน. สำนักสำรวจดินและวางแผนการใช้ที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศรีสม สุวรรณวงค์. 2544. การวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 141 น.

สรสิทธิ์ วัชโรยาน. 2527. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน . มหาวิทยาเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 737 น.

Alexander M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons,Inc., New York, 472 p.

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

Bray, N. C. and R. R. Weil. 2008. The nature and properties of soils. 14th ed. Pearson Education, Inc, Upper Saddle River, New Jersey. 960 p.

Chinabut, N. 2003. A soil testing service for farmers in Thailand, using mobile laboratories. Source: http://www.fftc.agnet.org/library/article/eb533.html.

Dadarwal, K. R. 1997. Microorganisms for sustainable crop production. Jodhpur. 293-308.

Gerke, L. 1992. Phosphate, aluminum and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. Z. Pflanzenernahr. Bodenk. 155: 17-22.

Han, H., S. Supanjani and K. D. Lee. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant Soil Environ. 52: 130-136.

Igual, J., M. A. Valverde, E. Cervantes and E. Velázquez. 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. Agron. 21: 561-568.

Illmer, P., A. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphate by microorganism isolate from forest soil. Soil Bio. Biochem. 24: 389-395.

Jackson, M.L. 1958. Soil Chemical Analysis. Prentice-Hall, Inc., Englewood cliffs, N.J., 498 p.

Katznelson H., Peterson E.A. and J.W. Rovatt. 1962. Phosphate dissolving microoganisms on seed and in the root zone of plants. Can. J. Bot. 40: 1181–1186.

Lindsay, W. L., Vlek, P. L.and S. H. Chien. 1989. Phosphate minerals. pp. 1089–1130. In : J.B. Dixon and S. B. Weed (eds.), Minerals in Soil Environment. Soil Science Society of America Inc., Wisconsin.

McLaughlin, M.J., A.M. Alston and J.K. Martin. 1988. Phosphorus cycling in wheat-pasture rotations. I. The source of phosphorus taken up by wheat. Aust. J. Soil Res. 26: 323–331.

Mclean, E.O. 1982. Soil pH and Lime Requirement, pp. 199-209. In A.L. Page, eds. Method of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties 2nd. Soil Science Society of America Inc., Wisconsin.

Mehrvarz, S., M. R. Chachi and H. A. Alikhani. 2008. Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of barely (Hordeum vulgare L.). J. Agri. Environ. Sci. 3: 822-828.

Murphy, J. and J.P Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chem. Acta. 27: 31-36.

Ponmurugan, P. and C., Gopi. 2006. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. Afr. J. Biotechnol. 5: 348-350.

Pratt, P. E. 1965. Potassium. pp.1022-1030. Methods of Soil Analysis. Part II. Chemical and Microbiological Properties, Madison, Wisconsin, USA.

Raghu K. and I.C. MacRae.1996. Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. J. Appl. Bacteriol. 29: 582–586.Salehrastin, N. 1999. Biological fertilizer. Sci. J. Soil Water. 12:116-120.

Sperberg J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust. J. Agric. Res. 9: 778-781.

Stevenson, F.J. 1986. Cycles of Soil, Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley, New York, 380 p.

Sundara B., Natarajan V. and K. Hari. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. Field Crops Res. 77: 43-49.

Wang, Z. and S. Li. 2004. Effect of nitrogen and phosphorus fertilization on plant growth and nitrate accumulation in vegetables. J. Plant. Nutr. 27: 539-556.

Yadav, K.S. and K.R. Dadarwal. 1997. Phosphate solubilisation and mobilization through soil microorganisms. In K.R. Dadarwal (Ed.), Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production, p. 351.