

การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC DEAMINASE จากพื้นที่แล้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ISOLATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA CAPABLE OF PRODUCING ACC DEAMINASE FROM SOIL OF DROUGHT AREA IN THE NORTHEASTERN THAILAND

สนธยา ขำดีป* และ กนกอร บุญพา

Sontaya Khamtib*, and Kanokon Bunpha

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

Research Group of Soil Science, Division of Agriculture Production Science Research and Development,

Department of Agriculture

*corresponding author e-mail: skbiot@gmail.com

(Received: 15 February 2024; Revised: 17 April 2024; Accepted: 22 April 2024)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase จากพื้นที่แล้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากแปลงปลูกอ้อยและพื้นที่ป่าสาธารณะประโยชน์ในจังหวัดชัยภูมิ ขอนแก่น หนองบัวลำภู มหาสารคาม และร้อยเอ็ด มาคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหาร Pikovskaya agar จากนั้นนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้มาทดสอบการเจริญในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) ที่เติม Polyethylene glycol-6000 (PEG6000) ความเข้มข้น 260 กรัมต่อลิตร เพื่อจำลองสภาวะแห้งแล้ง และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งจากการทดลอง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ 34 ไอโซเลต ซึ่งจากการจัดจำแนกชนิดโดยการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16s rRNA พบว่าถูกจัดจำแนกอยู่ใน 5 สกุล ได้แก่ *Klebsiella* 11 ไอโซเลต *Burkholderia* 9 ไอโซเลต *Pantoea* 7 ไอโซเลต *Enterobacter* 5 ไอโซเลต และ *Bacillus* 2 ไอโซเลต มีกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase อยู่ในช่วง 3.78×10^{-4} ถึง 3.52×10^{-2} หน่วยต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase อยู่ในช่วง 2.18×10^{-6} ถึง 9.84×10^{-5} หน่วยต่อไมโครกรัมโปรตีน โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตไอโซเลต S15-U4 เป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase สูงสุด ซึ่งเหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่สามารถใช้ร่วมกับการผลิตพืชในพื้นที่แห้งแล้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: การละลายฟอสเฟต สภาวะแห้งแล้ง จุลินทรีย์ดิน

Abstract

This research was to study the isolation of phosphate solubilizing bacteria capable of producing ACC deaminase from the soil of drought areas in the northeastern Thailand. Soil samples were collected from sugarcane fields and public forest areas in Chaiyaphum, Khon Kaen, Nong Bua Lam Phu, Maha Sarakham, and Roi Et provinces. Phosphate solubilizing bacteria (PSB) were isolated using spread plate technique on Pikovskaya agar. Subsequently, PSB isolates were tested for growth in Tryptic soy broth (TSB) with polyethylene glycol-6000 (PEG6000) at a concentration of 260 g/L to simulate drought condition and for their ability to produce the ACC deaminase enzyme. From the experiments, a total of 34 isolates of phosphate solubilizing and ACC deaminase producing bacteria were obtained. All isolates were identified by 16S rRNA sequencing. Sequencing analysis revealed that belonged to the following genera: *Klebsiella* (11 isolates), *Burkholderia* (9 isolates), *Pantoea* (7 isolates), *Enterobacter* (5 isolates) and *Bacillus* (2 isolates). The activity of ACC deaminase ranged from 3.78×10^{-4} to 3.52×10^{-2} Unit/mL, and the specific activity of ACC deaminase ranged from 2.18×10^{-6} to 9.84×10^{-5} Unit/ μ g-Protein. Among the PSB, isolate S15-U4 exhibited the highest enzyme activity and specific enzyme activity for ACC deaminase. The strain S15-U4 is suitable for further development as a phosphate solubilizing biofertilizer that can be effectively used in crop production in drought prone areas.

Keywords: Phosphate solubilization, Drought stress, Soil microorganisms

บทนำ

ภัยแล้ง เป็นหนึ่งในภัยคุกคามที่ร้ายแรงต่อการผลิตพืชทั่วโลกและมีแนวโน้มทวีความรุนแรงตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศที่คาดการณ์ไว้ ความแห้งแล้งจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช รบกวนความสัมพันธ์ของน้ำและลดประสิทธิภาพการใช้น้ำในพืช ส่งผลให้พืชต้องปรับตัวเพื่อความอยู่รอด เช่น การปรับตัวระดับสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา เพื่อรักษาสมดุลของน้ำในเซลล์ ได้แก่ ลดพื้นที่ใบ ลดความสูงของต้น สร้างซีพิงเคลือบใบ ควบคุมการเปิดปากใบ เป็นต้น และการตอบสนองทางชีวเคมี ได้แก่ การสะสมโพรลีน โพลีเอมีน ทรีฮาโลส การเพิ่มกิจกรรมของไนโตรเดรีดักเตส และการสะสมคาร์โบไฮเดรตที่ระดับเซลล์ เป็นต้น (Ammar, et al., 2014; Conesa, et al., 2016; Haworth, et al., 2013) หนึ่งในกลไกสำคัญที่พืชใช้ตอบสนองต่อ

สภาวะความแห้งแล้ง คือ การผลิตเอทิลีน (Ethylene) เพื่อทำหน้าที่ควบคุมการทำงานทางสรีรวิทยาของพืช เช่น การหลุดร่วงของใบ ดอก และผล แม้ว่ากลไกการตอบสนองของพืชจะทำให้พืชมีชีวิตรอดในสภาวะแห้งแล้ง แต่ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และส่งผลต่อปริมาณผลผลิตที่ลดลง หรือหากพืชผลิตเอทิลีนในปริมาณมากเกินไปจนสมดุลเป็นระยะเวลาสั้นก็จะส่งผลให้พืชตายได้

ปัจจุบันมีนักวิจัยให้ความสนใจศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับพืชที่ช่วยลดความเครียดของพืชจากความแห้งแล้ง เช่น การผลิตเอนไซม์ 1-อะมิโนไซโคลโพรเพน-1-คาร์บอกซิเลต ดีอะมิเนส (1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase) เพื่อเปลี่ยน 1-อะมิโนไซโคลโพรเพน-1-คาร์บอกซิเลต (1-aminocyclopropane-1-carboxylate; ACC) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์เอทิลีน ให้กลายเป็นสารประกอบไนโตรเจน ทำให้การผลิตเอทิลีนของพืชลดลง จึงช่วยลดความเครียดและอันตรายที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืช (Sarkar et al., 2018) แบคทีเรียละลายฟอสเฟตหลายสกุลที่มีรายงานความสามารถในการผลิต ACC deaminase เช่น *Bacillus Burkholderia* *Enterobacter Klebsiella Pantoea Pseudomonas* และ *Variovorax* เป็นต้น (Alemneh et al., 2021; Kang et al., 2021) Fathalla & Sabry (2020) รายงานการใช้แบคทีเรียที่สามารถผลิต ACC deaminase คือ *Pseudomonas putida* SAB10 และ *Pseudomonas palleroniana* SAW21 ร่วมกับการผลิตมะเขือในสภาพกระถาง โดยจำลองสภาวะแล้งด้วยการให้น้ำทุก 6 วัน เปรียบเทียบกับการให้น้ำแบบปกติทุก 2 วัน พบว่า การให้น้ำทุก 6 วัน มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามในกรรมวิธีที่ใส่ *P. putida* SAB10 และ *P. palleroniana* SAW21 ต้นมะเขือมีการฟื้นตัวได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่ *P. putida* SAB10 และ *P. palleroniana* SAW21 ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิต ACC deaminase ช่วยลดความเครียดและอันตรายที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะแล้ง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในการช่วยลดความเครียดของพืชในสภาวะแห้งแล้ง ทำให้ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่สามารถใช้ร่วมกับการผลิตพืชในพื้นที่แห้งแล้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

สำรวจและเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกอ้อยและป่าสาธิตระยะประโยชน์จากพื้นที่แล้งจังหวัดหนองบัวลำภู (อำเภอศรีบุญเรืองและเมืองหนองบัวลำภู) ขอนแก่น (อำเภอหนองเรือและชุมแพ) ชัยภูมิ (อำเภอแก้งคร้อและจัตุรัส) มหาสารคาม (อำเภอบรบือและนาหว้า) และร้อยเอ็ด (อำเภอหนองพอกและเมยวดี) โดยอ้างอิงตามแผนที่พื้นที่แล้งซ้ำซากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

(กลุ่มวางแผนการจัดการที่ดินในพื้นที่เสี่ยงภัยทางการเกษตร, 2563) เก็บตัวอย่างดินแบบตัวอย่างดินรวม (Composite soil sample) ที่ระดับความลึก 0–20 และ 20–50 เซนติเมตร นำตัวอย่างดินมาตัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Enrichment technique) โดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในอาหาร Pikovskaya broth (Pikovskaya, 1948) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาตัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหาร Pikovskaya agar (Pikovskaya, 1948) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สร้างวงใสรอบๆ และมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดิน มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Cross streak บนอาหาร Nutrient agar; NA

2. การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่มีค่าศักย์ของน้ำ

นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ตัดแยกได้มาทดสอบความสามารถการเจริญในอาหาร Tryptic soy broth; TSB ที่เติม Polyethylene glycol–6000 (PEG6000) ความเข้มข้น 260 กรัมต่อลิตร ทำให้อาหาร TSB มีค่าศักย์ของน้ำ (Water potential) เท่ากับ -0.73 MPa (Michel & Kaufmann, 1973) เพื่อจำลองสภาวะแห้งแล้ง เริ่มต้นการทดสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในอาหาร TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับปริมาณแบคทีเรียด้วยอาหาร TSB ให้มีความความทึบแสง (Optical density) จากการวัดด้วยเครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.50 แล้วจึงดูดแบคทีเรียแขวนลอย 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร TBS และ TSB+PEG6000 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องบ่มเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบค่าความทึบแสงของแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร TSB และ TSB ที่เติม PEG6000

3. การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase

วัดกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase โดยการวัดปริมาณ Alpha-ketobutyrate ที่ปลดปล่อยออกมาจากการย่อย ACC ของเอนไซม์ ACC deaminase โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Penrose & Glick (2003) เริ่มต้นจากเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในอาหาร Dworkin & Foster; DF Salts minimal (Dworkin & Foster, 1958) ที่มี ACC 0.3033 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Kubota 6000, Kubota corp, Osaka, Japan) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ส่วนใสและล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 M Tris HCl (pH 7.5) จำนวน 2 ครั้ง แขนงลอยตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 M Tris HCl (pH 8.5) 400 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมโกลูอิน 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ถูกตรึงด้วยโกลูอิน (Toluenized cells) 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ที่มี 0.30 M ACC 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเติม 0.56 M HCl 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง

ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส 1,000 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเดิม 0.56 M HCl 800 ไมโครลิตร และ DNF solution (ละลาย 2,4-dinitrophenylhydrazine 0.1 กรัมใน 2 M HCl 100 มิลลิตร) 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเติม 2 N NaOH 2 มิลลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน Alpha-ketobutyrate คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase จาก 1 หน่วยของเอนไซม์ ACC deaminase คือ ปริมาณ Alpha-ketobutyrate ที่เกิดขึ้น 1 μmol ในเวลา 1 นาที วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ Tollenized cells ด้วยวิธี Bradford method (Bradford, 1976) โดยดูด Tollenized cells 150 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เดิม 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 1,000 ไมโครลิตร และ 0.1 N NaOH 1,200 ไมโครลิตร นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่งัวให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติม Bradford's reagent 1,200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin; BSA นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase และปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ มาคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC Deaminase ดังสมการที่ 1

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACCd (Unit/\mu g Protein)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ ACCd (Unit/mL)}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (\mu g Protein/mL)}} \quad (1)$$

4. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase

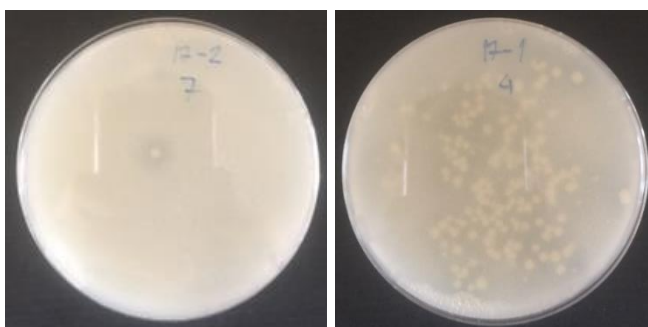
การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase โดยการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16s rRNA ตามวิธีการของ สอนธยา และสุปรานี (2561) เริ่มต้นสกัดดีเอ็นเอด้วย TIANamp Bacteria DNA Kit (Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd., China) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ด้วย universal primer คือ forward primer 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ reward primer 1492R (5'-CGGTACCT TGTTACGACTT-3') โดยใช้สารละลายผสม One PCR ultra (Gene DireX inc., Taiwan) ดำเนินการในเครื่องเทอร์โมไซเคิล (Multigene thermal cycler, Labnet International Inc., New Jersey, USA) โดยมีสภาวะในการทำงาน ดังนี้ (1) Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (3) Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยดำเนินการซ้ำในขั้นตอนที่ (2)-(4) จำนวน 30 รอบ และ (5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่ม

จำนวนมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PureLink Quick PCR purification kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Baltics, UAB) ก่อนส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank บนเว็บไซต์ของ The National Center for Biotechnology Information; NCBI

ผลการวิจัย

1. แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากพื้นที่แล้ง

จากการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินพื้นที่แล้งในจังหวัดชัยภูมิ ขอนแก่น หนองบัวลำภู มหาสารคาม และร้อยเอ็ด จำนวน 58 ตัวอย่าง แบ่งเป็นดินที่ระดับความลึก 0–20 เซนติเมตร 29 ตัวอย่าง และดินที่ระดับความลึก 20–50 เซนติเมตร 29 ตัวอย่าง พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้ทั้งหมด 176 ไอโซเลต แบ่งเป็นจากตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0–20 เซนติเมตร จำนวน 102 ไอโซเลต และตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 20–50 เซนติเมตร จำนวน 74 ไอโซเลต ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่เจริญและสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง Pikovskaya agar หลังบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

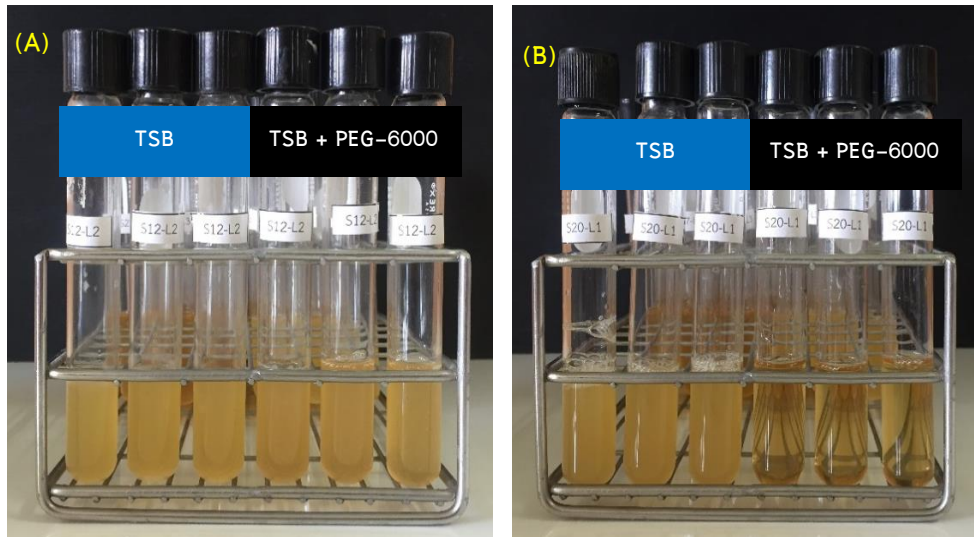
2. แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถเจริญในอาหารที่มีค่าศักย์ของน้ำต่ำ

เมื่อนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากจากตัวอย่างดินพื้นที่แล้งทั้งหมด 176 ไอโซเลต มาทดสอบการละลายฟอสเฟตอีกครั้ง พบว่า มีเพียง 89 ไอโซเลต ที่ยังคงแสดงความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya agar และเมื่อนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตดังกล่าวไปทดสอบการเจริญในอาหาร TSB และ TSB ที่เติม PEG-6000 ความเข้มข้น 260 กรัมต่อลิตร (ค่าศักย์ของน้ำในอาหารเท่ากับ -0.73 MPa) เพื่อจำลองสภาวะแห้งแล้ง พบว่ามีแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถเจริญในอาหาร TSB ที่เติม PEG-6000 ความเข้มข้น 260 กรัมต่อลิตร 70 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 78.65 ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่นำมาทดสอบ (89 ไอโซเลต) ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 2 โดยเป็นแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้

จากตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0–20 เซนติเมตร จำนวน 31 ไอโซเลต และจากตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 20–50 เซนติเมตร จำนวน 39 ไอโซเลต

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้ในอาหาร TSB ที่เติม PEG-6000 ความเข้มข้น 260 กรัมต่อลิตร

การเจริญในอาหาร TSB ที่เติม PEG-6000	จำนวน ไอโซเลต	แบคทีเรียละลายฟอสเฟต
สามารถเจริญได้	70	S1-U2, S2-U2, S3-U3, S4-U3, S5-U2, S6-U1, S6-U3, S10-U2, S13-U3, S14-U1, S14-U2, S15-U1, S15-U2, S15-U3, S15-U4, S15-U5, S15-U6, S16-U1, S16-U2, S16-U3, S16-U5, S17-U1, S17-U2, S17-U3, S17-U4, S17-U6, S17-U7, S20-U1, S25-U1, S25-U2, S27-U1, S1-L1, S1-L2, S2-L1, S2-L2, S3-L4, S4-L1, S4-L2, S5-L1, S5-L2, S6-L1, S6-L2, S6-L3, S6-L4, S7-L3, S7-L4, S8-L1, S8-L2, S12-L1, S12-L2, S16-L1, S16-L2, S16-L3, S16-L4, S17-L1, S17-L2, S17-L3, S17-L4, S17-L5, S17-L6, S17-L7, S19-L1, S19-L2, S19-L4, S20-L1, S20-L2, S27-L1, S27-L2, S27-L3, S27-L4
ไม่สามารถเจริญได้	19	S1-U1, S3-U2, S4-U2, S7-U1, S9-U1, S10-U1, S20-U2, S25-U3, S27-U2, S27-U3, S2-L3, S2-L4, S3-L1, S3-L2, S3-L3, S7-L1, S7-L2, S19-L3, S19-L5



ภาพที่ 2 แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถ (A) และไม่สามารถ (B) เจริญในอาหาร TSB ที่เติม PEG-6000 ความเข้มข้น 260 กรัมต่อลิตร

3. กิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถเจริญในอาหาร TSB ที่เติม PEG-6000 ความเข้มข้น 260 กรัมต่อลิตร ทั้งหมด 70 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหาร DF salts minimal (Dworkin & Foster, 1958) ที่มี ACC 0.3033 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อเตรียมเซลล์แบคทีเรียในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase พบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้เพียง 34 ไอโซเลต และเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase อยู่ในช่วง 3.78×10^{-4} ถึง 3.52×10^{-2} หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ต่ำสุด คือ S16-U5 ขณะที่แบคทีเรียละลายฟอสเฟต S15-U4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สูงสุด ส่วนกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase อยู่ในช่วง 2.18×10^{-6} ถึง 9.84×10^{-5} หน่วยต่อไมโครกรัมโปรตีน โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟต S16-U5 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase ต่ำสุด และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต S15-U4 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase สูงสุด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลท

แบคทีเรียละลาย ฟอสเฟต	โปรตีนทั้งหมด ($\mu\text{g/mL}$)	กิจกรรมของ เอนไซม์ ACCd (Unit/mL)	กิจกรรมจำเพาะ ของเอนไซม์ ACCd (Unit/ $\mu\text{g-Protein}$)
S1-U2	169.81	7.55×10^{-4}	4.45×10^{-6}
S2-U2	226.34	1.96×10^{-2}	8.68×10^{-5}
S3-U3	181.70	6.04×10^{-4}	3.33×10^{-6}
S6-U3	210.41	8.31×10^{-4}	3.95×10^{-6}
S15-U3	362.49	2.34×10^{-3}	6.46×10^{-6}
S15-U4	357.56	3.52×10^{-2}	9.84×10^{-5}
S15-U5	233.06	1.28×10^{-3}	5.51×10^{-6}
S15-U6	227.23	1.36×10^{-3}	5.98×10^{-6}
S16-U1	253.25	2.11×10^{-3}	8.35×10^{-6}
S16-U2	166.67	1.96×10^{-3}	1.18×10^{-5}
S16-U5	173.62	3.78×10^{-4}	2.18×10^{-6}
S17-U2	177.88	2.95×10^{-5}	1.66×10^{-5}
S17-U3	367.65	2.04×10^{-3}	5.55×10^{-6}
S17-U4	174.97	2.19×10^{-3}	1.25×10^{-5}
S17-U6	329.74	2.49×10^{-3}	7.56×10^{-6}
S17-U7	359.13	2.19×10^{-3}	6.10×10^{-6}
S20-U1	162.18	3.70×10^{-3}	2.28×10^{-5}
S25-U1	199.64	2.95×10^{-3}	1.48×10^{-5}
S25-U2	302.91	2.72×10^{-3}	8.98×10^{-6}
S27-U1	369.22	9.06×10^{-4}	2.45×10^{-6}
S1-L1	200.31	1.66×10^{-3}	8.30×10^{-6}
S1-L2	304.85	1.89×10^{-3}	6.19×10^{-6}
S2-L2	213.77	1.13×10^{-3}	5.30×10^{-6}
S3-L4	199.19	3.47×10^{-3}	1.74×10^{-5}
S8-L1	290.71	7.55×10^{-4}	2.60×10^{-6}
S8-L2	314.49	2.34×10^{-3}	7.45×10^{-6}

ตารางที่ 2 ต่อ

แบคทีเรียละลาย ฟอสเฟต	โปรตีนทั้งหมด (µg/mL)	กิจกรรมของ เอนไซม์ ACCd (Unit/mL)	กิจกรรมจำเพาะ ของเอนไซม์ ACCd (Unit/µg-Protein)
S12-L2	247.20	4.31×10^{-3}	1.74×10^{-5}
S17-L3	219.38	3.17×10^{-3}	1.45×10^{-5}
S17-L4	334.70	9.06×10^{-4}	2.71×10^{-6}
S17-L5	265.37	3.63×10^{-3}	1.37×10^{-5}
S19-L1	213.10	8.84×10^{-3}	4.15×10^{-5}
S19-L4	227.23	1.00×10^{-2}	4.42×10^{-5}
S20-L1	159.04	7.55×10^{-4}	4.75×10^{-6}
S20-L2	201.21	2.49×10^{-3}	1.24×10^{-5}

4. จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase กับฐานข้อมูลบน GenBank พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ถูกจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* 2 ไอโซเลต *Burkholderia* 9 ไอโซเลต *Enterobacter* 5 ไอโซเลต *Klebsiella* 11 ไอโซเลต และ *Pantoea* 7 ไอโซเลต ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase

แบคทีเรียละลาย ฟอสเฟต	จำนวนลำดับ นิวคลีโอไทด์ (bp)	ผล BLAST		
		แบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึง	Accession number	ความ คล้ายคลึง (%)
S1-U2	1,385	<i>Enterobacter ludwigii</i> R6-346-1	JQ659806.1	99.06
S2-U2	1,401	<i>Enterobacter ludwigii</i> R6-346-1	JQ659806.1	99.21
S3-U3	1,411	<i>Burkholderia</i> sp. GR 8-02	KM253085.1	97.02
S6-U3	1411	<i>Klebsiella</i> sp. VITRAJ1	MN258617.1	99.65
S15-U3	1412	<i>Pantoea</i> sp. RD_AZPRC_17	KU597507.1	98.65
S15-U4	1,409	<i>Enterobacter hormaechei</i> NFZ12	MW391763.1	99.72
S15-U5	1,413	<i>Pantoea septica</i> DAF-7	ON197340.1	98.44
S15-U6	1,419	<i>Pantoea septica</i> DAL-4	ON197337.1	98.37
S16-U1	1,132	<i>Klebsiella pneumoniae</i> M-AI-2	FJ828890.2	99.47
S16-U2	1,393	<i>Klebsiella</i> sp. BAB-6433	KY672921.1	95.76

ตารางที่ 3 ต่อ

แบคทีเรียละลาย ฟอสเฟต	จำนวนลำดับ นิวคลีโอไทด์ (bp)	ผล BLAST		
		แบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึง	Accession number	ความ คล้ายคลึง (%)
S16-U5	1,399	<i>Enterobacter kobei</i> SCAU-C6	MZ209195.1	99.22
S17-U2	1,398	<i>Burkholderia</i> sp. GR 8-02	KM253085.1	97.85
S17-U3	1,404	<i>Klebsiella</i> sp. H1(2014)	KJ195333.1	99.50
S17-U4	1,397	<i>Bacillus niacini</i> GMA029	AB738789.1	99.24
S17-U6	1,420	<i>Klebsiella</i> sp. TN50	MN860085.1	99.72
S17-U7	1,407	<i>Klebsiella variicola</i> YD8	KY887765.1	99.50
S20-U1	1,406	<i>Burkholderia ubonensis</i> S5	MN044778.1	99.79
S25-U1	1,352	<i>Burkholderia cepacia</i> TBMAX66	MK834705.1	95.05
S25-U2	1,389	<i>Burkholderia</i> sp. 3 PSB-70	KF761525.1	99.93
S27-U1	1,411	<i>Klebsiella</i> sp. HSTU-AMS44	MK691477.1	100.00
S1-L1	1,406	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> cjl20	MN177203.1	99.93
S1-L2	1,395	<i>Pantoea dispersa</i> SA004	MN725743.1	99.86
S2-L2	1,389	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> 75	KP974791.1	99.86
S3-L4	1,381	<i>Enterobacter hormaechei</i> NFZ12	MW391763.1	99.77
S8-L1	1,357	<i>Pantoea dispersa</i> SA004	MN725743.1	99.71
S8-L2	1,376	<i>Klebsiella variicola</i> YD8	KY887765.1	99.75
S12-L2	1,413	<i>Klebsiella</i> sp. K-21	MF592279.1	99.65
S17-L3	1,409	<i>Pantoea dispersa</i> YNA11	MK027265.1	99.79
S17-L4	1,394	<i>Pantoea dispersa</i> YNA11	MK027265.1	99.62
S17-L5	1,389	<i>Bacillus niacini</i> GMA029	AB738789.1	99.36
S19-L1	1,404	<i>Burkholderia ubonensis</i> S5	MN044778.1	99.64
S19-L4	1,402	<i>Klebsiella</i> sp. HSTU-AMS44	MK691477.1	99.78
S20-L1	1,396	<i>Burkholderia multivorans</i> NBRC 102086	AB681698.1	98.64
S20-L2	1,396	<i>Burkholderia multivorans</i> NBRC 102086	AB681698.1	99.86

อภิปรายผล

จากผลการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีค่าศักยภาพของน้ำต่ำและผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ 34 ไอโซเลต ถูกจัดจำแนกใน 5 สกุล ได้แก่ *Klebsiella* 11 ไอโซเลต *Burkholderia* 9 ไอโซเลต *Pantoea* 7 ไอโซเลต *Enterobacter* 5 ไอโซเลต และ *Bacillus* 2 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานมาก่อนหน้าที่พบว่าแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในพื้นที่เพาะปลูกพืช มักอยู่ในสกุล *Bacillus* *Burkholderia* *Pantoea* และ *Pseudomonas* (สนธิยา และสุปรานี, 2561) เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและพลังงานได้หลากหลาย ทำให้สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีในบริเวณเขตอิทธิพลของรากพืช (Rhizosphere) โดยใช้สาร

ที่พืชขับออกมาจากราก (Root exudate) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยจำนวนมากได้ทำการศึกษากการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียที่เจริญในบริเวณเขตอิทธิพลของรากพืช พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Achromobacter* *Agrobacterium* *Azospirillum* *Bacillus* *Bradyrhizobium* *Chryseobacterium* *Enterobacter* *Herbaspirillum* *Mesorhizobium* *Phyllobacterium* *Pseudomonas* *Ralstonia* *Serratia* *Sinorhizobium* *Sphingobacterium* และ *Variovorax* เป็นต้น (Alemneh et al., 2021; Kang et al., 2021)

จากผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้ พบว่า มีกิจกรรมและกกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase อยู่ในช่วง 3.78×10^{-4} ถึง 3.52×10^{-2} หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 2.18×10^{-6} ถึง 9.84×10^{-5} หน่วยต่อไมโครกรัมโปรตีนตามลำดับ ถึงแม้ว่าปริมาณเอนไซม์ ACC deaminase ที่แบคทีเรียผลิตจะมีปริมาณต่ำมาก แต่จากรายงานของนักวิจัยที่ผ่านมา พบว่า เอนไซม์ ACC deaminase เพียง 0.02 ไมโครโมล ก็สามารถส่งผลต่อกลไกต่างๆ ในการลดการผลิตเอทิลีนของพืชอย่างมีนัยสำคัญ (Glick, 2014) ในงานวิจัยนี้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตไอโซเลต S15-U4 เป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรมและกกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase สูงสุด เท่ากับ 3.52×10^{-2} หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 9.84×10^{-5} หน่วยต่อไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งเมื่อจัดจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16s rRNA พบว่า S15-U4 มีความคล้ายคลึง *Enterobacter hormaechei* NFZ12 (MW391763.1) เท่ากับ 99.72 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งงานวิจัยที่มีรายงานมาก่อนหน้า พบว่า *Enterobacter hormaechei* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีความสามารถละลายฟอสเฟตผลิตสารคล้ายฮอร์โมนพืช และผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้ด้วย (Niu, et al., 2018) อย่างไรก็ตามการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีค่าศักยภาพของน้ำต่ำและผลิตเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อนำไปวิจัยพัฒนาต่อยอดให้ได้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่ช่วยลดความเครียดของพืชภายใต้สภาวะแล้ง สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ ความปลอดภัยทางชีวภาพ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสามารถในการก่อโรค และข้อกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับปุ๋ยชีวภาพด้วย

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างดินแปลงปลูกอ้อยและพื้นที่ป่าสาธารณะประโยชน์ในจังหวัดชัยภูมิ ขอนแก่น หนองบัวลำภู มหาสารคาม และร้อยเอ็ด จำนวน 58 ตัวอย่าง เพื่อคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีค่าศักยภาพของน้ำต่ำ และสามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase จากการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้ทั้งหมด 176 ไอโซเลต แต่เพียง 89 ไอโซเลต ที่ยังคงแสดงความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya

agar เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 89 ไอโซเลต ไปทดสอบการเจริญในอาหาร TSB และ TSB ที่เติม PEG-6000 ความเข้มข้น 260 กรัมต่อลิตร (ค่าศักย์ของน้ำในอาหารเท่ากับ -0.73 MPa) เพื่อจำลองสภาวะแห้งแล้ง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีค่าศักย์ของน้ำต่ำได้ จำนวน 70 ไอโซเลต แต่เมื่อนำเพาะเลี้ยงในอาหาร DF salts minimal (Dworkin & Foster, 1958) ที่มี ACC 0.3033 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อเตรียมเซลล์แบคทีเรียในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase พบว่า มีเพียง 34 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญได้และถูกนำไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งผลการทดสอบ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase อยู่ในช่วง 3.78×10^{-4} ถึง 3.52×10^{-2} หน่วยต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase อยู่ในช่วง 2.18×10^{-6} ถึง 9.84×10^{-5} หน่วยต่อไมโครกรัมโปรตีน โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตไอโซเลต S15-U4 เป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรม และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACC deaminase สูงสุด ส่วนผลการจัดจำแนกชนิดเบื้องต้นของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทั้ง 34 ไอโซเลต ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16s rRNA พบว่า ถูกจัดจำแนกใน 5 สกุล ได้แก่ *Klebsiella* 11 ไอโซเลต *Burkholderia* 9 ไอโซเลต *Pantoea* 7 ไอโซเลต *Enterobacter* 5 ไอโซเลต และ *Bacillus* 2 ไอโซเลต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) ตามกรอบการสนับสนุนงานวิจัยมูลฐาน (Fundamental Fund) จากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ของกรมวิชาการเกษตร ตามรหัสการทดลอง FF65-02-06-65-00-03-65

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวางแผนการจัดการที่ดินในพื้นที่เสี่ยงภัยทางการเกษตร กองนโยบายและแผนการใช้ที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน. (2563). แผนที่พื้นที่แล้งซ้ำซากภาคตะวันออกเฉียงเหนือประจำปีงบประมาณ 2563 (ช่วงแล้งระหว่างปี 2553 – 2562). สืบค้นเมื่อ 1 ตุลาคม 2564, จาก <http://irw101.1dd.go.th/index.php/2017-05-23-02-00-40/2017-05-23-02-00-39>
- สนธยา ขำดีบ, และสุปรานี มั่นหมาย. (2561). การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชจากดินและรากสับปะรด (รายงานผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2561) กรุงเทพฯ: กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.
- Alemneh, A.A., Zhou, Y., Ryder, M.H., & Denton, M.D. (2021). Is phosphate solubilizing ability in plant growth-promoting rhizobacteria isolated from chickpea linked to their ability to produce ACC deaminase. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 2416–2432.

- Ammar, M.H., Anwar, F., El-Harty, E.H., Migdadi, H.M., Abdel-Khalik, S.M., Al-Faifi, S.A., Farooq, M., & Alghamdi, S.S. (2014). Physiological and yield responses of faba bean (*Vicia faba* L.) to drought stress in managed and open field environments. **Journal of Agronomy and Crop Science**, **201**, 280–287.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**, 248–254.
- Conesa, M.R., de la Rosa, J.M., Domingo, R., Bañon, S., & Pérez–Pastor, A. (2016). Changes induced by water stress on water relations, stomatal behavior and morphology of table grapes (cv. Crimson Seedless) grown in pots. **Scientia Horticulturae**, **202**, 9–16.
- Doetsch, R.N. (1981). **Determinative methods of light microscopy**. Washington, DC.: American Society for Microbiology.
- Dworkin, M., & Foster, J. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. **Journal of Bacteriology**, **75**, 592–601.
- Fathalla, A. & Sabry, S. (2020). Effect of 1-aminocyclopropane–1-carboxylic acid deaminase producing fluorescent *Pseudomonas* on the growth of eggplant under drought stress. **Plant Archives**, **20**, 3389–3394.
- Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, **169**, 30–39.
- Haworth, M., Elliott–Kingston, C., & McElwain, J.C. (2013). Co–ordination of physiological and morphological responses of stomata to elevated [CO₂] in vascular plants. **Oecologia**, **171**, 71–82.
- Kang, S.M., Khan, M.A., Hamayun, M., Kim, L.R., Kwon, E.H., Kang, Y.S., Kim, K.Y., & Lee, I.J. (2021). Phosphate–solubilizing *Enterobacter ludwigii* AFFR02 and *Bacillus megaterium* Mj1212 rescues alfalfa's growth under post–drought stress. **Agriculture**, **11**, 485.
- Michel, B.E., & Kaufmann, M.R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, **51**, 914–916.
- Niu, X., Song, L., Xiao, Y., & Ge, W. (2018). Drought–tolerant plant growth–promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi–arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. **Frontiers in Microbiology**, **8**, 2580.
- Penrose, D.M., & Glick, B.R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase–containing plant growth–promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, **118**, 10–15.
- Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, **17**, 362–370.
- Sarkar, A., Ghosh, P.K., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., Pandey, S., Mondal M.H., & Maiti, T.K. (2018). A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. **Research in Microbiology**, **169**, 20–32.