การคัดเลือกและการจำแนกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase เพื่อช่วยลดสภาวะเครียดในพืชอินทรีย์

Screening and Identification of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Producing Bacteria for Stress Reduction in Organic Plants

สมคิด ดีจริง * จุฑามาศ มณีวงศ์ และ ศิริพร วงค์เทพ
Somkid Deejing *, Chutamas Maneewong and Siriporn Wongtep

บทคัดย่อ

สภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อมทำให้พืชเกิดความเครียดอันเนื่องมาจากการสะสมเอทิลีนในพืช ที่มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการแก่ของพืช ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตพืชด้วย ในการสังเคราะห์เอทิลีนเกิดขึ้นโดยผ่านสารตัวกลางคือ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) แต่มีแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting bacteria, PGPB) ช่วยพืชได้ โดยการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase มาเปลี่ยน ACC ให้เป็นสารอื่นแทนการสร้างเอทิลีนจึงมีผลช่วย ลดความเครียดในพืชได้ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ที่ผลิต ACC deaminase โดยคัดเลือกขั้นต้นบนอาหารแข็งที่เติม ACC พบว่า มีแบคทีเรีย 22 ไอโซเลท จากจำนวน 100 ไอโซเลท ที่เกิดสีรอบโคโลนีบนอาหารที่มี bromthymol blue และ phenol red เป็น อินดิเคเตอร์ และได้แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของ ACC deaminase สูงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ที่เติม ACC ได้แก่ แบคทีเรีย S70, PVKRL2, S143, S149, RLPVK1 และ S216 เท่ากับ 0.030, 0.022, 0.016, 0.012, 0.012 และ 0.011 Unit/ml ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรีย S70 ผลิตเอนไซม์สัมพันธ์กับการเจริญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ สูงสุดเท่ากับ 0.040 Unit/ml ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลการจำแนกชนิดของ แบคทีเรีย S70 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนยาว สร้างเอนไซม์คะตาเลสและออกซิเดส และหมัก น้ำตาลซูโครส มอลโตส กลูโคส และแมนนิทอลได้ และแบคทีเรียนี้มีลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA เป็นแบคทีเรีย *Bacillus endophyticus* ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Nonghan, Sansai, Chiang Mai 50290, Thailand.
* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): kittydeejing@gmail.com, somkid_d@mju.ac.th

ในการทดลองนี้ น่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อช่วยลดผลกระทบจากสภาวะเครียดในพืช อันเกิดจากภาวะอากาศเปลี่ยนแปลง รวมทั้งนำไปประยุกต์ใช้ในระบบเกษตรอินทรีย์ได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ACC deaminase, แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช, สภาวะเครียดในพืช, ภาวะอากาศเปลี่ยนแปลง

ABSTRACT

Stressful environmental conditions can lead to plant stress from ethylene accumulation and then induce plant senescence that affects growth and yield of plants. Ethylene was synthesized by using 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) as the intermediate precursor. However, plant growth promoting bacteria (PGPB) facilitated plant growth by ACC deaminase production to change ACC into other substances instead of ethylene for *stress* reduction in plants. The purpose of this research is to screen and identify ACC deaminase producing bacteria. Primary screening was done on solid medium containing ACC. It was found that 22 bacteria of 100 isolates produce a halo zone on solid medium adding bromthymol blue and phenol red as pH indicators. High ACC deaminase activity bacteria were S70, PVKRL2, S143, S149, RLPVK1 and S216 at 0.030, 0.022, 0.016, 0.012, 0.012 and 0.011 Unit/ml, respectively. The result showed that isolate S70 showed ACC deaminase activity correlated with growth and had maximum ACC deaminase at 0.040 Unit/ml for 48 hours. The identification of bacterial S70 was examined. It was found that bacterial S70 was Gram positive, rod shape, catalase and oxidase positive, and fermented sucrose, maltose, glucose and mannitol. The sequencing of the 16S rRNA gene of bacteria S70 was *Bacillus endophyticus* with a sequence similarity of 100 %. The potential of selected bacteria are likely to reduce the effects of stress condition from climate change and its application to organic farming systems can be explored in future.

Key words: ACC deaminase, plant growth-promoting bacteria, plant stress, climate change

บทนำ

การทำเกษตรกรรมอาจพบปัญหาจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอันมีสาเหตุมาจากสิ่งมีชีวิต (โรคพืช และศัตรูพืช) และสิ่งไม่มีชีวิต (ความแห้งแล้ง น้ำท่วม ความเค็ม อุณหภูมิ แสง) แล้วก่อให้เกิดความเครียดที่ส่งผลกระทบต่อพืชได้ โดยทั่วไปเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดพืชจะสังเคราะห์เอทิลีนเพื่อตอบสนองต่อความเครียด หากพืชมีการสะสมเอทิลีนปริมาณมากจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช (Dubois *et al.,* 2018) รวมทั้ง เอทิลีนยังทำให้เกิดการแก่ของพืชได้ นอกจากนี้ หากปริมาณออกซินในพืชสูง

ยังกระตุ้นให้พืชสร้างเอทิลีนได้อีกด้วย (Pierik *et al.*, 2006) โดยในการสังเคราะห์เอทิลีนจะเริ่มจากเมไทโอนีนเปลี่ยนไปเป็น S-adenosylmethionine (SAM) แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็น ACC ได้เป็นเอทิลีน แบคทีเรียที่มีบทบาทช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่เป็นกลุ่ม PGPB เช่น แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase มีบทบาทช่วยให้พืชทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ ได้โดยแบคทีเรียข้างต้นจะใช้ ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วสลายให้เป็นแอมโมเนียและ alpha-ketobutyrate จึงทำให้ระดับ ACC ลดลงส่งผลให้ระดับของเอทิลีนในพืชลดลงด้วย ดังนั้น จึงมีผลช่วยลดความเครียดในพืชได้ (Cheng *et al*., 2007) โดย Bal *et al.* (2013) รายงานว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืชผลิต ACC deaminase ได้ 603.94 ถึง 1350.02 nmol α-ketobutyrate mg^{-1} h^{-1} และ ผลิต IAA ได้ 10.54 ถึง 37.65 μM ml^{-1} และผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดย 16S rRNA พบว่า เป็น *Bacillus*, *Microbacterium*, *Methylophaga*, *Agromyces* และ *Paenibacillus* และยังมีรายงานว่า แบคทีเรีย *Bacillus endophyticus* ที่แยกได้จากดินรอบรากสมุนไพรช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น ละลายฟอสเฟต ผลิต IAA ไซเดอร์โรฟอร์ รวมทั้งยังผลิตเอนไซม์ต่างๆ เช่น ACC deaminase, cellulase, lipase, protease, chitinase และสารต้านเชื้อรา (Ramanuj and Shelat, 2018) ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Bacillus* sp. ยังมีบทบาทช่วยควบคุมโรคไหม้ในข้าว และช่วยเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวได้อีกด้วย (Ahmed *et al*., 2015) โดยมีรายงานการใช้แบคทีเรีย PGPR ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ซึ่ง Ahmad *et al.* (2018) พบว่า *Bacillus subtilis* และ *Paenibacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตช่วยให้ต้นฝ้ายเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างจัด ส่วน แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* REN1 ที่ผลิต ACC deaminase และผลิต IAA ช่วยเพิ่มการยืดยาวของราก และเพิ่มการแตกรากของข้าวเมื่ออยู่ในสภาวะน้ำท่วมขังได้ดี (Etesami *et al.*, 2014) และยังมีรายงานว่า สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมที่เกิดจากภาวะอากาศเปลี่ยนแปลงก็ส่งผลทำให้ผลผลิตข้าวขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี ชัยนาท กข 6 และข้าวเหนียวสันป่าตอง ลดลงด้วย (Kawasaki and Herath, 2011)

แบคทีเรียละลายฟอสเฟตและผลิต IAA จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม PGPB ที่มีบทบาทในการช่วยพืชในด้านต่างๆ (Ma *et al*., 2011) ซึ่งผู้วิจัยมีแบคทีเรียทั้งสองชนิดข้างต้นที่มีผู้คัดเลือกไว้แล้วอยู่ใน stock culture ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และผู้วิจัยเห็นว่า แบคทีเรีย PGPB โดย 1 เชื้อ อาจมีคุณลักษณะที่ดีมากกว่า 1 ลักษณะ ซึ่งเป็นบทบาทที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต หรือผลิต IAA มาคัดเลือกหาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อให้ได้เชื้อที่มีลักษณะที่ดีมากกว่า 1 ลักษณะอยู่ในเชื้อเดียวกัน และยังจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ได้สูง สำหรับนำไปประยุกต์เพื่อช่วยให้พืชอินทรีย์ทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรม ACC deaminase ขั้นต้น

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวมะลิแดงอินทรีย์ น้ำหมักชีวภาพ และแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวมะลิแดงอินทรีย์ ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟต หรือผลิต IAA ได้

ที่มีผู้คัดเลือกไว้ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 100 ไอโซเลท มาคัดเลือกหาเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ขั้นต้น โดยทำ point inoculation ลงบนอาหารแข็ง Nitrogen free agar (NFA) ที่เติม ACC และมี bromthymol blue และ phenol red อินดิเคเตอร์ที่บ่งบอกการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง คือ ผลบวกบนอาหารที่มี bromthymol blue จะมีสีรอบโคโลนีเป็นสีฟ้า ส่วนอาหารที่มี phenol red ผลบวกจะมีสีรอบโคโลนีเป็นสีแดง จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเชื้อที่มีสีรอบโคโลนีทุกไอโซเลทไว้ศึกษาต่อไป

การทดสอบการผลิต ACC deaminase ในอาหารเหลว

เตรียมเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากับค่าความขุ่น McFarland No. 1.0 แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB ที่มี ACC 3 mM ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง แล้วเก็บเซลล์แบคทีเรียไปสกัดเอนไซม์โดยเติม Tris-HCl 0.1 M (pH 7.6) 1 มิลลิลิตร ผสมแล้วปั่นเหวี่ยงแล้วเก็บเซลล์นำมาใส่ Tris-HCl 0.1M (pH 8.5) แล้วเติมโทลูอีน และเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์กิจกรรม ACC deaminase ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Penrose and Glick (2003) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry *et al*., 1951) 1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณ α-ketobutyrate ที่เกิดขึ้น 1 µmol ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ เลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของ ACC deaminase สูงสุดไว้ศึกษาต่อไป

การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญกับการผลิต ACC deaminase

นำแบคทีเรียที่มีกิจกรรม ACC deaminase สูงสุด มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่เติม ACC ปริมาณอาหาร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ถึง 60 ชั่วโมง วัดการเจริญด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm และวิเคราะห์กิจกรรม ACC deaminase

การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรีย

ศึกษาคุณลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของ ACC deaminase สูง โดยดูลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแบบแกรม แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ และบันทึกการติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ได้แก่ การผลิตเอนไซม์คะตาเลส ออกซิเดส และการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น ฟรุคโตส ซูโครส มอลโตส กลูโคส กาแลคโตส ไซลิทอล แลคโตส และแมนนิทอล

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Geneaid, Taiwan) และเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ universal primer (Biobasic., Inc. Canada) คือ 27F ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5’-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3’ และ 1522R มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5’-AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA -3’ โดย

ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA ดังนี้คือ ใช้อุณหภูมิและระยะเวลาสำหรับ denaturation, annealing และ extension ที่อุณหภูมิ 95, 55 และ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 1 และ 1 นาที ตามลำดับ จำนวน 30 รอบ แล้วนำไปหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดย First base laboratories ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The national center for biotechnology information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรม ACC deaminase ขั้นต้น

ผลการคัดเลือกขั้นต้นบนอาหารแข็ง NFA พบว่า มีแบคทีเรีย 22 ไอโซเลท จาก 100 ไอโซเลท ที่เกิดสีฟ้ารอบโคโลนีเชื้อบนอาหารที่เติม bromthymol blue และเกิดสีแดงรอบโคโลนีบนอาหารที่มี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่ง Patil *et al*. (2016) อธิบายว่า การที่เกิดสีรอบโคโลนีบนอาหารแข็งที่มี bromthymol blue และ phenol red เนื่องจากแบคทีเรียใช้ ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน แล้วเกิดแอมโมเนีย และ α–ketobutyrate จึงเกิดการเปลี่ยนสีรอบโคโลนีของเชื้อขึ้น

ผลการทดสอบการผลิต ACC deaminase ในอาหารเหลว

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลว พบว่า มีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลทคือ แบคทีเรีย S70, PVKRL2, S143, S149, RLPVK1 และ S216 มีค่ากิจกรรม (enzyme activity (Unit/ml) ของ ACC deaminase สูงเท่ากับ 0.030, 0.022, 0.016, 0.012, 0.012 และ 0.011 Unit/ml ตามลำดับ และมีกิจกรรมจำเพาะ (specific activity (Unit/μgProtein) ของ ACC deaminase เท่ากับ $2.340\text{x}10^{-4}$, 5.890×10^{-5} ,$7.320\times10^{-5}5.630\times10^{-5}$, 4.290×10^{-5} และ 4.120×10^{-5} Unit/μgProtein ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งแบคทีเรีย S70, S143 และ S149 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวมะลิแดงอินทรีย์ ส่วน PVKRL2 และ RLPVK1 เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบข้าวมะลิแดงอินทรีย์ และแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถละลายฟอสเฟตได้ จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย S70 มีกิจกรรมจำเพาะของ ACC deaminase สูงสุดเท่ากับ 2.340×10^{-4} Unit/μg Protein ซึ่ง Castillo *et al*. (2015) แยกเชื้อได้จากดินรอบราก แบคทีเรียที่อาศัยตามผิว และแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าว ซึ่งเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ ซึ่งได้อธิบายว่า บริเวณรอบรากพืชมีการปล่อยสารอาหารต่างๆ แก่แบคทีเรีย ได้แก่ กรดอะมิโน (histidine, proline, valine, alanine และ glycine) และน้ำตาล (glucose, arabinose, mannose, galactose) และสารอื่นๆ เช่น glucuronic acid จึงเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียมารวมอยู่บริเวณรอบรากพืช รวมทั้ง ส่งเสริมให้เอนโดไฟท์เข้าสู่พืชได้อีกด้วย (Jiménez *et al*., 2003) นอกจากนี้ ประกายดาว (2557) รายงานว่า แบคทีเรีย S70 สามารถละลายฟอสเฟตได้ จะเห็นได้ว่า ในการทดลองนี้ คัดเลือกได้แบคทีเรีย S70 ที่มีคุณลักษณะที่ดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 2 ลักษณะอยู่ในเชื้อเดียวกันคือ สามารถละลายฟอสเฟตได้ซึ่งที่ช่วยให้พืชได้ประโยชน์จากฟอสเฟต และยังมีกิจกรรมของ ACC deaminase ที่จะช่วยให้พืชทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ทำให้ได้แบคทีเรียที่มี

ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้มากยิ่งขึ้น ซึ่ง Baig *et al.* (2012) พบว่า *Bacillus* sp. ที่มีคุณลักษณะ 2 ลักษณะคือ มีกิจกรรมของ ACC deaminase และละลายฟอสเฟต จะมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าเชื้อมีคุณลักษณะอย่างเดียว โดยแบคทีเรียที่ผลิต ACC deaminase จะมีบทบาทช่วยให้พืชทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนน้ำท่วม ทนแล้ง ทนความเค็ม ทนต่อเชื้อก่อโรค รวมทั้งทนต่อสิ่งปนเปื้อนในดินได้ดี (Glick, 2014)

ตารางที่ 1 ผลการคัดเลือกขั้นต้นของแบคทีเรียที่มีกิจกรรม ACC deaminase บนอาหารแข็ง NFA และกิจกรรมของเอนไซม์ และกิจกรรมจำเพาะของ ACC deaminase ในอาหารเหลว TSB ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Bacterial code	Sources	NFA +bromthymol blue	NFA +phenol red	Enzyme activity (Unit/ml)	Specific activity (Unit/µg Protein)
S59	Soil from rhizosphere of organic rice	+	+	1.130×10^{-3}	4.040×10^{-6}
S60	Soil from rhizosphere of organic rice	+	+	4.694×10^{-3}	1.660×10^{-5}
S70	Soil from rhizosphere of organic rice	+	+	0.030	2.340×10^{-4}
S91	Soil from rhizosphere of organic rice	+	+	2.066×10^{-3}	1.380×10^{-5}
S129	Soil from rhizosphere of organic rice	+	-	1.690×10^{-3}	5.110×10^{-6}
S143	Soil from rhizosphere of organic rice	+	-	0.016	7.320×10^{-5}
S149	Soil from rhizosphere of organic rice	-	+	0.012	5.630×10^{-5}
S213	Soil from rhizosphere of organic rice	+	+	2.630×10^{-3}	9.130×10^{-6}
S216	Soil from rhizosphere of organic rice	+	-	0.011	4.120×10^{-5}
S230	Soil from rhizosphere of organic rice	+	-	9.014×10^{-3}	2.970×10^{-5}
BF12	Biofertilizer	+	+	4.319×10^{-3}	1.350×10^{-5}
BF27	Biofertilizer	+	-	0	0
BF41	Biofertilizer	+	+	3.192×10^{-3}	8.310×10^{-6}
PVKRL1	Endophyte from organic rice leaves (1 year)	+	+	1.127×10^{-3}	5.870×10^{-6}
PVKRL2	Endophyte from organic rice leaves (1 year)	+	+	0.022	5.890×10^{-5}
PCARL5	Endophyte from organic rice leaves (1 year)	+	+	0	0
RLPVK1	Endophyte from organic rice leaves (10 years)	+	-	0.012	4.290×10^{-5}
RRTSA3	Endophyte from organic rice roots (10 years)	+	+	4.880×10^{-3}	1.910×10^{-5}
RRPCA4	Endophyte from organic rice roots (10 years)	+	-	2.817×10^{-3}	1.040×10^{-5}
RRTSA5	Endophyte from organic rice roots (10 years)	+	+	2.629×10^{-3}	7.140×10^{-6}
RSTSA1	Endophyte from organic rice stems (10 years)	+	-	3.944×10^{-3}	1.370×10^{-5}
W-RS	Surface sterile water	+	+	9.389×10^{-4}	2.930×10^{-6}

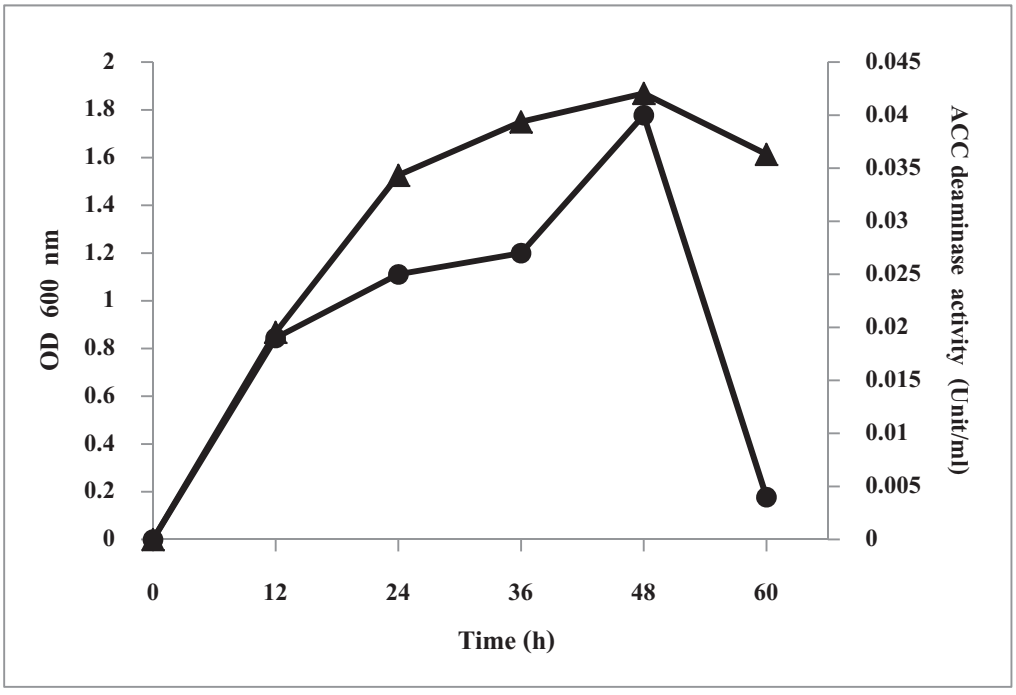
หมายเหตุ + คือเกิดสีรอบโคโลนี - คือไม่เกิดสีรอบโคโลนี

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญกับการผลิต ACC deaminase

ในการทดลองนี้ แบคทีเรีย S70 ผลิต ACC deaminase สัมพันธ์กับการเจริญคือ มีการเจริญสูงก็สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงด้วย ซึ่งเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 1) แต่จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียมีการเจริญลดลงและผลิตเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง อาจเป็นผลมาจากสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มหมด หรือ ACC ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณน้อยลงในช่วงท้ายๆ ของการเจริญของแบคทีเรียซึ่ง Penrose and Glick (2008) อธิบายว่า แบคทีเรียมีการนำ ACC ไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยการนำเข้าสู่เซลล์เพื่อสลายโดยเอนไซม์ ACC deaminase จึงมีผลทำให้ ACC มีปริมาณลดลง นอกจากนี้ ยังอาจมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องอีก โดย Hontzeasa *et al.* (2004) อธิบายว่า แบคทีเรียรีคอมบิแนนท์ *Pseudomonas putida* UW4 ผลิต ACC deaminase ที่มีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรทคือ ACC ซึ่งเอนไซม์นี้จะมีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 และจะมีกิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็ว หรือไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เลยเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 8.0 และจะไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์นี้เลยเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง สูงกว่า 10.0 จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่า แบคทีเรีย S70 ผลิต ACC deaminase ได้ไม่สูงมากนักอาจเป็นผลเนื่องมาจากยังไม่ได้หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในการช่วยให้ผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงขึ้น เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และอื่นๆ นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบการผลิต ACC deaminase ในการทดลองนี้คืออาหาร tryptic soy broth (TSB) ที่มี tryptone และ soybean meal เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ซึ่งอาจมีเปปไทด์และกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ (Liu *et al.*, 2017) โดยเชื้ออาจใช้องค์ประกอบข้างต้นเป็นแหล่งไนโตรเจนแทน ACC ได้ แต่อย่างไรก็ตาม Khan *et al.* (2016) ก็ทดสอบการผลิต ACC deaminase ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ Bacillus subtilis LK14 ที่แยกได้จากพืชในกลุ่มมะรุม Moringa peregrine โดยใช้อาหาร TSB เช่นเดียวกัน ซึ่งก็พบว่า เชื้อสามารถผลิต ACC deaminase ได้ 448.3 ± 2.91 nM α-ketobutyrate $mg^{-1} h^{-1}$ ซึ่ง Jacobson *et al.* (1994) อภิปรายว่า ACC deaminase จะถูกสร้างขึ้นและมีกิจกรรมของเอนไซม์นี้เมื่อมีการมี ACC มาเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาได้ นอกจากนี้ Shrivastava and Kumar (2013) พบว่า แบคทีเรีย *Klebsiella* sp. ECI-10A ซึ่งแยกได้จากรอบรากพืช ผลิต ACC deaminase ได้สูงสุด 539.1 nmol α-keto butyrate/ mg protein/ h ในอาหารที่มี ACC 5 mM ที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ผลจากการทดลองนี้อาจจะทดสอบการผลิต ACC deaminase ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้สูงสุดต่อไป

ผลการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย S70 มีลักษณะโคโลนี สีครีม รูปร่างกลม ขอบหยัก ผิวหน้านูน มันวาว เป็นเมือก เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนขนาดใหญ่ ต่อเป็นสายยาว เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียนี้ผลิตได้ทั้งเอนไซม์คะตาเลสและ ออกซิเดส และสามารถหมักน้ำตาลซูโครส มอลโตส กลูโคส และแมนนิทอล แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลฟรุคโตส กาแลคโตส ไซลิทอล และแลคโตสได้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 1 ผลความสัมพันธ์การเจริญ (▲) และการผลิต ACC deaminase (●) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย S70 ในอาหาร TSB

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรีย S70

Physiological and biochemical characteristics									
Catalase	**Oxidase**	**Fructose**	**Sucrose**	**Maltose**	**Glucose**	**Galactose**	**Xylitol**	**Lactose**	**Mannitol**
+	+	-	+	+	+	-	-	-	+

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรีย S70 แล้วนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ได้ผลการเทียบลำดับเบสของแบคทีเรีย S70 ตรงกับลำดับเบสของเป็น *Bacillus endophyticus* strain MR104 ที่ Accession number MG271914.1 ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus endophyticus* แยกได้ครั้งแรกจากเนื้อเยื่อของต้นฝ้าย (Reva *et al*., 2002) และ *B. endophyticus* ที่คัดเลือกได้ในการทดลองนี้อาจเป็นเอนโดไฟท์ที่เข้าไปอาศัยในเนื้อเยื่อของพืชได้ โดย Chi *et al*. (2005) ได้ทดสอบการเคลื่อนย้ายของเอนโดไฟท์จากรากสู่ใบของข้าว ซึ่งการเข้าสู่พืชเริ่มจากแบคทีเรียมารวมกลุ่มกันที่บริเวณผิวของรากพืชแล้วแทรกตัวเข้าสู่รากพืชแล้วเคลื่อนที่ขึ้นไปผ่านลำต้นของพืชและเข้าสู่ใบจากนั้นจึงเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้และยังพบว่า เอนโดไฟท์มีผลทำให้ได้มวลของรากและลำต้นของข้าวเพิ่มขึ้น ช่วยเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสง เพิ่มอัตราการหายใจ

เพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำ และเพิ่มพื้นที่ใบธงของข้าว และทำให้มีการสะสมฮอร์โมนพืชคือ IAA และ gibberellin ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชให้เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย ซึ่งแบคทีเรีย S70 ที่คัดเลือกได้ในการทดลองนี้อาจจะเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่น่าจะช่วยพืชได้ด้วยเช่นเดียวกัน ซึ่ง Leena *et al*. (2017) รายงานว่า *B. endophyticus* เป็นเชื้อที่ทนต่ออุณภูมิได้กว้าง 15-45 องศาเซลเซียส pH 5.0-9.0 และรอดชีวิตได้ในเกลือโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์ และยังมีรายงานการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. โดย Sicuia *et al*. (2015) พบว่า เชื้อกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ต่างๆ เช่น chitinase, cellulase, protease, lipase, amylase และ decarboxylase ที่ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคพืชได้ และยังมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ protease จาก *B. endophyticus* มาย่อยขนไก่เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้ง และยังช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Thazeem *et al.* 2016) ซึ่งแบคทีเรีย S70 ที่คัดเลือกได้ในการทดลองนี้อาจจะนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับแบคทีเรียอื่นๆ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเมื่ออยู่ในภาวะเครียดโดยVurukonda *et al*. (2016) ใช้แบคทีเรียที่แยกดินรอบรากพืชร่วมกับพวกเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต ACC deaminase ฮอร์โมนพืช สารระเหย และโพลีแซคคาไรด์ได้ เพื่อมาช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากความแห้งแล้ง และ Belimov *et al.* (2009) รายงานการใช้แบคทีเรียที่ผลิต ACC deaminase ที่แยกได้จากดินรอบรากพืชเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อปลูกพืชในสภาพดินแห้งจากภาวะอากาศเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ Chauhan *et al*. (2016) พบว่า *B. endophyticus* ผลิตสาร iturin, surfactin และ fengycin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโรคเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium solani* ของพืชสมุนไพรที่มีเหง้าได้ และยังมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรีย *B. endophyticus* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้มากมาย ได้แก่ สารต้านมะเร็ง (Venkatachalam and Nadumane, 2018) สารต้านเชื้อรา (Sansinenea *et al*., 2016) ใช้บำบัดสีในน้ำเสีย (Kumari *et al*. 2016) ผลิตแบคเทอริโอซิน (Zimina *et al*., 2016) ผลิต polyhydroxyalkanoates (PHAs) ผลิตพลาสติกชีวภาพ (Negintaji *et al*., 2010) และ Subramanian *et al*. (2017) ยังรายงานว่า *B. endophyticus* เป็นเชื้อที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของไส้เดือนดินสามารถผลิตวิตามินบี riboflavin ให้แก่ไส้เดือนดินเพื่อช่วยการงอกใหม่ของไส้เดือนดิน *Eudrilus eugeniae* ได้ ส่วน Shan (2017) พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากถั่วเขียว ซึ่งสามารถผลิต ACC deamniase ละลายฟอสเฟต และผลิต IAA ช่วยเพิ่มการงอกของราก เพิ่มความยาวของลำต้น และเพิ่มน้ำหนักสดของถั่วเขียว และจำแนกเชื้อเป็น *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. นอกจากนี้ การใช้เชื้อข้างต้นร่วมกับเชื้อ *Mesorhizobium* sp. มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะขาดน้ำอีกด้วย

สรุป

การทดลองนี้ คัดเลือกได้แบคทีเรีย S70 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวมะลิแดงอินทรีย์ และเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต แบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนต่อเป็นสายยาว และมีลำดับเบสของยีนส่วน 16SrRNA เหมือนกับ *Bacillus endophyticus* ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบคทีเรีย S70 ผลิต ACC deaminase สัมพันธ์กับการเจริญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.040 Unit/ml ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง *B. endophyticus*

S70 ซึ่งคัดเลือกได้ในการทอลองนี้ เป็นแบคทีเรียทั้งละลายฟอสเฟตและผลิต ACC deaminase ได้อยู่ในเชื้อเดียวกัน จึงน่าจะเป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อช่วยเพิ่มธาตุอาหารคือฟอสเฟตที่เป็นประโยชน์ให้แก่พืช รวมทั้งจะช่วยให้พืชทนทานต่อความเครียดจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้อีกด้วย และน่าจะประยุกต์ใช้ในระบบเกษตรอินทรีย์ นอกจากนี้ อาจจะศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้น รวมทั้งนำไปทดสอบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านอื่นๆ ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่สนับสนุนทุนวิจัยนี้ รวมทั้งขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และสถานที่ในการปฏิบัติงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ประกายดาว จิตสุข. 2557. การคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้น. การเรียนรู้อิสระปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

Ahmad, M., Ahmad, I., Hilger, T.H., Nadeem, S.M., Akhtar, M.F., Jamil, M., Hussain, A. and Zahir, Z.A. 2018. Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. **PeerJ** 6: 1-22.

Ahmed, S.A., Shakh, E., Kakar, K.U., Wang, X., Almoneafy, A.A., Ojaghian, M.R., Li, B., Anjum, S.I. and Xie, G. 2015. Controlling bacterial leaf blight of rice and enhancing the plant growth with endophytic a rhizobacterial *Bacillus* strains. **Journal of Toxicological and Environmental Chemistry** 97(6): 55-63.

Baig, K.S., Arshad, M., Shaharoona, B., Khalid, A. and Ahmed, I. 2012. Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Annals of Microbiolbiology** 62: 1109-1119.

Bal, H.B., Das, S., Dangar, T.K. and Adhya, T.K. 2013. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. **Journal of Basic Microbiology** 6(4): 42-50.

Belimov, A.A., Dodd, I.C., Hontzeas, N., Theobald, J.C., Safronova, V. and Davies, W.J. 2009. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. **New Phytologist** 181(2): 413-423.

Castillo, I., Ojeda, J., Megías, E., Manyani, H., Baena, F.J.L., Montaño, F.P., Bellogín, R.A., Espuny, M.R., Cubo, M.T., Ollero, F.J. and Megías, M. 2015. Isolation of endophytic, epiphytic and rhizosphere plant growth-promoting bacteria from cultivated rice paddy soils of the Guadalquivir river marshes. **Global Advanced Research Journal of Agricultural Science** 4(2): 127-136.

Chauhan, A.K., Maheshwari, D.K., Kim, K. and Bajpai, V.K. 2016. Termitarium-inhabiting *Bacillus endophyticus* TSH42 and *Bacillus cereus* TSH77 colonizing *Curcuma longa* L.: isolation, characterization, and evaluation of their biocontrol and plant-growth-promoting activities. **Canadian Journal of Microbiology** 62: 880-892.

Cheng, Z., Park, E. and Glick, B.R. 2007. 1-Aminocyclopropane1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. **Canadian Journal of Microbiology** 53: 912-918.

Chi, F., Shen, S.H., Cheng, H.P., Jing, Y.X., Yanni, Y.G. and Dazzo, F.B. 2005. Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology** 71(11): 7271-7278.

Dubois, M., Broeck, L.V. and Inzé, D. 2018. The pivotal role of ethylene in plant growth. **Trends in Plant Science** 23(4): 311-323.

Etesami, H., Mirseyed, H. and Alikhani, H.A. 2014. Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-caboxylate (ACC) deaminase, a useful trait to elongation and endophytic colonization of the roots of rice under constant flooded conditions. **Physiology and Molecular Biology of Plants** 20(4): 425-434.

Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research** 169(1): 30-39.

Hontzeasa, N., Zoidakisb, J., Glicka, B.R., Mahdi, M. and Oma, A. 2004. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. **Biochimica et Biophysica Acta** 1703: 11-19.

Jacobson, C.B., Pasternak, J.J. and Glick, B.R. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Canadian Journal of Microbiology** 40: 1019-1025.

Jiménez, M.B., Flores, S.A., Zapata, E.V., Campos, E.P., Bouquelet, S. and Zenten, E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. **Plant and Soil** 249(2): 271-277.

Kawasaki, J. and Herath, S. 2011. Impact assessment of climate change on rice production in Khon Kaen province, Thailand. **International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences** 17(2): 14-28.

Khan, A.L., Halo, B.A., Elyassi, A., Ali, S., Hosni, K.A., Hussain, J. Harrasi, A.A. and Lee , I.J. 2016. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of Solanum lycopersicum. **Electronic Journal of Biotechnology** 21: 58-64.

Kumari, M., Shah, M.P. and Cameotra1, S.S. 2016. Bioremediation of remazol black B by newly isolated *Bacillus endophyticus* LWIS strain. **Advances in Biotechnology and Microbiology** 1(4): 1-7.

Leena, M., Aamer, C., Abdul, A.S. and Fariha, H. 2017. Physiological, biochemical and phylogenetic characterization of extremely halophilic bacteria isolated from khewra mine, Pakistan. **Applied Ecology and Environmental Research** 16(2): 1243-1256.

Liu, J., Zhou1, J., Wang, L., Ma, Z., Zhao, G., Ge, Z., Zhu, H. and Qiao, J. 2017. Improving nitrogen source utilization from defatted soybean meal for nisin production by enhancing proteolytic function of *Lactococcus lactis* F44. **Scientific Reports** 7: 1-13.

Lowry, O.H., Resenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** 193: 265-275.

Ma, Y., Prasad, M.N.V., Rajkumar, M. and Freitas, H. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances** 29: 248-258.

Negintaji, N., Amini, S.R. and Ghasemi, Y. 2010. Bioproduction of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus endophyticus* isolated from the Maharlou salt lake in south of Iran. **Journal of Biotechnology** 150: S1-S576.

Patil, C., Suryawanshi, R., Koli, S. and Patil, S. 2016. Improve method for effective screening of ACC deaminase producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods** 131: 102-104.

Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum** 118(1): 10-15.

Penrose, D.M and Glick, B.R. 2008. Quantifying the impact of ACC deaminase-containing bacteria on plants, pp. 489-502. *In* Varma, A., Abbott, L., Werner, D. and Hampp, R., eds. **Plant Surface Microbiology.** Springer, Berlin, Heidelberg.

Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J. and Voesenek, L.A. 2006. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends Plant Science** 11: 176-183.

Ramanuj, K.B. and Shelat, H.N. 2018. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes from medicinal plants. **Advances in Research** 13(6): 1-15.

Reva, O.N., Smirnov, V.V., Pettersson, B. and Priest, F.G. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 52: 101-107.

Sansinenea, E., Salazar, F., Jiménez, J. and Ortiz, A.A. 2016. Diketopiperazines derivatives isolated from *Bacillus thuringiensis* and

Bacillus endophyticus, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. **Tetrahedron Letters** 57(24): 2604-2607.

Shan, S.R. 2017. Use of rhizobacteria producing ACC-deaminase for plant growth in stimulating potential under water stressed conditions. **Journal of Environmental Microbiology** 5(1): 367-375.

Shrivastava, U.P. and Kumar, A. 2013. Characterization and optimization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) activity in different rhizospheric PGPR along with *Microbacterium* sp. train ECI-12A. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology** 1(1): 11-15.

Sicuia, O.A., Grosu, A., Constantinescu F., Voaides, C. and Cornea, C.P. 2015. Enzymatic and genetic variability in *Bacillus* spp. strains with plant beneficial qualities. **AgroLife Scientific Journal** 4(2): 124-131.

Subramanian, E.R., Sudalaimani, D.K., Samue, J.R., Christyraj, S., Ramamoorthy, K., Gopidaisy, N., Durairaj, J., Christyraji, S., Renganathan, K., Krishn, S. and Sivasubramaniam, S. 2017. Studies on organogenesis during regeneration in the earthworm, *Eudrilus eugeniae*, in support of symbiotic association with *Bacillus endophyticus*. **Turkish Journal of Biology** 41: 113-126.

Thazeem, B., Umesh, M. and Vikas, O.V. 2016. Bioconversion of poultry feather into feather meal using Proteolytic *Bacillus* Species: A comparative study. **International Journal of Advanced Scientific Research** 1(1): 10-12.

Venkatachalam, P. and Nadumane, V.K. 2018. Purification and characterization of a protease inhibitor with anticancer potential from *Bacillus endophyticus* JUPR15. **Current Cancer Therapy Reviews** 14: 1-12.

Vurukonda, S.S., Vardharajula, S., Shrivastava, M. and SkZ, A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research** 184: 13-24.

Zimina, M.I., Prosekov, A.Y., Sukhikh, S.A., Babich, O.O. and Noskova, S.Y. 2016. Determination of optimum cultivation conditions for synthesis of bacteriocins with *Bacillus endophyticus* and *Bacillus licheniformis* strains and their stability investigation. **Food Processing: Techniques and Technology** 43(4): 22-29.

หมายเหตุ: บทความนี้มาจากงานประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 10 ปี พ.ศ. 2561