บทความวิจัย (Research Article)

การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียทนแล้งที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากดินสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี

Screening of Exopolysaccharide-Producing Drought Tolerant Rhizobacteria from Orchard Soils in Chanthaburi Province

จิรภัทร จันทมาลี[1*] และ วิญญู ภักดี[1]
Jirapat Chanthamalee[1*] and Winyou Puckdee[1]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
[1]Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University
*Corresponding author email: jirapat.c@rbru.ac.th

วันที่รับบทความ (Received) 22 กันยายน 2566
วันที่ได้รับบทความฉบับแก้ไข (Revised) 19 ตุลาคม 2566
วันที่ตอบรับบทความ (Accepted) 20 ตุลาคม 2566

บทคัดย่อ

การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของไรโซแบคทีเรียมีผลอย่างมากต่อการเจริญและการทนแล้งของพืช ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการประเมินความสามารถในการสร้างคะตะเลส ออกซิเดส และคัดเลือกไรโซแบคทีเรียทนแล้งที่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS) ซึ่งคัดแยกมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้จากพื้นที่แห้งแล้งของสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี ผลการทดสอบพบว่าทั้ง 19 ไอโซเลทสามารถผลิตคะตะเลสได้ โดยมี 8 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาออกซิเดส ยิ่งกว่านั้นทุกไอโซเลทสามารถสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ จากการทดสอบด้วยวิธี Modified alcian blue dye เมื่อทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Mineral salt ที่เติม PEG 60000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร เพื่อจำลองสภาวะเครียดน้ำ โดยมีเปอร์เซ็นต์การผลิต EPS ในช่วง 6.76-45.02% ซึ่งคัดเลือกได้ไอโซเลท MuD01-2 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน มีลักษณะโคโลนีเป็นเมือกเยิ้ม ที่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณสูงสุด (45.02 ± 1.15%) ทั้งนี้ไอโซเลทดังกล่าวสามารถทนต่อภาวะเครียดน้ำได้สูง โดยมีปริมาณเซลล์ 9.47 ± 0.30 log CFU/ml จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ซึ่งผลที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุมที่ไม่เติม PEG 6000 (9.23 ± 0.15 log CFU/ml) จากข้อมูลที่ได้ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ MuD01-2 มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียทนแล้งเพื่อการประยุกต์ใช้ในพื้นที่สวนผลไม้ต่อไป

คำสำคัญ: ไรโซแบคทีเรียทนแล้ง, เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์, ดินสวนผลไม้

Abstract

Exopolysaccharide production of rhizobacteria strongly affects plant growth and drought tolerance. This work aims at evaluating the ability of bacteria previously isolated from the dry region of orchard soils in Chanthaburi province to produce catalase, oxidase and screening exopolysaccharide producing drought tolerant rhizobacteria. The findings revealed all 19 isolates were capable of producing catalase, while 8

isolates showed ability to generate oxidase. Furthermore, all 19 isolates exhibited exopolysaccharide production when cultured in a mineral salt medium (MS) supplemented with 15% w/v PEG 6000 to simulate drought stress. The results were confirmed using the modified alcian blue dye test, with percentages ranging from 6.76 to 45.02. Isolate MuD01-2, a gram-positive bacillus with a mucoid colony, was selected due to the highest EPS production (45.02 ± 1.15%). Additionally, isolate MuD01-2 presented high tolerance to water stress with a cell number of 9.47 ± 0.30 log CFU/ml after 6 days culturing in Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with 15% (w/v) PEG 6000. The results of water stress tests were not significantly different from those of the control without PEG 6000 (9.23 ± 0.15 log CFU/ml, $p < 0.05$). MUD01-2 showed high potential to be developed as a drought bioinoculant for application in orchard soils.

Keywords: Drought-tolerant rhizobacteria; Exopolysaccharide; Orchard soils

บทนำ

ภัยแล้งเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นทั่วโลก โดยมีสาเหตุหลักมาจากการเปลี่ยนแปลงและความแปรปรวนของสภาพภูมิอากาศ ปัญหาการขาดแคลนน้ำเพื่อการเพาะปลูกที่เกิดขึ้นในประเทศไทยมีผลกระทบโดยตรงต่อการเกษตร ทำให้พื้นดินขาดความชุ่มชื้น พืชขาดน้ำและชะงักการเจริญเติบโต ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำและมีปริมาณลดลง [1] มีรายงานว่า 45% ของพื้นที่เกษตรกรรมทั่วโลกกำลังประสบปัญหาภัยแล้งอย่างต่อเนื่อง [2] รวมถึงประเทศไทยที่เป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งจังหวัดจันทบุรีเป็นแหล่งเพาะปลูกไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทุเรียนซึ่งมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดในประเทศ ในปี พ.ศ. 2566 มีพื้นที่ปลูกรวมกว่า 4 แสนไร่ แบ่งเป็นพื้นที่ที่ให้ผลผลิตได้ประมาณกว่า 3 แสนไร่ โดยมีปริมาณผลผลิตมากกว่า 500,000 ตัน สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรในพื้นที่และประเทศชาติจำนวนหลายแสนล้านบาท ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาพื้นที่เพาะปลูกทุเรียนในจังหวัดจันทบุรีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากข้อมูลของสำนักงานเกษตรจังหวัดจันทบุรี พบว่า ในปี 2565 มีพื้นที่เพาะปลูก 413,046 ไร่ เพิ่มขึ้นจากปี 2564 ประมาณ 10% [3] อย่างไรก็ตามทุเรียนเป็นพืชที่ต้องใช้น้ำปริมาณมากในการเพาะปลูก โดยมีความต้องการน้ำต่อปีประมาณ 1,400 ลูกบาศก์เมตรต่อไร่ [4] หากได้รับน้ำในปริมาณที่ไม่เพียงพอจะทำให้หยุดชะงักการเจริญเติบโต ทุเรียนที่ขาดน้ำในช่วงผลมีอายุ 8-12 สัปดาห์ หลังดอกบานจะมีรูปทรงของผลบิดเบี้ยว การขึ้นพูไม่สมบูรณ์ ผลมีขนาดเล็ก [5] การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ปลูกทุเรียนในจังหวัดจันทบุรี ส่งผลให้ความต้องการน้ำในภาคการเกษตรเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ประกอบกับปริมาณฝนในพื้นที่ภาคตะวันออกมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ ทำให้ปัญหาการขาดแคลนน้ำในจังหวัดจันทบุรีทวีความรุนแรงมากขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อการปลูกทุเรียนในหลายด้าน ได้แก่ ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง

การเติมสายพันธุ์ไรโซแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth-promoting rhizobacteria; PGPR) ร่วมกับการปลูกพืชถือเป็นวิธีที่เหมาะสมในการพัฒนาและส่งเสริมขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อจัดการกับปัญหาขาดแคลนน้ำในภาคเกษตรกรรมที่สอดคล้องกับแนวทางการขับเคลื่อนภาคการเกษตรด้วยโมเดลเศรษฐกิจ BCG และเป้าหมายเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน (SDGs) โดย PGPR เป็นกลุ่มแบคทีเรียมีประโยชน์ต่อพืชที่สามารถส่งเสริมการทนแล้งของพืชผ่านกลไกต่าง ๆ ที่ทำให้ PGPR ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะแห้งแล้ง ได้แก่ การผลิตฮอร์โมน ออสโมไลต์ (osmolytes) เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme) รวมถึงเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ มีรายงานว่าการลงเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต EPS ช่วยบรรเทาภาวะเครียดน้ำ (water stress) ในพืชได้ [6] ดังนั้นการคัดเลือกไรโซแบคทีเรียทนแล้งที่ผลิต EPS จากดินสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่อาจนำไปใช้แก้ไขปัญหาการขาดแคลนน้ำในการปลูกไม้ผลเศรษฐกิจได้ในอนาคต โดยการเติมสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพร่วมกับการปลูกไม้ผลโดยเฉพาะอย่างยิ่งทุเรียน โดยต้องเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ การทดสอบในระดับโรงเรือนและแปลงปลูก สอดคล้องกับข้อมูลในปัจจุบันที่มีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์

สำหรับการทำเกษตรแบบยั่งยืนที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการนำแบคทีเรียทนแล้งมาใช้เป็นสารกระตุ้นทางชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืช (biostimulants) และปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizers) [7] โดยมีรายงานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับไรโซแบคทีเรียทนแล้งที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชอายุสั้นชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด และมีการประเมินศักยภาพของไรโซแบคทีเรียดังกล่าวในการชักนำความทนทานต่อความแห้งแล้งในพืช [8], [9], [10] โดยเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไรโซแบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทในการเพิ่มการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืชภายใต้สภาวะเครียดจากความแห้งแล้ง และสามารถเพิ่มสัณฐานวิทยาของราก การเจริญเติบโตของต้นกล้า รวมถึงการดูดซึมสารอาหารในข้าวสาลีได้ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการซึมผ่านของน้ำ ความเสถียรของดิน และปริมาณชีวมวลของพืช ในขณะเดียวกันก็รักษากิจกรรมการเผาผลาญและสรีรวิทยาของพืชไว้ได้ในช่วงที่มีความเครียดจากความแห้งแล้งด้วย แบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ยังสามารถบรรเทาความเครียดของพืชจากปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ และความเป็นพิษของโลหะหนักได้อีกด้วย สอดคล้องกับ Das และคณะ [11] ที่คัดเลือกแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท ที่ทนต่อสภาวะเครียดน้ำที่ระดับ -0.73 MPa ได้สูงสุด โดยสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ตั้งแต่ 3.4- 5.5 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ Latif และคณะรายงานในปี 2022 เกี่ยวกับการคัดแยกไรโซแบคทีเรียจำนวน 30 สายพันธุ์จากบริเวณไรโซสเฟียร์ของข้าวสาลี ในจำนวนนี้มี 10 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์และกรดอินโดล-3-อะซีติกที่สามารถเพิ่มการเจริญของข้าวสาลีในสภาวะขาดน้ำได้ [12]

โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียทนแล้งที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จะสามารถผลิตเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) คะตะเลส (catalase) และเปอร์รอกซิเดส (peroxidase) ทั้งนี้ Rajput และคณะ รายงานในปี 2021 ว่าเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดสถือเป็นส่วนหนึ่งของระบบการต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์ การประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของไรโซแบคทีรียทนแล้งที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นประเด็นสำคัญ เนื่องจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์คะตะเลสที่อยู่บริเวณรากพืชจะช่วยลดภาวะเครียดน้ำให้กับพืชซึ่งจะมีการปรับตัวทางสรีรวิทยาระดับเซลล์ด้วยการลดการสังเคราะห์แสง และเพิ่มการผลิตสารออกซิเจนอิสระที่เป็นอันตราย (reactive oxygen species, ROS) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลซุปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (superoxide radical) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals) ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการภายในเซลล์และมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระจะช่วยลดปริมาณ ROS จึงเป็นการบรรเทาภาวะเครียดน้ำให้แก่พืชอีกทางหนึ่งด้วย [13]

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทนแล้งและปริมาณผลผลิตของพืชในประเทศไทยมักจะมุ่งเน้นไปที่ข้าวและพืชไร่เศรษฐกิจ โดยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับไรโซแบคทีเรียผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่คัดแยกจากดินสวนผลไม้ ซึ่งการศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่นที่คัดแยกจากดินสวนในพื้นที่แห้งแล้งของจังหวัดจันทบุรีเป็นประเด็นที่น่าสนใจและเป็นความสอดคล้องทางภูมิภาคเนื่องจากจังหวัดจันทบุรีเป็นแหล่งผลิตผลไม้ที่สำคัญ การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากดินสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนน้ำในการปลูกทุเรียนและไม้ผลเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ซึ่งอาจช่วยลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มผลผลิตของพืชเศรษฐกิจในจังหวัดจันทบุรีได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินคุณสมบัติการสร้างคะตะเลส ออกซิเดส และคัดเลือกไรโซแบคทีเรียทนแล้งที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากดินสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของไรโซแบคทีเรียทนแล้งที่ใช้ในงานวิจัย

ไรโซแบคทีเรียทนแล้งจำนวน 19 ไอโซเลท ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มาจากงานวิจัยของจิรภัทร จันทมาลี และอัจฉรา เจริญรูป [14] ประกอบด้วย KaD01-2, KaD02-1, KlD01-2, KlD02-6, KhD02-1, ThD01-4, ThD02-2, NaD01-2, NaD02-1, PoD01-2, PoD02-4, MaD01-7, MaD02-7, MuD01-2, MuD02-5, SoD01-1, SoD02-3, LaD01-2 และ LaD02-2 ซึ่งถูกคัดแยกมาจากดินบริเวณรากพืชของต้นไม้ผลในพื้นที่แห้งแล้งของสวนจังหวัดจันทบุรี โดยเติมดิน 10 กรัมในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soya Broth (TSB) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร เพื่อจำลองสภาวะเครียดน้ำ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างมาเจือจางด้วยวิธี serial dilution จนถึงระดับความเจือจาง 10^{-8} และเกลี่ยลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) โดยใช้เทคนิค spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะต่างกันมาขีดลาก (streak) ลงบนอาหาร TSA ซ้ำอีกครั้ง ซึ่งคัดแยกได้เชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 85 ไอโซเลท จากนั้นทำการคัดเลือกได้ไรโซแบคทีเรียทนแล้งทั้ง 19 ไอโซเลทที่มีค่า OD_{600} > 0.2 จากความสามารถในการเจริญในสภาวะจำลองเครียดน้ำ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารอาหารเหลว TSB ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การทดสอบปฏิกิริยาคะตะเลส

ทำการทดสอบปฏิกิริยาคะตะเลส โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB บ่มที่อุณหภูมิห้อง ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ลงบนเชื้อ 1 หยด ผสมให้เข้ากัน สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน 5-10 วินาที ผลบวกมีฟองแก๊สเกิดขึ้น ผลลบไม่มีฟอง [15]

การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส

ทำการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทดสอบที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิห้อง ลงบนแผ่นกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย Kovac's oxidase reagent ซึ่งเตรียมใหม่ สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน 1 วินาที โดยผลบวกมีสีม่วงเข้ม ผลลบไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง [16]

การทดสอบการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

ทำการทดลองตามวิธีที่รายงานโดย Obuekwe และ Al-Muttawa [17] เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลท โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปรับความขุ่นให้มีค่า final OD_{600} = 4.0 จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ลงในหลอดแก้วบรรจุอาหาร Mineral salt medium (MS) (สูตรกรัม/ลิตร: K_2HPO_4 0.5, Na_2SO_4 2, NH_4Cl 1, $CaCl_2$ •$2H_2O$ 0.093, $MgSO_4$ •$7H_2O$ 0.02) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร เพื่อสร้างสภาวะจำลองเครียดน้ำ และทรายทะเล 2 กรัม ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำต่อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ทดสอบประสิทธิภาพการสร้าง EPS โดยการเติมสีย้อมเมธิลีนบลู ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดสอบ ผสมให้เข้ากัน ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การสร้าง EPS จากสูตร $[(OD_{\text{ชุดควบคุม}} - OD_{\text{ชุดทดลอง}}) / OD_{\text{ชุดควบคุม}}] \times 100$

การเจริญของไรโซแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกในอาหารที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้นต่างกัน

นำไรโซแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก มาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้นต่างกัน (0, 15, 30 และ 40% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร) เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน โดยมีชุดควบคุมที่ไม่เติม PEG 6000 สำหรับใช้เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในสภาวะปกติ วิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย โดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค pour plate ทุกชุดทดลองทำ 3 ซ้ำ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไรโซแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก

นำไรโซแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยดูลักษณะการติดสีแกรม รูปร่าง ขนาดและการเรียงตัวของเซลล์

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 19 ไอโซเลทและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลทที่คัดเลือก โดยวิธี One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลองด้วยวิธีของ Tukey's HSD Multiple Comparison test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 26.0 (Armonk, NY: IBM Corp; 2019)

ผลการวิจัย

การทดสอบปฏิกิริยาคะตะเลสและออกซิเดส

จากการทดสอบปฏิกิริยาคะตะเลสและออกซิเดสของไรโซแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทให้ผลบวกในการทดสอบ โดยมีจำนวน 8 ไอโซเลทที่เกิดปฏิกิริยารวดเร็ว (+++) ได้แก่ KhD01-2, ThD01-4, NaD01-2, LaD02-2, MaD02-7, MuD01-2, MuD02-5 และ LaD01-2 ผลการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส พบว่ามี 8 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวก ได้แก่ KlD01-2, KhD01-2, ThD02-2, NaD02-1, LaD02-2, PoD01-2, MaD01-7 และ MaD02-7 ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1: ผลการทดสอบปฏิกิริยาคะตะเลสและออกซิเดสของไรโซแบคทีเรีย

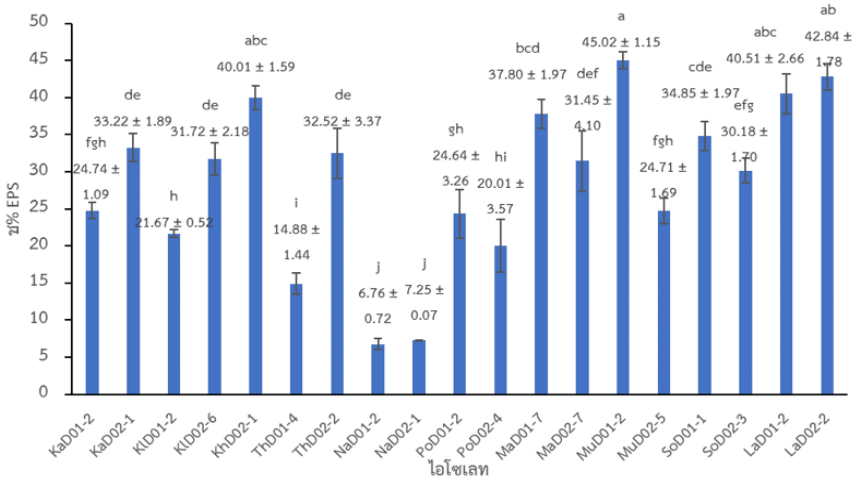
ไอโซเลท	ผลการทดสอบ		ไอโซเลท	ผลการทดสอบ	
	คะตะเลส*	ออกซิเดส**		คะตะเลส*	ออกซิเดส**
KaD01-2	++	-	PoD01-2	+	+
KaD02-1	+	-	PoD02-4	++	-
KlD01-2	++	+	MaD01-7	++	+
KlD02-6	+	-	MaD02-7	+++	+
KhD01-2	+++	+	MuD01-2	+++	-
ThD01-4	+++	-	MuD02-5	+++	-
ThD02-2	++	+	SoD01-1	++	-
NaD01-2	+++	-	SoD02-3	++	-
NaD02-1	++	+	LaD01-2	+++	-
LaD02-2	+++	+			

หมายเหตุ * ปฏิกิริยาคะตะเลส : (+++) เกิดฟองแก๊สเร็วมาก, (++) เกิดฟองแก๊สเร็ว, (+) เกิดฟองแก๊สช้า, (-) ไม่เกิดฟองแก๊ส

** ปฏิกิริยาออกซิเดส : (+) เกิดปฏิกิริยา, (-) ไม่เกิดปฏิกิริยา

การทดสอบการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของไรโซแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลท จากการทดสอบไอโซเลทละ 3 ซ้ำ พบว่าไรโซแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยไอโซเลท MuD01-2 สามารถผลิต EPS ได้สูงที่สุด (45.02 ± 1.15%) ไอโซเลท NaD01-2 ผลิต EPS ได้ต่ำที่สุด (6.766 ± 0.72 %) ดังแสดงในภาพที่ 1 ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียไอโซเลท MuD01-2 สำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป

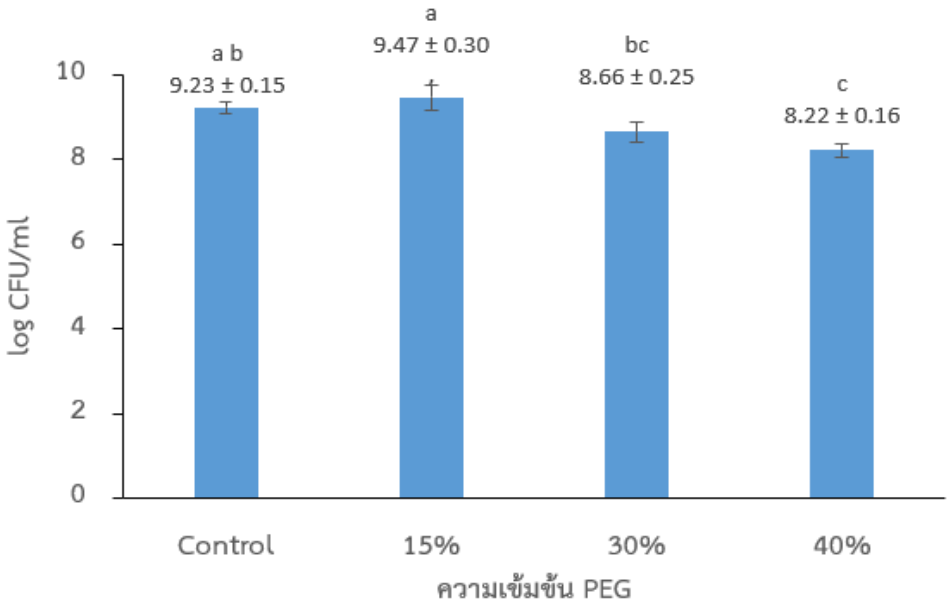


ภาพที่ 1: เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของไรโซแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ในสภาวะจำลองเครียดน้ำที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร บ่มที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ข้อมูลที่แสดงอยู่ในรูป mean ± S.D.

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Tukey-HSD

การเจริญของไรโซแบคทีเรียไอโซเลท MuD01-2 ในอาหารที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้นต่างกัน

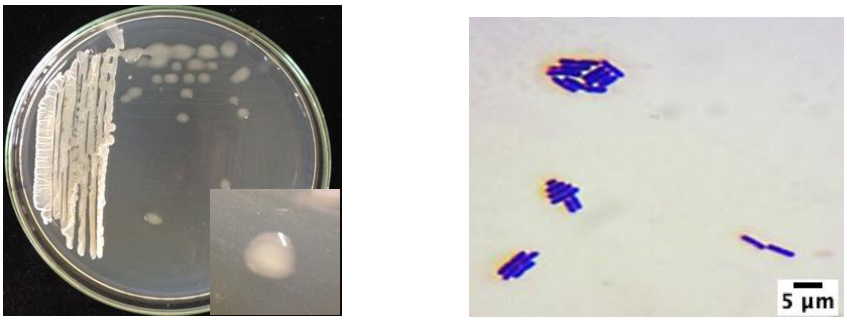
ผลทดสอบการเจริญของไอโซเลท MuD01-2 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง EPS ได้สูงสุด ในสภาวะจำลองเครียดน้ำแตกต่างกัน พบว่าการเจริญของเชื้อในสภาวะที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร มีปริมาณเซลล์ 9.47 ± 0.30 log CFU/ml ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุมที่ไม่เติม PEG 6000 (9.23 ± 0.15 log CFU/ml)) ในทางตรงกันข้ามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PEG 6000 พบว่าเชื้อ MuD01-2 มีการเจริญลดลง โดยมีปริมาณเซลล์ 8.66 ± 0.25 log CFU/ml และ 8.22 ± 0.16 log CFU/ml ในสภาวะที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 30% และ 40% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับค่าการเจริญของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร และชุดควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2: ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท MuD01-2 ในอาหารเหลว TSB ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 6 วัน บ่มเชื้ออุณหภูมิห้อง ข้อมูลที่แสดงอยู่ในรูป mean ± S.D.
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Tukey-HSD

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท MuD01-2

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท MuD01-2 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้าง EPS ได้สูงสุด โดยการเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีของเชื้อมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม (mucoid) รูปร่างกลม (circular) ผิวหน้าเรียบ (smooth) ขอบเรียบ (entire) โคโลนียกตัวแบบเจริญสูงขึ้นเล็กน้อยจากผิวหน้าอาหาร (raised) จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน (bacilli) ดังแสดงในภาพที่ 3



(ก) (ข)

ภาพที่ 3: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง TSA อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) และเซลล์ของไอโซเลท MuD01-2 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า จากการย้อมสีแกรม (ข)

อภิปรายผลการวิจัย

จากการประเมินคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของไรโซแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากดินรอบรากพืชในพื้นที่แห้งแล้งของสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี พบว่าทั้ง 19 ไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ในจำนวนนี้มี 8 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบออกซิเดส สอดคล้องกับ Hussain และคณะ [18] ซึ่งพบว่าโรโซแบคทีเรียทั้ง 35 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากพืชตระกูลถั่วสามารถสร้างคะตะเลสได้และมีลักษณะโคโลนีเป็นเมือกเยิ้มซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเชื้อที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่ง Ashry และคณะ, 2022 [7] สรุปว่าไรโซแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการสร้างคะตะเลสและออกซิเดสจะช่วยบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันให้กับพืชที่ขาดน้ำ มีผลเพิ่มการเจริญและการอยู่รอดของพืชในภาวะแห้งแล้ง เนื่องจากในภาวะขาดน้ำพืชมักเกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เนื่องจากปริมาณ ROS ที่ถูกสร้างมากขึ้น จึงเกิดความไม่สมดุลกับระบบต้านอนุมูลอิสระของพืช ทำให้ ROS ไปทำลายเซลล์โดยการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ เอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากไรโซแบคทีเรียจะไปย่อยสลาย H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน จึงเป็นการลดปริมาณ ROS ในเซลล์พืช โดยออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการขนส่งอิเล็กตรอนจากสารตั้งต้นไปยังโมเลกุลออกซิเจน และมีส่วนเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมและการกำจัดสารที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์

ผลทดสอบการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของไรโซแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในสภาวะจำลองเครียดน้ำด้วยการเติม PEG 6000 ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร หรือมีค่าศักย์ออสโมซิส (osmotic potential) -0.70 MPa พบว่าทั้ง 19 ไอโซเลทสามารถผลิตโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในช่วง 6-45% จากการทดสอบด้วยวิธี Modified-alcian blue สอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าแบคทีเรียทนแล้งที่อยู่ในภาวะเครียดน้ำสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ [18] ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญต่อการทนแล้งของไรโซแบคทีเรีย โดยเชื้อที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์มีการสร้างไบโอฟิล์มกับรากพืช ทำให้ป้องกันเซลล์จากภาวะแห้งแล้งและทำให้ได้รับสารอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ ในขณะเดียวกันพืชได้รับประโยชน์ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะขาดน้ำเนื่องจากไบโอฟิล์มช่วยเพิ่มการเก็บกักน้ำบริเวณรอบรากและดิน ช่วยในการเก็บรักษาความชื้นในรากและดินรอบ สามารถช่วยเพิ่มปริมาณน้ำให้กับพืชและลดการสูญเสียน้ำผ่านการระเหย [19] แบคทีเรียที่สร้าง EPS บางสายพันธุ์ถูกพบว่ามีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถกำจัด ROS และปกป้องเซลล์พืชจากความเครียดทางออกซิเดชัน และส่งผลต่อการควบคุมฮอร์โมนและส่งสัญญาณเครียดของพืช กิจกรรมของแบคทีเรียเหล่านี้ในโซนรากพืชสามารถเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำและรักษาการผลิตของพืชได้ [6] ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้พบว่าไอโซเลท MuD01-2 สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด (45.02 ± 1.15%) และมีการสร้างคะตะเลสปริมาณมาก โดยสามารถทนแล้งได้สูงจากการทดสอบพบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงถึง 8.22 ± 0.16 log CFU/ml ในภาวะเครียดน้ำที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น

40% โดยน้ำหนัก/ปริมาตร (-2.49 MPa) โดยเชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ที่มีลักษณะโคโลนีเป็นเมือกเยิ้มจากการสร้างพอลิเมอร์ชีวภาพและหลั่งออกนอกเซลล์ สอดคล้องกับรายงานของ Bogati and Walczak ในปี 2022 [20] ที่ว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นหนาของเพปติโดไกลแคน จึงทำให้ทนต่อภาวะแห้งแล้งได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้ในภาวะขาดน้ำจะพบกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกบริเวณรอบรากพืชได้สูงกว่า โดยเฉพาะจีนัสบาซิลลัสที่สร้างเอนโดสปอร์ สอดคล้องกับรายงานของ จิรภัทร และ อัจฉรา [14] ที่พบว่าไรโซแบคทีเรียทนแล้งจำนวน 19 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากพื้นที่แห้งแล้งของดินสวนผลไม้ ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 12 ไอโซเลท แบคทีเรียแกรมลบ 9 ไอโซเลท นอกจากนี้ Ashry et al., 2022 [7] รายงานว่ามีแบคทีเรียทนแล้ง 2 ไอโซเลท จาก 20 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากพื้นที่แห้งแล้ง ได้แก่ *Bacillus cereus* DS4 และ *Bacillus albus* DS9ที่ สามารถผลิต EPS ได้ปริมาณสูง ในสภาวะจำลองเครียดน้ำที่เติม PEG (-1.2 MPa) โดยเชื้อ DS4 สามารถผลิตEPS ได้ 3.4 มิลลิกรัม/ลิตร) ซึ่งเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถสร้างคะตะเลสได้และมีสมบัติอื่น ๆ ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช [7] นอกจากนี้ Ilyas et al., 2022 [6] รายงานการคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงจำนวน 2 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 24 สายพันธุ์ ที่ช่วยบรรเทาภาวะเครียดน้ำให้กับข้าวสาลี ซึ่งเชื้อที่คัดเลือกจากงานวิจัยเหล่านี้สามารถสร้างคะตะเลสได้และมีสมบัติอื่น ๆ ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช

สรุปผล

งานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกได้ไรโซแบคทีเรียทนแล้งไอโซเลท MuD01-2 ที่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณสูงที่สุดจากทั้งหมด 19 ไอโซเลท จากพื้นที่แห้งแล้งในสวนผลไม้จังหวัดจันทบุรี โดยสามารถสร้างคะตะเลสและทนแล้งได้สูงจากการทดสอบในภาวะจำลองเครียดน้ำ ประกอบกับข้อดีที่พบว่าเชื้อนี้จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกจึงง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานในพื้นที่เกษตรกรรม โดยแบคทีเรียมีการสร้างเอนโดสปอร์จึงสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมในพื้นที่เกษตรกรรมและเพิ่มความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อประจำถิ่นได้ดี จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติอื่น ๆ ที่ช่วยยืนยันสมบัติในการทนแล้งของไอโซเลทดังกล่าว ได้แก่ การสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติก และเอนไซม์เอซีซี ดีอะมิเนส (ACC deaminase) รวมถึงคุณสมบัติอื่น ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เพื่อช่วยในการประเมินศักยภาพของเชื้อ MuD01-2 ในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์การเกษตรสำหรับใช้ในพื้นที่สวนผลไม้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนสารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อและวัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัยจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

1 ฉรี สิงโต. ภัยแล้งทางการเกษตรของไทย [Internet]. 2566 [เผยแพร่ 2564; 16 กรกฎาคม 2566]. แหล่งข้อมูล: https://webapp.ldd.go.th/lpd/node_modules/Article_Lpd.

2 Admassie M, Woldehawariat Y, Alemu T, Gonzalez E, Jimenez JF. The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating drought stress on pepper plants. Agric. Water Manag. 2022; 272: 107831. doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107831.

3 ผู้จัดการออนไลน์. จันทบุรีฉลองยอดส่งออกทุเรียนทะลุ 500,000 ตัน สร้างรายได้เข้าไทยหลายแสนล้านบาท [Internet]. 2566 [เผยแพร่ 18 มิถุนายน 2566; 14 กรกฎาคม 2566]. แหล่งข้อมูล: https://mgronline.com/local/detail/9660000055415.

4 กรมส่งเสริมการเกษตร. เทคนิคการปลูกและดูแลรักษาทุเรียน [Internet]. 2566 [10 ตุลาคม 2566]. แหล่งข้อมูล: https://esc.doae.go.th/wp-content/uploads/2021/06/Durian.pdf.

5 ทวีศักดิ์ แสงอุดม และ ลาวัณย์ จันทร์อัมพร. การจัดการน้ำอย่างมีประสิทธิภาพสำหรับไม้ผล [Internet]. 2566[เผยแพร่ 2564; 14 กรกฎาคม 2566]. แหล่งข้อมูล: http://www.doa.go.th/hort/wp-content/uploads/2021/.

6 Ilyas N, Mumtaz K, Akhtar N, Yasmin H, Sayyed RZ, Khan W, et al. Exopolysaccharides producing bacteria for the amelioration of drought stress in wheat. Sustainability. 2020; 12(21): 8876. doi.org/10.3390/su12218876.

7 Ashry NM, Alaidaroos BA, Mohamed SA, Bodr OAM, El-Saadony MT, Esmael A. Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Saudi J. Biol. Sci. 2022; 29(3): 1760–69.

8 Naseem H, Ahsan M. Shahid M, Khan N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. J Basic Microbiol. 2018; 58(12): 1009-22.

9 Bhagat N, Raghav M, Dubey S, Bedi N. Bacterial exopolysaccharides: insight into their role in plant abiotic stress tolerance. J. Microbiol. Biotechnol. 2021; 31(8): 1045-59.

10 Morcillo RJL, Manzanera M. The effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. Metabolites. 2021; 11, 337. doi.org/10.3390/metabo11060337.

11 Das M, Nayak SK, Bhattacharyya P. Screening and optimization of exopolysaccharide producing bacteria from rhizospheric region of direct seeded rice. Int. J. Chem. Stud. 2020; 8(1): 292-7.

12 Latif M, Bukhari SAZ, Alotaibi FE, Ahmad M, Shahzad AN, Dewidar AZ, et al. Inducing drought tolerance in wheat through exopolysaccharide-producing rhizobacteria. Agronomy. 2022; 12(5): 1140. doi.org/10.3390/agronomy12051140.

13 Rajput VD, Harish, Singh RK, Verma KK, Sharma L, Quiroz-Figueroa FR, et al. Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. Biology.2021; 10(4): 267. doi: 10.3390/biology10040267.

14 จิรภัทร จันทมาลี และอัจฉรา เจริญรูป. ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในดินสวนผลไม้ จังหวัดจันทบุรี. 2559. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2558; สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา.

15 Anjali M. Isolation of catalase producing bacteria from soil. IJMCER. 2022; 11: 48-53.

16 Al-Dhabaan FA. Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. Saudi J Biol Sci. 2018; 26(6): 1247-52.

17 Obuekwe CO, Al-Muttawa M. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. Biotechnol. Lett. 2011; 23: 1025–32.

18 Hussain MB, Zahir ZA, Asghar HN, Asgher M. Can catalase and exopolysaccharide producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat?. Int J Agric Biol. 2014; 16: 3-13.

19 Zheng W, Zeng S, Bais H, LaManna JM, Hussey DS, Jacobson DL, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) reduce evaporation and increase soil water retention. Water Resour. Res. 2018; 54(5): 3673-87.

20 Bogati K, Walczak M. The impact of drought stress on soil microbial community, enzyme activities and plants. Agronomy. 2022; 12(1): 189. doi.org/10.3390/agronomy12010189.