

**คุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่คัดแยก
จากกากตะกอนในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ**
**PLANT GROWTH PROMOTING PROPERTIES OF BACTERIAL ISOLATES
FROM SLUDGE OF BIOGAS PRODUCTION PROCESS**

วราภรณ์ สุทธิสา*, กนกวรรณ กรมแสง และ สุพัตรา ชูริกิจ
Waraporn Sutthisa*, Kanokwan Kromsang and Supatra Thurakit

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University

Received: 21 April 2021

Accepted: 28 Novemberh 2021

บทคัดย่อ

งานศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกหาเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอนก๊าซชีวภาพ และทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 77 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 56 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมลบ 21 ไอโซเลต การทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ประกอบด้วย การทดสอบการตรึงไนโตรเจน การสร้างสารไซโตไคน์ การละลายฟอสเฟต และการสร้างกรดอินโดล-3-แอซีติก จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการตรึงไนโตรเจน บนอาหาร nitrogen free solid malate Medium (NFM) มีแบคทีเรียทั้งหมด 52 ไอโซเลต ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เจริญบนอาหาร NFM ได้และสามารถเปลี่ยนสี bromothymol blue 27 ไอโซเลต และกลุ่มที่เจริญบนอาหาร NFM ได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนสี bromothymol blue 25 ไอโซเลต การทดสอบการสร้างสารประกอบไซโตไคน์ บนอาหาร Chrom Azurol S (CAS) พบแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารประกอบไซโตไคน์ได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต การทดสอบความสามารถละลายฟอสเฟต บนอาหาร GYA double-layered agar medium พบว่ามี 24 ไอโซเลต ที่เจริญและสร้าง

* ผู้ประสานงาน: วราภรณ์ สุทธิสา
อีเมล: waraporn.s@msu.ac.th

บริเวณใสสีน้ำเงินรอบๆ โคโลนีได้ และการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก พบว่ามี 67 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้

คำสำคัญ: แบคทีเรีย, คุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, กากตะกอน

Abstract

The objective of this research was to isolate bacteria from biogas sludge and investigate the plant growth promoting qualifications. The sample were 77 bacterium's isolates, consisting of 56 isolates of gram-positive and 21 isolates of gram-negative. The qualifications testing of plant growth-promoting consisted of nitrogen fixation, siderophore production, phosphate solubilization, and indole-3-acetic acid production. The research results show that 52 isolates could be able to fix nitrogen on nitrogen-free solid malate medium (NFM) and were divided into 2 groups. The first group included 27 isolates which grown on NFM and changed the color of bromothymol blue. The second group contained 25 isolates which could be able to grow on NFM but not be able to change the color of bromothymol blue. On Chrom Azurol S (CAS) medium, bacteria were found in capable of forming a total of 70 isolates of siderophores. Phosphate solubility tests on GYA double-layered agar medium revealed that 24 isolates were able to grow and form clear blue regions around colonies, and the capability in producing Indole-3-acetic acid test found that there were 67 isolates were capable in producing Indole-3-acetic acid.

Keywords: Bacteria, Plant growth promoting properties, Sludge

บทนำ

ตะกอน (sludge) จากกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ เป็นกากตะกอนอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ (biogas) ซึ่งเป็นพลังงานสะอาดที่เกิดจากการนำของเสีย เช่น มูลสัตว์ น้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ หรือจากโรงงานอุตสาหกรรม ขยะ และของเหลือใช้ทางการเกษตร มาผ่านกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic digestion) โดยแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (anaerobic bacteria) ก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแก๊สมีเทน (CH_4) ประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นแก๊สชนิดอื่น ๆ เช่น ไฮโดรเจน (H_2) ออกซิเจน (O_2) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ไนโตรเจน (N) และไอน้ำ (ณิชา บุรณสิงห์, 2563) ซึ่งก๊าซชีวภาพจะถูกนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงให้ความร้อนของหม้อต้มไอน้ำทดแทนเชื้อเพลิงปิโตรเลียม เช่น น้ำมันเตาแก๊ส หุงต้มในครัวเรือน และใช้ผลิตกระแสไฟฟ้าสำหรับกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม และหลังจากกระบวนการหมักเสร็จสิ้น ทำให้เกิดกากตะกอนที่ได้จากกระบวนการหมักในการผลิตก๊าซชีวภาพ โดยกากตะกอนมีลักษณะเป็นกากผงหรือเศษเล็ก ๆ สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยทางการเกษตรได้ เนื่องจากกากตะกอนที่ผ่านกระบวนการนี้เป็นสารอินทรีย์ที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นที่พืชต้องการ (ศูนย์บริการข้อมูลโครงการศึกษาวิจัยต้นแบบวิสาหกิจชุมชนพลังงานสีเขียวจากพืชพลังงาน, 2556) Hendroko et al. (2012) ศึกษาชนิดและจำนวนแบคทีเรียในบ่อหมักก๊าซชีวภาพโดยใช้วัตถุติดเป็นของเสียจากน้ำมันสุญต์ดาเปรียบเทียบกับมูลโค สามารถแยกแบคทีเรียแกรมลบได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลต จัดอยู่ใน 3 แฟมิลี ได้แก่ Halobacteriaceae, Azotobacteraceae และ Pseudomonadaceae โดยบ่อหมักของเสียจากน้ำมันสุญต์ดาพบประชากรของ Pseudomonadaceae สูงสุด ในขณะที่บ่อหมักที่มีมูลโคเป็นวัตถุดิบพบ Azotobacteraceae สูงสุด ในกากตะกอนจากก๊าซชีวภาพอาจพบจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting bacteria, PGPB) (ศูนย์บริการข้อมูลโครงการศึกษาวิจัยต้นแบบวิสาหกิจชุมชนพลังงานสีเขียวจากพืชพลังงาน, 2556) โดยเชื้อจุลินทรีย์มีรูปแบบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายแบบ บางชนิดช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อม ด้วยการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ทำอันตรายกับพืช แต่บางชนิดก็สร้างสารประกอบออกมาส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง ได้แก่ การสร้างสารประกอบไฮเดรโอฟอร์ (siderophore)

การสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid; IAA) นอกจากนั้นยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (nitrogen fixing bacteria, NFB) และความสามารถละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizing bacteria, PSB) เป็นต้น (วรารักษ์ สุทธิสา และ บุชยา วาปี, 2562; Bharucha et al., 2013) Gupta et al. (2014) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณรากพืชและทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ประกอบด้วย การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต การผลิตกรดอินโดลอะซิติก สามารถแยกแบคทีเรียจากบริเวณรอบรากต้น *Chlorophytum borivilianum* ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต มีเพียง 10 ไอโซเลต ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ โดยสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ละลายฟอสเฟต และผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ นอกจากนั้น Kesaulya et al. (2015) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณรากมันฝรั่ง จำนวน 70 ไอโซเลต พบว่ามี 36 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติก (IAA) ผลิตไซโตโรพอร์ และสามารถละลายฟอสเฟตได้ โดยพบว่าไอโซเลต HB8 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดถึง 5.816 มิลลิกรัมต่อลิตร ไอโซเลต HB18 สร้างสารไซโตโรพอร์ได้สูงสุด 4.214 มิลลิกรัมต่อลิตร และไอโซเลต HB3 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงสุดเท่ากับ 14.237 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าทั้ง 36 ไอโซเลต มีศักยภาพในการเป็นปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) และสามารถป้องกันพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคในดินได้ Zhang et al. (2017) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลต จากก้อนเห็ดเหลือทิ้ง ซึ่งประกอบด้วยเปลือกเมล็ดฝ้าย ชั่งข้าวโพด กากก๊าซชีวภาพ และขี้เลื่อย และทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่ามี 8 ไอโซเลต ที่สามารถผลิต IAA (61.5 เปอร์เซ็นต์) และอีก 6 ไอโซเลต สามารถสร้างสารไซโตโรพอร์ (46.2 เปอร์เซ็นต์) และมี 3 ไอโซเลต ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดคือ M01, M04 และ M11 ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลต ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของรากและยอดมะเขือเทศสูงขึ้นด้วย จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าก้อนเห็ดเหลือทิ้งที่มีกากก๊าซชีวภาพเป็นองค์ประกอบมีศักยภาพเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ งานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเบื้องต้นจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกากตะกอนก๊าซชีวภาพ เพื่อนำไปพัฒนาการใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอนก๊าซชีวภาพ

นำตัวอย่างกากตะกอนจากระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจากมูลสุกร ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ที่ได้รับจากองค์การบริหารส่วนตำบลคำแคน อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น มาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการศึกษาและบันทึกข้อมูลลักษณะทางกายภาพของกากตะกอน จากนั้นทำการแบ่งตัวอย่างกากตะกอนมาตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม แล้วแบ่งออกเป็น 3 กอง สุ่มเก็บตัวอย่างจากแต่ละกองรวม 10 กรัมต่อตัวอย่าง นำแต่ละตัวอย่างใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ จากนั้นจุดตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร nutrient agar (NA) ค่าการเจือจางละ 3 ซ้ำ ทำการเกลี่ยให้ทั่วแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ และทำการแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อใน 10 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล จนกว่าจะนำไปทดสอบต่อไป

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมาถ่ายลงบนจานอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนี ประกอบด้วย ขนาด สี ผิวหน้า ขอบ ความนูน และทดสอบการติดสีแกรม (Gram stain) รูปร่างของเซลล์ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3. การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

3.1 การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen fixing bacteria, NFB)

การทดสอบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยการนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมาเลี้ยงบนอาหาร nitrogen free solid malate media (NFM) ประกอบด้วย Malic acid 5 กรัม K_2HPO_4 0.6 กรัม KH_2PO_4 1.8 กรัม $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.2 กรัม NaCl 0.1 กรัม $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 กรัม Bromothymol blue (BTB) 2 มิลลิลิตร vitamins 0.5 มิลลิลิตร microelements 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1 ลิตร (Vishan et al., 2017) โดยการขีดเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานอาหาร NFM

ห่างจากขอบประมาณ 1.5 เซนติเมตร และขีดเชื้อให้มีความยาว 2 เซนติเมตร โดยขีด 4 ไอโซเลตต่อจาน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรีย NFB ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้จะเปลี่ยนสีอาหารที่มี bromothymol blue ให้เป็นสีน้ำเงิน โดยให้ระดับผลเป็น – คือไม่เจริญหรือไม่เปลี่ยนสีอาหาร, + คือเจริญน้อยหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีน้อย, ++ คือเจริญปานกลางหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีปานกลาง และ +++ คือเจริญมากหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อไอโซเลต (Sutthisa & Khamjandee, 2019)

3.2 การทดสอบการสร้างสารประกอบไซเดอโรฟอร์ (Siderophore)

นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง มาขีดลงบนอาหาร Chrome Azurol S (CAS) agar ให้ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร โดยขีด 6 ไอโซเลตต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจผลโดยแบคทีเรียที่สร้างสารประกอบไซเดอโรฟอร์จะพบโซนใสสีแดงส้ม-เหลือง ที่บริเวณรอบๆ รอยขีด และให้ระดับผลการเจริญเป็น – คือไม่เจริญ, + คือเจริญน้อย, ++ คือเจริญปานกลาง และ +++ คือเจริญมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อไอโซเลต (Sutthisa & Khamjandee, 2019)

3.3 การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria, PSB)

การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต โดยการแตะเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง แทะ (stab) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYA double-layered agar medium ที่เติม tricalcium phosphate เป็นแหล่งอินทรีย์ฟอสเฟต โดยแตะเชื้อ 4 ไอโซเลตต่อจาน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรีย PSB โดยสังเกตการสร้างวงใสสีฟ้ารอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และให้ระดับผลการเจริญเป็น – คือไม่เจริญ, + คือเจริญน้อย, ++ คือเจริญปานกลาง และ +++ คือเจริญมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ทำการทดลองไอโซเลตละ 3 ซ้ำ

3.4 การทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid, IAA)

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดลอะซิดิก (Ahmad et al., 2005) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร nutrient broth (NB) ที่เติม

ทริปโตแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร หยดกรดออร์โธฟอสฟอริก 2 หยด เติม Salkowski reagent 4 มิลลิลิตร ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสีว่าเกิดสีชมพูหรือไม่ หากเกิดสีชมพูหมายความว่ามีการสร้างกรดอินโดลอะซีติก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อไอโซเลต จากนั้นนำไอโซเลตที่ให้ผลบวกไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย Peptone 10 กรัมต่อลิตร L-tryptophan 1 กรัมต่อลิตร NaCl 5 กรัมต่อลิตร yeast extract 6 กรัมต่อลิตร และปรับ pH เป็น 7.6 ด้วย KOH วัดการสร้าง IAA ตาม Salkowski Colorimetric Technique (Glickmann & Dessaux, 1995) โดยปั่นเซลล์แล้วนำส่วนใสปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร เติมกรดออร์โธฟอสฟอริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Salkowski's Reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer คำนวณปริมาณ IAA ที่แบคทีเรียสร้างเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดอินโดล-3-แอซีติก (Hendroko et al., 2012)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอนก๊าซชีวภาพ

การสังเกตลักษณะกากตะกอนก๊าซชีวภาพ พบว่ากากตะกอนก๊าซชีวภาพจากมูลสุกร ตัวอย่างที่ 1 มีลักษณะร่วนแห้ง ค่อนข้างละเอียดเหมือนดิน มีสีน้ำตาลดำ ไม่มีกลิ่น ตัวอย่างที่ 2 มีลักษณะร่วนแห้ง มีสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่น และตัวอย่างที่ 3 มีลักษณะค่อนข้างหยาบ จับกันเป็นก้อนเล็กๆ มีสีน้ำตาล ไม่มีกลิ่น การแยกเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอนก๊าซชีวภาพ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จากตัวอย่างที่ 1 ได้ 2.7×10^5 colony forming unit (cfu) ต่อกากตะกอนปุ๋ย 1 กรัม ตัวอย่างที่ 2 ได้ 3.8×10^6 cfu ต่อกากตะกอนปุ๋ย 1 กรัม และตัวอย่างที่ 3 ได้ 1.45×10^7 cfu ต่อกากตะกอนปุ๋ย 1 กรัม จากนั้นจึงคัดเลือกเก็บโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำการทดสอบต่อทั้งสิ้น 77 ไอโซเลต จากกระบวนการหมักปุ๋ยพบว่าแบคทีเรียจะมีมากที่สุดในช่วงอุณหภูมิกลางๆ (mesophilic phase) แต่จะลดลงในช่วงอุณหภูมิสูง (thermophilic phase) และลดลงต่อไปในขั้นตอนการระบายความร้อนและเมื่อหมักปุ๋ยเสร็จสิ้น โดยจะมีประชากรแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 10^5 ถึง 10^9 cfu ต่อปุ๋ย 1 กรัม (Chandna et al., 2013)

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

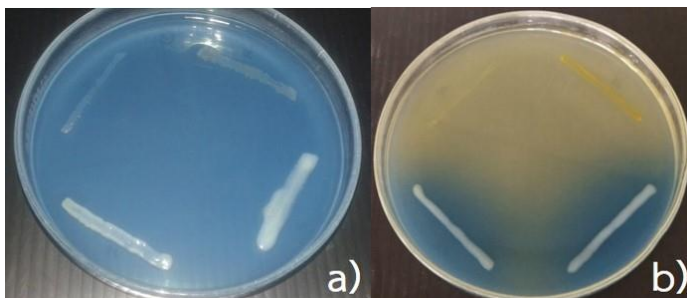
การศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 77 ไอโซเลต พบว่าโคลินีสีขาว สีครีม สีเหลือง และสีส้ม ขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน เมื่อนำไปทดสอบการติดสีแกรมพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 56 ไอโซเลต แบ่งออกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน และสร้างเอนโดสปอร์ 36 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อนและไม่สร้างเอนโดสปอร์ 12 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม 8 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 21 ไอโซเลต แบ่งออกเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนจำนวน 13 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลมจำนวน 8 ไอโซเลต สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vishan et al. (2017) ซึ่งทำการแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียจากถังหมักปุ๋ยแบบถังหมุน ซึ่งสามารถแยก แบคทีเรียได้ 12 ไอโซเลต การระบุชนิดโดยการหาลำดับยีน 16S rDNA พบว่าส่วนใหญ่เป็น *Bacillus* และ *Enterobacter*

3. การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

3.1 การทดสอบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen fixing bacteria, NFB)

จากการทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนบนอาหาร NFM พบว่ามี แบคทีเรียทั้งหมด 52 ไอโซเลต ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เนื่องจากสามารถเจริญ บนอาหาร NFM ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ เจริญบนอาหาร NFM ได้แต่ไม่เปลี่ยนสี bromothymol blue จำนวน 27 ไอโซเลต และ กลุ่มที่เจริญบนอาหาร NFM และสามารถเปลี่ยนสี bromothymol blue ให้เป็นสีน้ำเงินได้ 25 ไอโซเลต (รูปที่ 1, ตารางที่ 1) ส่วนอีก 25 ไอโซเลต ไม่สามารถเจริญบนอาหาร NFM ได้ ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารได้นั้นเนื่องจากสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากชั้น บรรยากาศและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียม (NH_4^+) ไนเตรต (NO_2^-) และ ไนไตรท์ (NO_3^-) (Kanimozhi & Panneerselvam, 2010) สารเหล่านี้มีความ เป็นเบสเมื่อมีปริมาณมากพอจึงเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์คือ bromothymol blue เป็นสีน้ำเงินได้ Hafeez et al. (2006) ศึกษาการปลูกเชื้อแบคทีเรีย 17 ไอโซเลต ให้กับข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าว ซึ่งเชื้อทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบเจริญเร็ว และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ กว้าง สามารถผลิต IAA ได้ระหว่าง 0.8–42.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถตรึงไนโตรเจน ได้ระหว่าง 20.3–556.8 nmole C_2H_2 reduced/h/vial นอกจากนั้นยังพบว่าไอโซเลต 8N-4

สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด (42.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเป็นไอโซเลตเดียวที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ (188.7 $\mu\text{gP/ml}$)

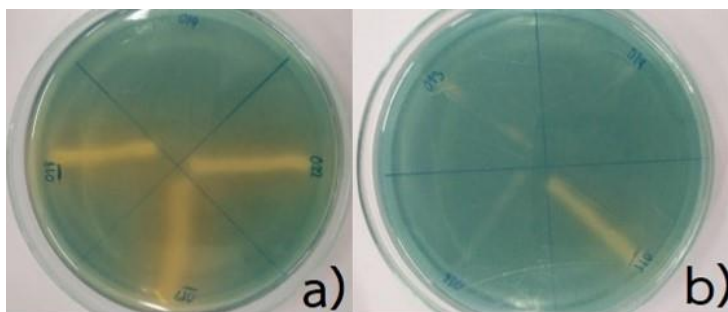


รูปที่ 1 การทดสอบการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร nitrogen free solid malate medium (NFM) a) ผลบวก (เจริญและเปลี่ยนเป็นสีฟ้า), b) ผลบวก (เจริญแต่ไม่เปลี่ยนสีอาหาร และเจริญและเปลี่ยนเป็นสีฟ้า)

3.2 การทดสอบการสร้างสารประกอบไซเดอโรฟอร์ (Siderophore)

จากการทดสอบการสร้างสารประกอบไซเดอโรฟอร์บนอาหาร CAS Agar มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไซเดอโรฟอร์ ทั้งหมด 63 ไอโซเลต ซึ่งพบวาร์อบๆ โคลนีนีมีโซนไฮสเลื่อง (รูปที่ 2, ตารางที่ 1) เนื่องจากไซเดอโรฟอร์เป็นสารที่สร้างขึ้นเมื่อในสถานะของธาตุเหล็กต่ำซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตขึ้นบนจาน CAS Agar จะมีการเปลี่ยนสีของ Chrom Azurol จากสีฟ้าเป็นสีแดงส้ม-เหลือง (Bakthavatchalu & Shivakumar, 2016) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sutthisa & Khamjandee (2019) ได้ทำการทดสอบการสร้างสารประกอบไซเดอโรฟอร์บนอาหาร CAS agar ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นกระดุมทองเลื้อยทั้งหมด 47 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรีย 21 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้ โดยพบวาร์อบๆ โคลนีนีมีโซนไฮสเลื่อง ส้มหรือสีน้ำตาล และ Pahari & Mishra (2017) ศึกษาการแยกแบคทีเรียที่ผลิตไซเดอโรฟอร์ทั้งหมด 4 ไอโซเลต จากดินบริเวณรอบรากพืช พบว่า BGBA-1 สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้สูงสุด โดยแต่ละไอโซเลตมีกิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน เช่น การผลิตกรดอินโดลอะซิติก (IAA) การผลิตแอมโมเนีย การละลายฟอสเฟต การตรึงไนโตรเจน

และการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีและเอนไซม์พบว่า แบคทีเรียนี้คือ *Bacillus* sp.



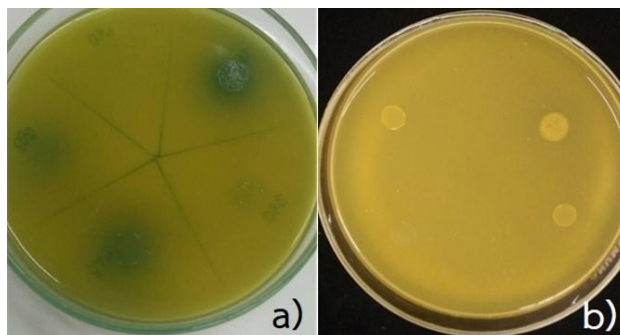
รูปที่ 2 การทดสอบการสร้างสารไซเดอโรฟอร์บนอาหาร Chrome Azurol S (CAS) agar

a) ผลบวก (เจริญและสร้างโซนใสสีเหลืองรอบโคโลนี),

b) ผลลบ (เจริญแต่ไม่พบโซนใสสีเหลือง)

3.3 การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria, PSB)

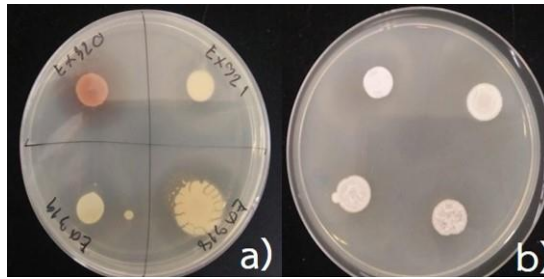
การทดสอบความสามารถละลายฟอสเฟต บนอาหาร GYA double-layered agar medium พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 24 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญและสร้างบริเวณใสสีฟ้ารอบๆ โคโลนีได้ และอีก 53 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถเจริญบนอาหาร GYA double-layered agar ได้ (รูปที่ 3, ตารางที่ 1) เนื่องจากจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่ใช้ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate; TCP) นอกจากนี้ยังมีการใช้เหล็กฟอสเฟต (iron phosphate) อะลูมิเนียมฟอสเฟต (aluminum phosphate) และแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) แต่จะละลายน้ำได้ยากกว่าไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Bharucha et al., 2013) Hameeda et al. (2008) พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอื่นๆ ช่วยเพิ่มชีวมวลของพืช (20–40 เปอร์เซ็นต์) การปลูกเชื้อ *Serratia marcescens* EB 67 และ *Pseudomonas* sp. CDB 35 ให้กับพืชในสภาวะเรือนทดลองส่งผลให้ชีวมวลพืช (น้ำหนักแห้ง) เพิ่มขึ้น 99 เปอร์เซ็นต์ โดย *S. marcescens* EB 67 และ 94 เปอร์เซ็นต์ โดย *Pseudomonas* sp. CDB 35



รูปที่ 3 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร GYA double-layered agar medium ที่เติม tricalcium phosphate a) ผลบวก (สร้างโซนสีฟ้าบนอาหาร), b) ผลลบ (ไม่สร้างโซนสีฟ้าบนอาหาร)

3.4 การทดสอบการสร้างฮอร์โมนกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid, IAA)

การทดสอบการสร้างฮอร์โมนกรดอินโดล-3-แอซิดิก (IAA) พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 61 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก โดยไอโซเลตที่ผลิตมากที่สุดคือ ไอโซเลต BWPD3_KK28 ผลิตได้ 54.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีแบคทีเรียจำนวน 16 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ (รูปที่ 4, ตารางที่ 1) ซึ่งการผลิต IAA โดยจุลินทรีย์มีผลในเชิงบวกต่อการพัฒนาและการยึดตัวของระบบราก ซึ่งช่วยในการดูดซึมน้ำและสารอาหารที่จำเป็น อาจนำไปสู่การเจริญเติบโตของรากที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มความแข็งแรงของพืชเมื่อเทียบกับการควบคุม (Rana et al., 2011) *Kocuria turfanensis* strain 2M4 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืชทนเค็มในประเทศอินเดีย สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก (IAA) โดยสามารถผลิต IAA ได้ 38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมทริปโตเฟน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถละลายฟอสเฟตได้ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สร้างไซเดอโรฟอร์ได้ 53 เพอร์เซ็นต์ siderophore units ในอาหาร iron-free minimal MM9 medium และ สร้างแอมโมเนียได้ 1.8 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ในอาหาร peptone water broth (Goswami et al., 2014)



รูปที่ 4 การทดสอบการสร้าง indole-3-acetic acid ของแบคทีเรียบนอาหาร solid medium a) ผลบวก (สร้างโซนใสสีชมพู-สีเหลือง), b) ผลลบ (ไม่พบโซนสีชมพู)

ตารางที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่แยกได้จากกากตะกอนก๊าซชีวภาพ

Isolate	Nitrogen fixation		Siderophore		Phosphate solubilization		Indole-3-acetic acid	
	Growth	Color change	Growth	Color change	Growth	Color change	Quality	Quantity (µg/ml)
BWPD2_KK1	-	-	++	+	+	+	-	20.90
BWPD2_KK2	-	-	++	+	-	-	+	ND
BWPD1_KK3	++	++	++	+	-	-	-	-
BWPD1_KK4	+++	+	++	+++	+	+	+	25.12
BWPD2_KK5	-	-	-	-	+	+	+	27.18
BWPD2_KK6	++	+	++	+	-	-	+	10.90
BWPD1_KK 7	+	++	+++	+++	-	-	+	ND
BWPD1_KK 8	-	-	++	++	+	+	+	ND
BWPD1_KK 9	+	++	++	+	-	-	+	25.78
BWPD1_KK 10	-	-	-	-	-	-	+	25.20
BWPD1_KK 11	+	-	++	+	-	-	+	31.56
BWPD1_KK 12	+++	+++	++	++	+	+	+	49.41
BWPD1_KK 13	+	-	++	+	-	-	+	29.91
BWPD1_KK 14	+	-	++	+	-	-	+	29.66
BWPD1_KK 15	+	+	++	+++	-	-	+	32.31
BWPD1_KK 16	-	-	++	-	-	-	-	9.17
BWPD1_KK 17	++	+++	+++	+++	+	+	-	35.12
BWPD1_KK 18	++	+++	++	+++	-	-	+	ND
BWPD1_KK 19	-	-	++	-	-	-	-	25.53
BWPD1_KK 20	-	-	++	-	+	+	+	36.69
BWPD1_KK 21	-	-	+	-	-	-	-	16.44

ตารางที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่แยกได้
จากกากตะกอนก๊าซชีวภาพ (ต่อ)

Isolate	Nitrogen fixation		Siderophore		Phosphate solubilization		Indole-3-acetic acid	
	Growth	Color change	Growth	Color change	Growth	Color change	Quality	Quantity (µg/ml)
BWPD2_KK 22	+++	+++	++	++	+	+	+	14.12
BWPD1_KK 23	+++	+++	+++	++	+	+	+	22.97
BWPD1_KK 24	-	-	++	+	+	+	-	0
BWPD1_KK 25	+	-	+++	+++	-	-	+	26.03
BWPD2_KK 26	-	-	++	+	-	-	+	23.55
BWPD1_KK 27	-	-	++	+	-	-	+	24.79
BWPD1_KK 28	+	-	++	+	-	-	+	15.78
BWPD1_KK 29	-	-	++	+++	+	+	+	33.22
BWPD1_KK 30	++	++	+++	+++	-	-	+	16.36
BWPD1_KK 31	-	-	++	+	-	-	+	ND
BWPD1_KK 32	+++	+++	++	+++	+	+	-	0
BWPD1_KK 33	-	-	++	+	-	-	+	19.00
BWPD1_KK 34	+	-	++	+	-	-	+	ND
BWPD1_KK 35	+	-	-	-	-	-	-	0
BWPD1_KK 36	-	-	-	-	-	-	-	0
BWPD2_KK 37	-	-	++	++	+	+	+	26.93
BWPD1_KK 38	++	++	+++	+++	+	+	+	22.31
BWPD2_KK 39	-	-	++	++	+	+	+	13.38
BWPD2_KK 40	+++	+++	++	+++	+++	+	+	ND
BWPD2_KK 41	-	-	-	-	+	+	+	15.28
BWPD2_KK 42	+	-	++	+	+	+	+	ND
BWPD2_KK 43	++	+	++	+	+	+	+	11.65
BWPD2_KK 44	-	-	++	+	-	-	+	20.32
BWPD1_KK 45	+++	+++	++	+++	-	-	-	0
BWPD1_KK 46	++	+	++	++	-	-	+	13.55
BWPD2_KK 101	-	-	+++	+++	+++	+	+	24.79
BWPD2_KK 102	++	+	++	+	+	+	+	ND
BWPD1_KK 200	++	+	++	+	-	-	+	14.29
BWPD3_KK 1	-	-	+	+	-	-	+	24.95
BWPD3_KK 2		-	-	-	-	-	+	8.84
BWPD3_KK 3	++	-	++	+	-	-	+	12.64
BWPD3_KK 4	++	-	+	+	-	-	+	28.17
BWPD3_KK 5	++	-	+	+	+	+	+	9.66
BWPD3_KK 6	++	++	++	+++	-	-	+	11.56
BWPD3_KK 7	-	-	+	++	-	-	-	13.96

ตารางที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่แยกได้จากกากตะกอนก๊าซชีวภาพ (ต่อ)

Isolate	Nitrogen fixation		Siderophore		Phosphate solubilization		Indole-3-acetic acid	
	Growth	Color change	Growth	Color change	Growth	Color change	Quality	Quantity (µg/ml)
BWPD3_KK 8	+++	-	++	+++	+	+	+	10.90
BWPD3_KK 9	++	++	+	++	-	-	-	19.66
BWPD3_KK 9	++	++	+	++	-	-	-	19.66
BWPD3_KK 11	-	-	+	+	-	-	+	19.83
BWPD3_KK 12	+	-	-	-	-	-	+	5.20
BWPD3_KK 13	++	-	++	+	-	-	-	0
BWPD3_KK 14	+	++	++	+++	-	-	+	12.55
BWPD3_KK 15	++	++	++	++	-	-	+	25.94
BWPD3_KK 16	++	+	+	++	-	-	+	9.41
BWPD3_KK 17	+	-	++	++	-	-	-	13.63
BWPD3_KK 18	++	-	++	++	-	-	+	12.97
BWPD3_KK 19	++	-	+	++	-	-	+	25.36
BWPD3_KK 20	+++	+	++	+++	-	-	+	14.95
BWPD3_KK 21	+	-	+	++	-	-	+	29.83
BWPD3_KK 22	+	-	++	+++	-	-	+	24.21
BWPD3_KK 23	+	-	++	++	+	+	+	12.22
BWPD3_KK 24	++	+	++	-	-	-	+	13.05
BWPD3_KK 25	+	-	++	++	-	-	+	13.46
BWPD3_KK 26	++	-	+	-	-	-	+	19.00
BWPD3_KK 27	+	-	++	-	-	-	+	10.07
BWPD3_KK 28	++	-	++	+	-	-	+	54.95

หมายเหตุ	-	คือไม่เจริญ/ไม่เปลี่ยนสีอาหาร,
	+	คือเจริญน้อย/บริเวณใสหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีน้อย
	++	คือเจริญปานกลาง/บริเวณใสหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีปานกลาง
	+++	คือเจริญมาก/บริเวณใสหรือการเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
	ND	คือไม่ได้ทดสอบ

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกากตะกอนจากกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 77 ไอโซเลต เมื่อทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่า มี 52 ไอโซเลต ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ 70 ไอโซเลต สามารถ

สร้างสารไซโตโครฟอรได้ 24 ไอโซเลต สามารถละลายฟอสเฟตได้ และ 67 ไอโซเลต สามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่า มี 6 ไอโซเลต ได้แก่ BWPD1_KK4, BWPD1_KK12, BWPD2_KK22, BWPD1_KK23, BWPD1_KK38 และ BWPD2_KK43 มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชครบทุกด้านที่ทำการทดสอบ แต่จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อยอดเพื่อระบุชนิด และคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดมาปรับใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรืออาจนำเชื้อที่มีคุณสมบัติโดดเด่นด้านต่างๆ มาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ณิชา บุณสิงห์. (2563). *ก๊าซชีวภาพผลผลิตจากมูลสัตว์สู่พลังงานทดแทน*. สืบค้นเมื่อวันที่ 29 กันยายน 2563 จาก https://www.parliament.go.th/ewtadmin/ewt/parliament_parcy/ewt_dl_link.php?nid=66535&filename=thai_national_assembly
- วราภรณ์ สุทธิสา และ บุษบา วาปี. (2562). การคัดแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวจากดินบริเวณรอบรากต้นบานไม่รู้โรยป่า (*Gomphrena celosioides* Mart.). *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 21(3), 87-94.
- ศูนย์บริการข้อมูลโครงการศึกษาวิจัยต้นแบบวิสาหกิจชุมชนพลังงานสีเขียวจากพืชพลังงาน. (2556). *คู่มือการลงทุนโรงไฟฟ้าก๊าซชีวภาพจากพืชพลังงาน*. กรุงเทพฯ: หจก. มิตรภาพการพิมพ์.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M.S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of azotobacter and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan, *Turkish Journal of Biology*, 29, 29-34.

- Bakthavatchalu, S., & Shivakumar S. (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*, 50(4), 250-256.
- Bharucha, A. E., Permberton, J. H., & Locke, J. R. (2013) American gastroenterological association technical review on constipation. *Gastroenterology*, 114(1), 218-238.
- Chandna, P., Nain, L., Singh, S., & Kuhad, R. C. (2013). Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BMC Microbiology*, 13, 1-14.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds Produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 93–796.
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., & Thakke, J. N. (2014). Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 566–576.
- Gupta, S., Meena, M. K., & Datta, S. (2014). Isolation, characterization of plant growth promoting bacteria from the plant *Chlorophytum borivilianum* and *in-vitro* screening for activity of nitrogen fixation, phosphatase solubilization and IAA production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(7), 1082-1090.
- Hafeez, F. Y., Yasmin, S., Ariani, D., Rahman, M., Zafar, Y., & Malik, K. A. (2006). Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for Sustainable Development*, 26, 143–150.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., & Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna, *Microbiology Research*, 163, 234—242.

- Hendroko, R., Wahyudi, A., Situmorang, E. C., Toruan, N., Liwang, T., & Wahono, S. K. (2012). Bacteria biodiversity in cow dung, capsule husk and seed cake of *Jatropha curcas* Linn anaerobic digesters. *International Biology Conference (IBOC)*, Surabaya.
- Kanimozhi, K., & Panneerselvam, A. (2010). Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp. isolated from Thanjavur district. *Pelagia Research Library*, 1(3), 138-145.
- Kesaulya, H., Baharuddin, Zakaria, B., & Syaifu, A. S. (2015). Isolation and physiological characterization of PGPR from potato plant rhizosphere in medium land of Buru island. *Procedia Food Science*, 3, 190–199.
- Pahari, A., & Mishra, B. B. (2017). Characterization of siderophore producing rhizobacteria and its effect on growth performance of different vegetables. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 1398-1405.
- Rana, A., Saharan, B., Joshi, M., Prasanna, R., Kumar. K., & Nain, L. (2011). Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiology*, 61, 893-900.
- Sutthisa, S., & Khamjandee, S. (2019). Isolation and selection of plant growth promoting rhizobacteria from *Wedelia trilobata* (L.) A.S. Hitchcock rhizosphere. *RMUTP Research Journal Science & Technology*, 13(2), 9-92.
- Vishan, I., Sivaprakasam, S., & Kalamdhad, A. (2017). Isolation and identification of bacteria from rotary drum compost of water hyacinth. *International Journal Recycling Organic Waste in Agriculture*, 6, 245–253.
- Zhang, J., Wang, P., Fang, L., Zhang, Q. A., Yan, C., & Chen, J. (2017). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. *Polish Journal of Microbiology*, 66(1), 57–65.