



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF EFFECTIVE
MICROORGANISMS FOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ :

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย
2. การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน
3. การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม
4. การผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียเชิงพาณิชย์

โดย

ปิยะนุช เนียมทรัพย์ ภัทธนาวรรณ พรมนัม ปิรกานต์ บรรเจิดกิจ
ดนุวัต เพ็งอ้น



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม
RESEARCH AND DEVELOPMENT OF EFFECTIVE MICROORGANISMS
FOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ :

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย
2. การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน
3. การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม
4. การผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียเชิงพาณิชย์

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2550-2551
จำนวน 1,917,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางปิยะนุช เนียมทรัพย์
ผู้ร่วมโครงการ นางสาวภัททนาวรรณ พรมน้อม
 นางสาวพริกานต์ บรรเจิดกิจ
 นายดนุวัต เพ็งอ้น

การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม
RESEARCH AND DEVELOPMENT OF EFFECTIVE
MICROORGANISMS FOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

ปิยะนุช เนียมทรัพย์¹ ภัททนาวรรณ พรหมนิม² พีรکانดี บรรเจดกิจ¹
ดนุวัต เพ็งอ้น²

PIYANUCH NIAMSUP¹, PATTANAWAN PROMNIM², PEERAKARN BANJERDKIT¹,
DANUWAT PENGON²

¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

²ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง โปรตีน และไขมัน พบว่ามีทั้งสิ้น 3, 73, 89, 32 และ 99 ไอโซเลทตามลำดับ และจากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ดินและน้ำในบริเวณน้ำพุร้อนและดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันได้ พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันได้ระดับ 2 คือ มีลักษณะของน้ำมันแตกตัวเป็นเม็ดขนาดเล็กและจับตัวกันที่ช้า ๆ ขวด มีทั้งสิ้น 21 ไอโซเลท โดยการศึกษาครั้งนี้ได้มีการทำการจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ในงานทางสิ่งแวดล้อม เพื่อให้มีการเก็บข้อมูลของจุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างเป็นระบบและง่ายต่อการใช้งาน รวมทั้งสามารถเผยแพร่ต่อบุคคลทั่วไปให้เข้าถึงข้อมูลดังกล่าวได้ โดยการเชื่อมต่อกับฐานข้อมูลจุลินทรีย์ไว้ทางระบบเครือข่ายทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ 3 รูปแบบด้วยกัน คือ การเก็บบนอาหารวุ้นผิวหน้าเอียง การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80°C และการเก็บรักษาโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) และในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียเชิงพาณิชย์ ได้มีการจัดทำถังหมักสำหรับผลิตเชื้อจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์ โดยการพัฒนามาจากระบบถังหมักในระดับโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการนำเข้าถึงหมักจากต่างประเทศ โดยพัฒนาให้มี 2 ระบบ คือ ระบบถังหมักแบบเติมอากาศ และระบบถังหมักแบบไม่เติมอากาศ จำนวน 6 ชุด โดยมีขนาดบรรจุ 2000 ลิตร พร้อมอุปกรณ์เติมอากาศ ระบบน้ำไหลวน และระบบน้ำเข้า-น้ำออก จากการควบคุมการทำงานของปั๊ม

วิธีการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม คือ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพ ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณน้ำพุร้อนจำนวน 30 ไอโซเลต เป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 22 ไอโซเลต และจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน 8 ไอโซเลต และพบจำนวนจุลินทรีย์จากป่าบ้านโป่ง จำนวน 39 ไอโซเลต (SA1-SA39) จากห้วยไจ้จำนวน 40 ไอโซเลต (PW1-PW40) และจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วจำนวน 45 ไอโซเลต (KS1 – KS45) นำมาทดสอบการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยวิธีทางกายภาพ สังเกตระดับการย่อยน้ำมันด้วยตา พบว่าสามารถย่อยน้ำมันระดับ++ 34 ไอโซเลต จากนั้นทดสอบการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยวิธี Partition gravimetric 19 ไอโซเลตสามารถย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วได้มากกว่า 70 % และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยการไตเตรทได้ค่ากิจกรรม ได้ค่า 4.17-6.67 U/ml และด้วยวิธี Colorimetric ได้ค่า 0.48-1.01 U/ml. จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16s rDNA sequencing พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus boronitolerans* และ *Acinetobacter* sp. ซึ่งผลการศึกษานี้เหมาะสำหรับการเจริญเติบโต มีค่าดังนี้ ความเป็นกรด-ด่าง 8.5 - 9.5 อุณหภูมิ 37 - 40°C ความเร็วรอบของการให้อากาศ 150 - 200 rpm, และ% NaCl 0.5 ถึง 2.0% ตามลำดับ

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ในงานทางสิ่งแวดล้อม เพื่อให้มีการเก็บข้อมูลของจุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างเป็นระบบและง่ายต่อการใช้งาน รวมทั้งสามารถเผยแพร่ต่อบุคคลทั่วไปให้เข้าถึงข้อมูลดังกล่าวได้ โดยการเชื่อมต่อกับฐานข้อมูลจุลินทรีย์ไว้ทางระบบเครือข่ายทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยในงานวิจัยนี้ได้มีการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารต่าง ๆ ทางสิ่งแวดล้อม คือ สามารถย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย รวบรวมได้ทั้งสิ้น 120 ไอโซเลต และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน รวบรวมได้ทั้งสิ้น 110 ไอโซเลต โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ 3 รูปแบบด้วยกัน คือ การเก็บบนอาหารวุ้นผิวหน้าเอียง การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80°C และการเก็บรักษาโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และน้ำมัน เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยวิธี 16S rDNA sequencing รวมทั้งสิ้น 92 ไอโซเลต พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายขยะและน้ำเสียส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียคล้ายราในกลุ่มของแอคติโนมัยซีต *Streptomyces* มีความสามารถใน

(ค)

การย่อยสลายสารในน้ำเสียอีกด้วย ส่วนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันนั้น พบว่าส่วนใหญ่สามารถจำแนกได้เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* และ *Bacillus*

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดขยะและน้ำเสียมาทดสอบในรูปแบบของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม จากการผลิตเชื้อจุลินทรีย์แบบใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตแบบเติมอากาศ มีอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สูงกว่าแบบไม่เติมอากาศ เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไปทดสอบบำบัดขยะ โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในรูปปุ๋ยหมักและในรูปของเหลว พบว่า การใช้จุลินทรีย์ในรูปของปุ๋ยหมักทำให้การย่อยสลายขยะเกิดขึ้นเร็วกว่า โดยเชื้อเดี่ยวไอโซเลท MJUT076 มีประสิทธิภาพในการบำบัดขยะได้ดีที่สุด ทำให้ขยะเกิดการสูญเสียน้ำหนัก 22.45 และ 18.82 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนการบำบัดขยะโดยใช้เชื้อผสม พบว่า ขยะเกิดการสูญเสียน้ำหนัก 17.07 และ 21.74 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการนำ จุลินทรีย์ไปบำบัดน้ำเสียของโรงแรมและโรงงานแปรรูปสุกร พบว่า เชื้อเดี่ยวไอโซเลท PB014 ที่ผลิตแบบไม่เติมอากาศ สามารถลดค่าบีโอดีได้สูงที่สุด โดยลดค่าบีโอดีของน้ำเสียจากโรงแรมและโรงงานแปรรูปสุกรได้ 65.21 เปอร์เซ็นต์ และ 64.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถลดค่าบีโอดีได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการบำบัดด้วยเชื้อผสม การใช้เชื้อผสมบำบัดน้ำเสีย พบว่า การใช้เชื้อผสม MJUT026, MJUT076, MJUT122, และ PB014 ที่ผลิตแบบเติมอากาศ สามารถลดค่าบีโอดี ของน้ำเสียจากโรงแรมและโรงงานแปรรูปสุกรได้ 25.00 เปอร์เซ็นต์ และ 62.35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014



ABSTRACT

The 373 isolates of microorganisms from various samples were tested for protein, carbohydrate, lipid, hemicellulose and cellulose degradation activities on skim milk, starch, tributyrin, xylan and carboxy methyl cellulose respectively. The results showed that there were 7, 13, 12, 7 and 19 isolates of the microorganisms which possessed high efficiency on skim milk, starch, tributyrin, xylan and carboxy methyl cellulose degradation respectively. Among these isolates there were 9 isolates that possessed the ability to degrade various kinds of the macromolecule. The various bacterial strains were identified as uncultured Bacilli bacterium, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudoburkholderia malthae*, *Bacillus* sp. and *Bacillus amyloliquefaciens*. The using of pure and mixed culture in sewage and compost degradation shown that isolate MJUT076 and MJUT138 increased the rate of substrate decomposition 13.06% and 12.97% respectively, and could reduce the weight loss of sewage and compost more than the control. Pure and mixed cultures of selected bacterial strains were cultivated in wastewater treatment to study the efficiency of biodegradation using BOD removal as a monitoring parameter. Among the nine isolated bacteria, the isolate MJUT026 and PB014 with inoculum 3% was found to give a maximum reduction in BOD 95.71% when compare with control group. Contrastingly, the mixed cultures with 1:1 ratio showed its efficiency of BOD removal, which is lower than that of BOD removal of control.

Methods were used to removal of contaminated oil such as physical, chemical and biological methods. Biodegradation has been admired to clean-up oil polluted environment. The aim of this study was isolated and selected the dominated bacteria from natural resources and soil-oil contaminated that can be degrading used lubricating oil. The 30 isolate from hot-spring water, 39 isolate from natural soil, 40 isolate from natural water and 45 isolate found from contaminated soil and showed the best 34 dominated isolates were degradation bacteria. The 19 dominated isolates were possibility oil degradation more than 70% by using partition gravimetric method. Afterwards, The lipase activity showed that 4.17 to 6.67 U/ml by using titration technique and 0.48 to 1.01 U/ml by using colorimetric method. All dominated isolates were sequencing method for 16s rDNA sequencing, result showed that majority of dominated bacteria were *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus boronitolerans*

and *Acinetobacter* sp.. Optimum growth conditions were pH 8.5 to 9.5, temperature 37 to 40 °C, orbital shaker 150 to 200 rpm and 0.5 to 2.0 % NaCl, respectively.

In this research, we have established microbial database for sustainable environment, to preserve microbiological materials and information which can be offered to the scientific community both inside and outside Maejo Univeristy. We have preserved microbial isolates which have high ability to utilize compounds in environment, 120 isolates utilized compounds in waste and 110 isolates utilized compounds in oil. All of the isolates were deposited in three ways which consisted of keep on agar slant, keep in glycerol at - 80°C and freeze-drying. Total of 92 microbial isolates which capable to utilized compounds in sewage, wastewater and oil were identified by 16S rDNA sequencing. Most of isolates with sewage and wastewater degrading ability were identified to the genus *Bacillus* such as *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis*. Some of them were identified as actinomycetes in genus *Streptomyces*. Most of the isolates with oil degrading ability were identified to genus *Acinetobacter* and *Bacillus*.

This study was carried out to use pure and mixed cultures that have high effective decomposing activities to degrade the garbage and wastewater treatment. Bacteria producing under aerobic and anaerobic condition showed that the growth of bacteria was stimulated when produce under aerobic condition. Pure and mixed cultures that produced in compost form and liquid form were use in compost degradation. The result showed that MJUT076 with compost form gave the highest efficiency in compost degradation as 22.45% and 18.82% when compare with control. Using mixed cultures gave efficiency in compost degradation as 17.07% and 21.74% . High BOD reduction in wastewater of hotel and pork processing plant was observed when treated with PB014 with produce under anaerobic condition as 65.21% and 64% respectively. Additionally the pure isolate showed high efficiency of BOD reduction than mixed cultures treatment. In comparison with mixed cultures, the result indicated that mixed cultures of MJUT026, MJUT076, MJUT122 and PB014 with produce under aerobic condition showed better BOD reduction from hotel and pork processing plant as 25% and 62.35% than the mixed cultures of MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 and PB014

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2550-2551

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

นางปิยะนุช เนียมทรัพย์
นางสาวภัทณาวรรณ์ พรมนิ่ม
นางสาวพืระกานต์ บรรเจิดกิจ
นายดนุวัต เพ็งอ้น
คณะผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
ABSTRACT	(ง)
กิตติกรรมประกาศ	(ฉ)
สารบัญ	(๗)
สารบัญตาราง	(๗)
สารบัญภาพ	(๘)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	69
ผลการทดลองและวิจารณ์	87
สรุปผลการทดลอง	147
เอกสารอ้างอิง	152
ภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ	167
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์และสารเคมี	174
ภาคผนวก ค การย่อยสลายสารประกอบของจุลินทรีย์	181
ภาคผนวก ง คู่มือการใช้งานฐานข้อมูลจุลินทรีย์	185
ภาคผนวก จ ลำดับเบสของดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อย สลายสารในขยะ น้ำเสีย และน้ำมัน	197
ภาคผนวก ฉ การเตรียมถังหมักจุลินทรีย์	228
ภาคผนวก ช ผลการทดลองบำบัดขยะและน้ำเสีย	232
ภาคผนวก ซ เอกสารประกอบการฝึกอบรม และผลการฝึกอบรม	234

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ส่วนประกอบที่เป็นน้ำตาลของไซแลนในสารประกอบเฮมิเซลลูโลสชนิดต่างๆ	5
2	แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	6
3	แสดงสกุลของจุลินทรีย์บางชนิดที่ย่อยสลายเซลลูโลส	12
4	ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน	26
5	ชนิดและหน้าที่ของแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์	47
6	ราคาของอินทรีย์และอนินทรีย์ในโตรเจน (สำรวจราคาในระหว่างปี 2543 – 2544)	49
7	ส่วนประกอบของกากน้ำตาลในประเทศไทย	53
8	แสดงรายละเอียดลักษณะเฉพาะของถังหมักแม่โจ้ (Maejo Fermenter)	66
9	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่าง	87
10	แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลาย skim milk ได้ดี	89
11	แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลาย starch ได้ดี	90
12	แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลาย tributyrin ได้ดี	91
13	แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลาย carboxy methyl cellulose ได้ดี	92
14	แสดงไอโซเลตที่ย่อยสลาย xylan ได้ดี	93
15	แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ 5 ชนิด	94
16	จีโนมและสปีชีส์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส	95
17	ผลของพีเอชในแต่ละวันของขยะที่ผ่านการบำบัดด้วยจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม	96
18	ผลของอุณหภูมิในแต่ละวันของขยะที่ผ่านการบำบัดด้วยจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม	97

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
19	ผลของแอมโมเนียในแต่ละวันของขยะที่ผ่านการบำบัดด้วยจุลินทรีย์ เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม	98
20	แสดงผลการย่อยสลายของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งดินธรรมชาติ บ้านโป่ง	104
21	แสดงผลการย่อยสลายของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติห้วย ไฉ้	106
22	การทดสอบการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) ในเชื้อ แบคทีเรีย KS1 – KS45	108
23	การทดสอบความสามารถการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของ แต่ละไอโซเลต	113
24	แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยน้ำมันได้ ในระดับ 2	114
25	แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ไอโซเลตต่าง ๆ	117
26	การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง แตกต่างกัน	122
27	การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	124
28	การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ความเร็วรอบในการเขย่า แตกต่างกัน	126
29	การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ % NaCl แตกต่างกัน	128
30	แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร ในขยะ น้ำเสีย และน้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing	133
31	ค่าพีเอชและค่าความหวานของสารละลายในถังหมักที่ไม่เติม อากาศ	138
32	ค่าพีเอชและค่าความหวานของสารละลายในถังหมักที่เติมอากาศ	139
33	อุณหภูมิและค่าพีเอชของขยะหลังการบำบัดด้วยจุลินทรีย์	141
34	ค่าบีโอดีของน้ำทิ้งโรงแรมเชียงใหม่วัฒนโกสินทร์ ก่อนและหลังการ เติมเชื้อจุลินทรีย์	143

(ญ)

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
35	ค่าปีโอดีของน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปสุกกรมแม่โจ้ ก่อนและหลังการเติมเชื้อจุลินทรีย์	145
36	สรุปคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ปัจจัยต่างๆ	149



สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แสดงการค้นคว้าและเสนอสูตรโครงสร้างของเบนซีน	22
2	แสดงการเขียนสูตรโครงสร้างอย่างย่อของเบนซีน	22
3	แสดงการเชื่อมต่อกันของวงอะโรมาติก	23
4	แสดงการเกิดปฏิกิริยาแทนที่ของเบนซีน	23
5	ช่วงอุณหภูมิต่างๆ ที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต	32
6	ช่วง pH ต่างๆ ที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต	35
7	แสดงการเลี้ยงแบบ slide culture ของ <i>Aspergillus niger</i> ซึ่ง แสดงให้เห็นโคนิเดียมสีดำยื่นออกไปรอบๆ	39
8	สภาวะการหมักจุลินทรีย์	56
9	ถังหมักที่ประกอบด้วยไบปัดชุดเดียว	57
10	ถังหมักที่ประกอบด้วยไบปัด 3 ชุด	58
11	ถังหมักหัวเชื้อจุลินทรีย์แม่ใจ (Maejo Fermenter)	65
12	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายขยะระหว่างไฮโซเลตที่ คัดเลือกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม	99
13	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายบีโอดีหลังการบำบัด ด้วยเชื้อเดี่ยว	100
14	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายบีโอดีหลังการบำบัด ด้วยเชื้อผสม	102
15	ตัวอย่างการ streak plate agar ของเชื้อแบคทีเรีย Pw38 และ Pw27	105
16	ตัวอย่างการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินของเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45	107
17	ตัวอย่างการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) โดยถ่ายจากกล้อง จุลทรรศน์ชนิดเลนส์ ประกอบ (compound microscope) กำลังขยาย 1000 เท่า	109
18	การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปแบบของน้ำมัน	111
19	แสดงผลการย่อยสลายน้ำมันเครื่องใช้แล้ว	111
20	การทดสอบปริมาณน้ำมันที่เหลือด้วยวิธี partition gravimetric method	114

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
21	ลักษณะปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่หลังจากนำไปอบที่ 105 °C นาน 30 min	116
22	แสดงการทดสอบค่ากิจกรรมไลเปสโดยวิธี colorimetric method	118
23	ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่งลำดับเบสบริเวณ V ₁ -V ₃	131
24	ภาพตัวอย่างลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย	131
25	ตัวอย่างชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรีย PB014 ที่นำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสของ primer 27F ไปเทียบกับในโปรแกรม BioEdit	132
26	การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในถังหมักที่ไม่เติมอากาศ	137
27	การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในถังหมักที่เติมอากาศ	138
28	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารในขยะโดยการบำบัดด้วยเชื้อจุลินทรีย์แบบเปียกและแบบแห้ง	142

คำนำ (Introduction)

ทุกวันนี้ปัญหาขยะและน้ำเสีย รวมไปถึงการปนเปื้อนน้ำมันในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาระดับชาติของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเมืองใหญ่ที่มีประชากรมากและมีโรงงานอุตสาหกรรมตั้งอยู่ด้วย เช่น กรุงเทพมหานคร เชียงใหม่ เป็นต้น ขยะนั้นมีสารประกอบหลากหลายรวมกันอยู่ และแต่ละประเภทนั้นมีอายุการสลายตัวที่แตกต่างกัน บางชนิดสลายตัวได้ช้ามาก การแยกขยะจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้การบำบัดทำได้ดี ขยะที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ก็คือ ขยะที่มีสารประกอบพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง โปรตีนและไขมัน ซึ่งหากนำมาย่อยสลายแล้วสามารถทำเป็นปุ๋ยได้ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสารประกอบเหล่านี้ได้ โดยการสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ หรือสร้างแล้วยังอยู่ในเซลล์ ซึ่งมักตรวจพบจุลินทรีย์เหล่านี้ได้จากดินและจากแหล่งต่างๆ ที่มีสารประกอบดังกล่าวสะสมอยู่ แต่ที่เป็นปัญหาในทุกวันนี้ เนื่องจากปริมาณขยะมีมากและประชากรมักทิ้งกองหรือทิ้งลงในแม่น้ำลำคลอง มีจำนวนมากจนธรรมชาติฟอกตัวเองไม่ทัน ส่วนน้ำเสียนั้นก็มีปัญหาเช่นกัน เมื่อมีชุมชนใหญ่ก็จะมี การปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะโดยไม่มีการบำบัดก่อน จึงทำให้แหล่งน้ำสาธารณะฟอกตัวเองไม่ทัน ประกอบกับโรงงานอุตสาหกรรมบางแห่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรงงานที่เป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือนซึ่งไม่มีพื้นที่หรือระบบการจัดการที่ดีพอก็ระบายน้ำเสียสู่ท่อ ระบายน้ำลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะซึ่งก่อให้เกิดน้ำเสียเช่นกัน นอกจากการออกกฎหมายควบคุมการทิ้งขยะและการระบายน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแล้ว การรณรงค์ให้ประชาชนทั่วไปร่วมมือกันแยกขยะ และหาวิธีการนำมาใช้ใหม่เพื่อลดจำนวนขยะเป็นสิ่งจำเป็นแล้ว การกำจัดขยะและบำบัดน้ำเสียโดยการใช้จุลินทรีย์ เพื่อลดระยะเวลาการสลายตัวของขยะและน้ำเสียทุกชนิดก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจ ส่วนสาเหตุหลักของการเกิดปัญหาน้ำมันปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมคือ การเกิดอุบัติเหตุทางการขนส่งน้ำมันทางทะเล ซึ่งปัญหาจะพบในบริเวณเฉพาะ คือ ในทะเล มหาสมุทรและแม่น้ำที่มีเรือขนส่งและขนถ่ายน้ำมัน รวมทั้งการรั่วไหลของน้ำมันจากเรือประเภทต่าง ๆ แต่ในปัจจุบันจากความต้องการใช้น้ำมันของประเทศที่นับวันมีความต้องการที่สูงขึ้น ทั้งในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมและจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนน้ำมันที่เหลือใช้จากกิจกรรมต่าง ๆ ทั้งในดินและในน้ำ สาเหตุใหญ่ในการปนเปื้อนของน้ำมันในสิ่งแวดล้อมจึงพบว่าเกิดมาจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น น้ำมันที่เกิดจากกิจกรรมต่าง ๆ ของอุตสาหกรรม การรั่วไหล ของถังเก็บน้ำมันของปั้มน้ำมัน น้ำมันที่เหลือจากการประกอบอาหาร เป็นต้น ซึ่งปัญหาเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและส่งผลกระทบต่อเนื่องมาด้วยความ เป็นอยู่ของมนุษย์

ในต่างประเทศมีผู้สนใจนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว มาเติมในขยะและน้ำเสีย นอกเหนือ ไปจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติแล้ว เพื่อลดปริมาณของสารพิษและเพื่อให้การสลายตัวของสารอินทรีย์เป็นไปด้วยความรวดเร็วยิ่งขึ้น ในระยะนี้มีการนำเข้าจุลินทรีย์จากต่างประเทศมาใช้ในการกำจัดขยะและน้ำเสียหลายชนิด แต่ก็อยู่ในขั้นทดลองและโฆษณา การนำจุลินทรีย์จากต่างประเทศมาใช้ในประเทศอาจไม่ได้ผลเท่าที่ควรและมีราคาแพง การที่จุลินทรีย์มีเมแทบอลิซึมที่หลากหลายและต้องการสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน และจากการที่พบว่าที่ใดมีสารประกอบอยู่ ที่นั้นย่อมต้องมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบนั้นอยู่ด้วยเสมอ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดขยะและบำบัดน้ำเสียแต่ละชนิดในท้องถิ่น จึงน่าจะให้ผลที่ดีกว่าและถ้าขยะและน้ำเสียนั้น มีความซับซ้อนของสารมากก็อาจนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาศึกษาการอยู่ร่วมกันเพื่อทำให้การกำจัดขยะ หรือบำบัดน้ำเสียเกิดประสิทธิผลมากที่สุด และจัดทำให้จุลินทรีย์อยู่ในรูปแบบที่ให้แต่ละครัวเรือนหรือหน่วยงานสามารถนำไปใช้งานได้สะดวกที่สุด ส่วนการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันที่เกิดขึ้น โดยใช้จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน ซึ่งเป็นวิธีการที่นักวิจัยให้ความสนใจในการศึกษาและพัฒนามากที่สุด ทั้งการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติและจุลินทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรม ที่พบว่ามีความสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดี แต่สำหรับประเทศไทยการใช้สิ่งมีชีวิตปรับปรุงพันธุ์ยังเป็นข้อจำกัดในการใช้งานอยู่มากดังนั้น การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันจากธรรมชาติ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ต้องมีการวิจัยอย่างต่อเนื่องและเป็นระบบอย่างแท้จริง รวมทั้งการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เหล่านี้

อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยการวิจัยเพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยเน้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเด่นในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในขยะ น้ำเสียและย่อยน้ำมัน ทั้งในรูปแบบของการศึกษา ค้นคว้าและเก็บรักษาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ประเภทนี้เป็นระบบนั้นพบว่ามีน้อย ในโครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสียและย่อยน้ำมัน จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและแหล่งทรัพยากรธรรมชาติต่าง ๆ ซึ่งเกี่ยวเนื่องโครงการวิจัยอื่น ๆ ที่อยู่ในแผนงานวิจัยเดียวกัน ที่ได้เสนอการเก็บรักษาสายพันธุ์อย่างมีระบบของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีแยกและคัดเลือกได้ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย และย่อยน้ำมันได้
2. เพื่อศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้เพื่อนำไปพัฒนาผลิตในระดับอุตสาหกรรม
4. เพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์อย่างมีระบบของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีแยกและคัดเลือกได้
5. เพื่อจัดทำฐานข้อมูลและธนาคารพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ได้
5. เพื่อทำเป็นแหล่งสาธิต แหล่งถ่ายทอดเทคโนโลยี ฐานงาน ประชุมและฝึกอบรม
6. เพื่อนำผลงานวิจัยและเทคโนโลยีที่เหมาะสมถ่ายทอดสู่ชุมชน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายขยะ น้ำเสียและน้ำมัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม อย่างมีประสิทธิภาพ
2. ได้รวบรวมจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายขยะ น้ำเสีย และน้ำมันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมในรูปแบบที่แตกต่างกัน
3. ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อการพัฒนาเชิงพาณิชย์ต่อไป
4. ได้สนับสนุนการสร้างระบบการเก็บเชื้อพันธุ์ของจุลินทรีย์เพื่อสิ่งแวดล้อมอย่างเป็นรูปธรรม
5. เป็นการสร้างแนวทางการใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติอย่างรู้คุณค่า เพื่อการแก้ปัญหาทางสิ่งแวดล้อมภายใต้หลักการพัฒนาอย่างยั่งยืน
6. ทำให้มีแหล่งสาธิตระบบการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในมหาวิทยาลัย และเป็นแหล่งแห่งการเรียนรู้ตาม พ.ร.บ. การศึกษาแห่งชาติ
7. ทำให้มีแหล่งถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม พร้อมทั้งสร้างองค์ความรู้สำหรับประชาชนภาคเหนือตอนบนให้ลดการใช้สารเคมีแบบยั่งยืน

การตรวจเอกสาร (Literature review)

1. การศึกษาจุลินทรีย์ย่อยขยะ

ขยะนั้นมีสารประกอบหลากหลายรวมกันอยู่ และแต่ละประเภทนั้นมีอายุการสลายตัวที่แตกต่างกัน บางชนิดสลายตัวได้ช้ามาก การแยกขยะจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้การบำบัดทำได้ดี ขยะที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ก็คือ ขยะที่มีสารประกอบพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง โปรตีน และไขมัน ซึ่งหากนำมาย่อยสลายแล้วสามารถทำเป็นปุ๋ยได้ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสารประกอบเหล่านี้ได้ โดยการสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ หรือสร้างแล้วยังอยู่ในเซลล์ ซึ่งมักตรวจพบจุลินทรีย์เหล่านี้ได้จากดินและจากแหล่งต่าง ๆ ที่มีสารประกอบดังกล่าวสะสมอยู่

สารอินทรีย์ที่พบในน้ำเสียเกิดขึ้นจากการปล่อยน้ำทิ้งและของเสียจากแหล่งชุมชน โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โรงฆ่าสัตว์ ร้านอาหาร น้ำเสียที่มีสารอินทรีย์สูงจะส่งผลกระทบต่อระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเนื่องจากมีผลไปขัดขวางการละลายของออกซิเจนลงในน้ำ และทำให้การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เกิดได้ช้า จึงได้มีการพัฒนากระบวนการทางชีวภาพการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีมาใช้ จากการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียนั้นมีทั้งแบบการใช้เอนไซม์และแบบใช้ตัวเซลล์ (Chigusa และคณะ, 1996; Chin และคณะ, 1996) ซึ่งการใช้ทั้งสองแบบก็จะมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน การใช้เอนไซม์จะดีในแง่ของการที่เอนไซม์สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทันทีที่เติมลงในน้ำเสีย ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการบำบัดจึงเร็วกว่าการใช้เซลล์ แต่เอนไซม์จะมีความไวต่อการเสียสภาพได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะในน้ำเสียซึ่งประกอบด้วยสารต่าง ๆ มากมายที่ไม่สามารถกำหนดได้ นอกจากนี้การผลิตและการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ยังเป็นการเพิ่มขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียอีกด้วย ในกรณีของตัวเซลล์เมื่อมีการเติมลงในน้ำเสียจะต้องอาศัยระยะเวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในน้ำเสียก่อนจึงสามารถเกิดกิจกรรมได้อย่างเต็มที่ แต่เมื่อมีการปรับตัวแล้ว จุลินทรีย์จะสามารถเกิดกิจกรรมได้อย่างต่อเนื่อง และสามารถนำตะกอนเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ (Recycle) ซึ่งไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตเซลล์บ่อยครั้ง เมื่อเปรียบเทียบข้อได้เปรียบเสียเปรียบแล้วจะเห็นว่าการใช้ตัวเซลล์ในการบำบัดน้ำเสียมีความเป็นไปได้สูงกว่าการใช้เอนไซม์

สารประกอบที่มักพบในขยะที่ย่อยสลายได้ ได้แก่

1. เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ เซลลูโลสแต่ละโมเลกุลจะประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 200-10,000 โมเลกุล (บัญญัติ, 2532) ซึ่งโกลิเมอร์ของกลูโคสนี้จะมีลักษณะเป็นแบบ β -configuration คือ

β -1,4 เป็นโพลีเมอร์ที่ละลายน้ำได้น้อยมาก ดังนั้นจึงมีความเฉื่อยต่อพวกไฮโดรเลส หรือ hydrolytic enzyme (ปราวณี, 2535) เซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์เส้นตรงที่ประกอบขึ้นจากกลูโคส ซึ่งโครงสร้างที่เป็นเส้นตรงของเซลลูโลสนี้จะทำให้เกิดมีผิวหน้าที่สม่ำเสมอของหมู่ไฮดรอกซิลขึ้นทำให้สามารถที่จะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเซลลูโลสโมเลกุลที่อยู่ใกล้เคียงกันได้ คุณสมบัตินี้ทำให้เกิดความแข็งแรงมากขึ้น เช่น ในกรณีที่ย้ายยึดกันอยู่ เป็นต้น (เรื่องลักษณะ, 2539)

2. เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ส่วนใหญ่เป็นไซแลนซึ่งเป็นเฮมิเซลลูโลสชนิดหนึ่งที่พบได้ในปริมาณมากโดยเฉพาะในไม้เนื้ออ่อน จากการศึกษาพบว่าไซแลนจะเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างลิกนิน (lignin) กับสารคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ในผนังเซลล์ของพืช โดยประกอบไปด้วย น้ำตาลไซโลส (D-xylose) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นใน Birch wood ซึ่งจะมีน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) เป็นองค์ประกอบหลัก โดยทั่วไปในไซแลนจะประกอบไปด้วยน้ำตาลประมาณ 2-4 ชนิด ส่วนประกอบของน้ำตาลที่พบในไซแลน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบที่เป็นน้ำตาลของไซแลนในสารประกอบเฮมิเซลลูโลสชนิดต่างๆ

ชนิดของน้ำตาล	น้ำตาลแห้ง (เปอร์เซ็นต์)	
	Xylan from Birch wood	Xylan from Birch kraft pulp
Glucose	0.30	0.30
Xylose	81.8	92.9
Mannose	0.20	0.00
Arabinose	0.50	0.30
Galactose	0.80	0.00
Rhamnose	0.80	0.10
Acetyl group	0.04	0.00
Methylglucuronic acid	3.50	1.50

ที่มา : ชลธิชา, 2542

โครงสร้างโดยทั่วไปของไซแลนจะประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส ต่อเชื่อมกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะ β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylopyranosidic linkage ถึงแม้ว่าไซแลนจะได้มาจากพืชต่างชนิดกันก็ตามแต่จะมีโครงสร้างแกนหลักที่เหมือนกันคือ น้ำตาลไซโลสที่เชื่อมกับกรดกลูโคนิกด้วยพันธะ α -(1 $\rightarrow$ 2)-4-O-methyl-D-glucuronic acid linkage และ α -(1 $\rightarrow$ 3)-L-arabinofuranose linkage ซึ่งไซแลนที่พบในไม้เนื้ออ่อนจะมีส่วนของกิ่งที่เป็นกรดกลูโคนิกน้อยกว่าไซแลนที่ได้จากไม้เนื้อแข็ง

3. โปรตีน เป็นส่วนที่พบได้มากจากขยะในครัวเรือน เป็นส่วนที่เหลือจากการประกอบอาหาร และจากการบริโภค อาจเป็นโปรตีนจากพืช เช่น ถั่วชนิดต่าง ๆ หรือโปรตีนจากสัตว์ เช่น เศษเนื้อปลา สุกกร และโค

4. แป้ง เป็นส่วนที่พบได้มากจากขยะในครัวเรือน และในพืชชนิดต่าง ๆ เป็นโพลีเมอร์ของ กลูโคสหลายพันหน่วยเกาะกันด้วย β -1-4 linkage

5. ไขมัน เป็นส่วนที่พบได้มากจากขยะในครัวเรือน จากเมล็ดพืช เป็นต้น ประกอบด้วยกรด ไขมันและกลีเซอรอล

กระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ

1. การย่อยสลายในสภาพที่มีออกซิเจน (Aerobic)

เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยวิธีนี้สารอินทรีย์จะ ถูกย่อยสลายให้หมดโดยไม่เกิดก๊าซพิษ และกลิ่นเหม็นเน่า

2. การย่อยสลายในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic)

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์

1. แหล่งพลังงานและพลังงาน (Energy and substrate source)

สำหรับแหล่งพลังงานจุลินทรีย์จะได้พลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบเคมี (Chemotroph) หรือได้พลังงานจากแสง (Phototroph) ดังนั้นจึงสามารถแบ่งจุลินทรีย์โดยอาศัยแหล่ง พลังงาน และแหล่งคาร์บอนเป็นหลักดังตารางที่ 2 (Grega, Buckingham และ Evans, 1994)

ตารางที่ 2 แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์	แหล่งพลังงาน ในการสร้าง ATP	แหล่งคาร์บอน ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์
Photoautotroph (Photolithotroph)	แสง (Light)	คาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂)
Chemoautotroph (Chemolithotroph)	สารประกอบอนินทรีย์ (Inorganic compounds)	คาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂)
Photoheterotroph (Photoorganotroph)	แสง (Light)	สารประกอบอินทรีย์ (Organic compounds)
Heterotroph (Chemoorganotroph)	สารประกอบอินทรีย์ (Organic compounds)	สารประกอบอินทรีย์ (Organic compounds)

กระบวนการทำงานของเอนไซม์ (Enzymatic processes)

จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ โดยการสร้างเอนไซม์ซึ่งจะปล่อยออกภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายสารต่าง ๆ เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีเอส อะไมเลส และไลเปส

โปรตีเอส (Protease) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งเป็นโมเลกุลใหญ่ให้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน จากนั้นกรดอะมิโนจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็น เอมีน กรดคีโต แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ Keay (1971) แบ่งเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. แอซิดโปรตีเอส (Acid protease) เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช ประมาณ 2-5 ส่วนใหญ่ได้จากจุลินทรีย์พวกเชื้อรา และยีสต์ ไม่ค่อยพบในแบคทีเรีย มีกรดอะมิโนแอสพาเทตอยู่ที่บริเวณเร่งไม่ถูกยับยั้งโดยสารพวก Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ Diisopropylfluorophosphate (DFP) แต่ถูกยับยั้งโดยสารพวก Diazoketone compounds (Mizube, Takahashi และ Ando, 1973)

2. อัลคาไลน์โปรตีเอส (Alkaline protease) เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 7-11 พบทั้งในแบคทีเรีย รา และยีสต์ มีสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในสัตว์ น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 15,000-30,000 เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนซีรีนที่บริเวณเร่ง ซึ่งจะพบมากในแบคทีเรียตระกูลบาซิลลัส

3. นิวทรัลโปรตีเอส (Neutral protease) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง พบทั่วไปทั้งในแบคทีเรียและรา ในแบคทีเรีย *Bacillus polymyxa*, *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. thermoproteolyticus* มีการผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเพียงอย่างเดียว แต่ใน *B. subtilis* พบว่าผลิตทั้งเอนไซม์นิวทรัลและอัลคาไลน์โปรตีเอส (อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์, 2534)

อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในทางการค้า เพราะเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมหลายประเภทและเป็นที่ต้องการของตลาด อะไมเลสส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ เนื้อเยื่อจากสัตว์ ในมนุษย์พบได้จากต่อมน้ำลายและตับอ่อน รวมทั้งพบได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดและหลายสายพันธุ์

ซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์อะไมเลส

1. แป้งและไกลโคเจน (starch and glycogen)

เป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ พบแป้งในรูปของอาหารสะสมในพืชมีหัว เช่น มัน มันเทศ มันสำปะหลัง ในส่วนที่เป็นเมล็ดพืช เช่น ข้าว ข้าวสาลี และในผลไม้

จำนวนมาก แบ่งจากพืชมักจะรวมกันอยู่เป็นเม็ดแป้ง (starch granule) แม้ว่าแป้งจะเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสก็ตามแต่จำนวนกลูโคสในแป้งแต่ละชนิดจะไม่คงที่

2. อะไมโลส

ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว 250 ถึง 2000 หน่วยของกลูโคสจับยึดกันด้วยพันธะ α -1,4-glucosidic linkages เพียงอย่างเดียวไม่มีแขนง

3. อะไมโลเพคติน

ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่ยึดต่อกันด้วยพันธะ α -1,4-glucosidic linkages และมีพันธะก่อกแขนง (branching) α -1,6-glucosidic linkages ประมาณ 3 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ของพันธะทั้งหมด

4. ไกลโคเจน

เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสเช่นเดียวกับแป้ง และมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับอะไมโลเพคติน กล่าวคือทุกๆ 8 ถึง 10 หน่วยของกลูโคส ที่ต่อกันด้วยพันธะ α -1,4-glucosidic linkages จะแตกแขนงยึดกันด้วยพันธะ α -1,6-glucosidic linkages

เมื่อเอนไซม์อะไมเลสเข้าไปทำลายพันธะของซัปสเตรทแล้ว จะทำให้คุณสมบัติของซัปสเตรทเกิดการเปลี่ยนแปลงดังนี้ (Bernfeld, 1951)

1. ค่า reducing power ของซัปสเตรทเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดอนุมูล glycosidic aldehyde เพิ่มขึ้นซึ่งสามารถวัดได้โดยวัดหมู่อัลดีไฮด์ทั่วๆ ไป

2. การย้อมสีของซัปสเตรทโดยสารละลายไอโอดีนมีค่าลดลงและค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอดีนกับอะไมโลสกับอะไมโลเพคตินมีความยาวคลื่นลดลง เช่น สีเปลี่ยนจากน้ำเงินเป็นม่วง ม่วงแดง และน้ำตาล ตามลำดับ และปริมาณดูดกลืนแสงสีน้ำเงินลดลง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า dextrinization

1. ความหนืดของซัปสเตรทลดลง

2. ซัปสเตรทที่เป็นไกลโคเจนมีความขุ่นลดลงและสามารถวัดได้โดยใช้ nephelometer

ประเภทของเอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสมีหลายประเภทแบ่งแยกได้หลายแบบดังนี้

1. แบ่งตามชนิดของพันธะที่ถูกย่อยสลาย สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ endoamylase และ exoamylase (Yamamoto, 1988)

- 1.1 Endoamylase จะย่อยสลายพันธะ α -1,4-glucosidic linkages ภายในและภายนอกสายโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเดกซ์ทรีน (dextrin) ที่เป็นลูกโซ่ของกลูโคส

ขนาดแตกต่างกัน เอนไซม์กลุ่มนี้คือ แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) และอะไมโล 1,4 เด็กซ์ทรินเนส (amylase 1,4 dextrinase)

1.2 Sacchrifying amylase สามารถลดความหนืดของแป้ง และความขุ่นของไกลโคเจนได้อย่างช้าๆ ในขณะที่เดียวกันค่า reducing power ของซัสเตรทที่เป็นอะไมโลเพคตินเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในอัตราที่สม่ำเสมอและสามารถทำให้สีน้ำเงินของอะไมโลเพคตินกับไอโอดีนเปลี่ยนแปลงเป็นสีม่วงอย่างช้าๆ แต่ไม่จางหายไป (สีม่วงคือสีของ limit dextrin I ที่เอนไซม์ไม่สามารถย่อยต่อไปได้) สามารถทำให้ค่า optical rotation ลดลงในช่วงแรกของปฏิกิริยา หลังจากนั้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นขณะเดียวกันสารละลายแสดงคุณสมบัติเป็น mutarotation ในทางที่สูงขึ้นด้วย

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสมีทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ (ดวงพร, 2530) โดยแบคทีเรียที่สามารถที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas stutzeri*, *Clostridium acetobutylicum* และอื่นๆ อีก โดยเฉพาะพวก *Bacillus* sp. ซึ่งมีถึง 32 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างอะไมเลสได้ สำหรับพวกแอคติโนมัยซิสมีหลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *Streptomyces aureofaciens*, *Thermoactinomyces vulgaris* เป็นต้น

ยีสต์ที่รู้จักกันดีคือ *Endomycopsis fibuligera* นอกจากนี้ก็มี *E. hordei*, *E. capsurasis*, *Trichosporon variable*, *Candida* sp., *Pichia* sp. และ *Saccharomyces diastaticus* เป็นต้น

เชื้อรา เป็นที่ทราบกันดีว่ามีเชื้อราหลายชนิดที่ย่อยแป้งได้ดี เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus oryzae* ส่วนราที่อยู่ในกลุ่ม mucoraceous ได้แก่ *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *M. rouxii*, *Amylomyces rouxii* ส่วนราอื่นๆ ที่สร้าง เช่น *Penicillium* sp.

ประโยชน์ของเอนไซม์อะไมเลส (Yamamoto, 1988)

- ปี 1894 มีการนำเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ประโยชน์เป็นครั้งแรก เมื่อมีการใช้เอนไซม์อะไมเลสจาก *Aspergillus oryzae* มาย่อยแป้งสาลี (wheat bran koji) ก่อนนำไปหมักต่อยด้วยจุลินทรีย์อื่น
- ปี 1905 มีการนำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จาก *Aspergillus oryzae* มาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมในกรุงโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น
- ปี 1908 และ ปี 1915 ได้มีการจดลิขสิทธิ์ แอลฟา-อะไมเลส ที่ได้จากแบคทีเรีย
- ปี 1939 เริ่มมีการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในระดับอุตสาหกรรมเป็นครั้งแรกเพื่อใช้ในการหมักแป้งข้าวสาลี (wheat bran koji)
- ปี 1949 มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบ submerged culture เพื่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและมีการนำเอนไซม์มาใช้ในการหมักการ liquefaction ในอุตสาหกรรมฟอกย้อม

- ปี 1957 มีการนำกลูโคส-ออกซิเดส (glucose-oxidase) จาก *Penicillium* sp. มาใช้ในการวัดกลูโคสและแยกกลูโคสออกจากเชื้อจุลินทรีย์
- ปี 1959 เริ่มนำกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จาก *Rhizopus* sp. มาใช้ในการผลิต wheat bran koji และใช้แอลฟา-อะไมเลสกับกลูโคอะไมเลสในอุตสาหกรรมการผลิตเด็กซ์โทรสจากแป้ง
- ปี 1961 ใช้แอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในการผลิตเด็กซ์โทรสเพิ่มขึ้น 110,000 ตันต่อปี สี่ปีต่อมาสามารถผลิตเด็กซ์โทรสเพิ่มขึ้นเป็น 200,000 ตันต่อปี และในปีเดียวกันมีการใช้กลูโคส ไอโซเมอร์เรสผลิตกลูโคสและเด็กซ์โทรส
- ปี 1965 จนถึงปัจจุบันมีการผลิตแอลฟา-อะไมเลส จาก *Aspergillus niger* และผลิตกลูโค-ไอโซเมอร์เรสจาก *Streptomyces* ในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้วิธี submerged culture
- ปี 1976 จนถึงปัจจุบันนี้มีการผลิต immobilized glucose isomerase ขายในตลาด

ไลเปส (Lipase) มีชื่ออีกชื่อหนึ่งว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) หรือ เอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (Acylglycerol hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ได้ กลีเซอรอล (Glycerol) กรดไขมัน (Fatty acid) และ Partial glycerides โดยที่ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (Ester bonds) ที่พันธะระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ Oil-water interface (Jensen, 1983 และ Macrae, 1983) ดังนั้นไลเปสจึงไม่ใช่เอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) และ Cholesterol ester ถึงแม้ว่าจะมีไลเปสบางตัวที่สามารถไฮโดรไลซ์ฟอสโฟลิปิด และคลอเรสเตอรอลได้

ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ละชนิดผลิตไลเปสที่มีสมบัติแตกต่างกัน จุลินทรีย์บางพวกจะผลิตอัลคาไลน์ไลเปส (Alkaline lipase) เช่น *Alcaligenes* sp. No 679 (Kokusho, Machida และ Iwasaki, 1982) บางพวกจะผลิตนิวทรัลไลเปส (Neutral lipase) เช่น *Chromobacterium* sp. (Yamaguchi และคณะ, 1973) และบางพวกก็จะผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงได้ (Thermostable lipase) เช่น *Humicola lanuginosa* (Omar, Nishio และ Nagai, 1978) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถผลิตไลเปสได้หลายชนิดที่มีสมบัติแตกต่างกัน เช่น *Saccharomyces lipolytica* สามารถผลิตไลเปส I ที่มี Optimum pH ที่ 8.2 และไลเปส II ที่มี Optimum pH ที่ 8.0 (Ota และคณะ, 1982) เชื้อรา *Rhizopus delemar* ก็สามารถผลิตไลเปสได้ 3 ชนิด คือ A B และ C ที่มีสมบัติแตกต่างกัน และพบว่าไลเปส B และ C ก็สามารถเปลี่ยนแปลงกลับไป

มาระหว่างกันได้ด้วย (Iwai และ Tsujisaka, 1974) และการที่จุลินทรีย์ผลิตไลเปสที่มีสมบัติแตกต่างกันนี้เอง ทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย

เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส โดยทั่วไปเป็นเอนไซม์ผสม ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน ได้แก่

1. Endoglucanase (1,4- β -D-glucan glucanohydrolase, E.C.3.2.1.4) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสอย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ เซลโลไบโอส และกลูโคส
2. Exoglucanase (1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, E.C.3.2.1.91) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถสลายสายโพลีเมอร์ของเซลลูโลสตรงส่วนที่เป็น non-reducing ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอส
3. β -glucosidase (β -D-glucosidase glucosylhydrolase, E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถสลายเซลโลไบโอสและเซลโลเตทราแซคคาไรด์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น β -glucose

คุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์เซลลูเลส (ปราณี, 2534)

1. มีมวลโมเลกุลโดยเฉลี่ย 63,000
2. เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH ที่ 5.5-6.0
3. เสถียรที่ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที pH 5.5-6.0
4. ถูกยับยั้งด้วยไอออนของโลหะหนัก, -SH reagent, oxidizing-reducing agent และโดยผลิตภัณฑ์คือกลูโคส
5. วัดกิจกรรมของเอนไซม์จากการวัดหมู่รีดิวซ์ที่เกิด นิยมใช้ซับสเตรทที่ละลายน้ำได้ดี คือ ซับสเตรทสังเคราะห์ เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

ตารางที่ 3 แสดงสกุลของจุลินทรีย์บางชนิดที่ย่อยสลายเซลลูโลส

รา	แบคทีเรีย	แอคติโนมัยซีต
<i>Aternaria</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Coprinus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptosporangium</i>
<i>Fomes</i>	<i>Cytophaga</i>	
<i>Fusarium</i>	<i>Polyangium</i>	
<i>Myrothecium</i>	<i>Pseudomonas</i>	
<i>Penicillium</i>	<i>Sporocytophaga</i>	
<i>Ployporus</i>	<i>Vibrio</i>	
<i>Rhizoctonia</i>		
<i>Rhizopus</i>		
<i>Trametes</i>		
<i>Trichoderma</i>		
<i>Trichothecium</i>		
<i>Verticillium</i>		
<i>Zygorhynchus</i>		

ที่มา : บัญญัติ, 2532

สำหรับกาย่อยสลายเซลลูโลสในสภาวะที่มีออกซิเจน ผลผลิตที่ได้จะเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และคาร์บอนที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ ส่วนการย่อยสลายเซลลูโลสในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะให้ผลผลิตแตกต่างกันไปในจุลินทรีย์แต่ละชนิด เช่น *Clostridium dissolvens* จะให้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอธิลแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดบิวทิริก ส่วน *Bacteroid succinogenes* จะให้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก และกรดซักซินิก (บัญญัติ, 2532)

การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่จะศึกษาในฟังไจ ฟังไจจะผลิตเอนไซม์ extracellular endoglucanase และ cellobiohydrolase (exoglucanase) ซึ่งเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเซลโลไบโอสและเซลโลไบโอสจะเปลี่ยนเป็น β -glucose โดย β -glucosidase ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้จะพบในฟังไจพวก *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *T. koningii* และ *Talaromyces emersonnii*

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสระหว่างฟังไจและแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียจะขาดกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิด แต่อย่างไรก็ตามเซลลูเลสไม่จำเป็นต้องมีคุณสมบัติครบ *Cellulomonas* sp. เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียพวก *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* และ *Thermomonospora* สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้

ในเชิงการค้าเซลลูเลสที่ผลิตได้ส่วนใหญ่มาจากเชื้อ *Trichoderma* species นอกจากนี้ยังมาจากเชื้อ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Basidiomycetes* ในระดับอุตสาหกรรม ได้มีการนำราที่สามารถผลิตเซลลูเลสมาใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อีก เช่น การผลิตน้ำผลไม้ การผลิตผงซักฟอก เป็นต้น ในเชิงเกษตรกรรมได้มีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ใช้ในการทำอาหารสัตว์ โดยจะเพิ่มคุณค่าทางอาหารและทำให้สัตว์ย่อยอาหารได้ดีขึ้น (Drauz and Waldmann, 1995)

น้อย (2530) ได้นำตัวอย่างดินและอินทรีย์วัตถุที่ถูกทับถมจำนวน 125 ตัวอย่าง มาทำการแยกเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้เชื้อราทั้งหมด 470 ไอโซเลต ในอาหารที่มี walseth cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเพียง 80 ไอโซเลต ที่เกิดโซนไฮรอปโคโลนีมากกว่า 15 มิลลิเมตร ในสัปดาห์ที่ 3 การคัดเลือกชั้นที่สอง พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายกระดาษกรอง คือ สายพันธุ์ FKN 125, FKB 350 และ FKC 445 โดยที่สายพันธุ์ FKN 125 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายกระดาษกรอง

พรเทพ (2537) ได้ทำการแยกเชื้อราจากดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษต้น และใบป่านศรนารายณ์ และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมทำเชื้อเพลิง ได้เชื้อราทั้งสิ้น 99 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มีเพียง 52 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดให้ค่า Filter paper activity (Fpase) เท่ากับ 0.274 ญูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อรานี้ คือ *Acrophialophora* sp. ที่แยกได้พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 5.00 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมี microcrystalline cellulose ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้ค่า FPase และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 1.26 และ 1.66 เท่า ตามลำดับ และเมื่อทำการผลิตเอนไซม์ในถังหมัก 5 ลิตร พบว่าการผลิตในภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ให้ค่า FPase และ CMCase สูงกว่าการผลิตในภาวะที่มีการควบคุม pH ให้เป็น 5.00 ประมาณ 1.03 และ 1.10 เท่า ตามลำดับ

Prasertsan et al. (1992) ได้ทำการแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากตัวอย่างที่เก็บมาจากกาบของต้นปาล์มได้ 34 ชนิด แต่พบว่ามี 13 ชนิด ที่สามารถย่อยสลายกระดาษกรองได้ดีภายใน 14 วัน เมื่อเทียบกับราที่เป็นตัวเปรียบเทียบ แต่มีเพียง 8 ชนิด ที่พบโซนไฮรอปโคโลนี

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร เมื่อวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสพบว่ามีเพียง 3 ชนิด ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่เมื่อใช้กากของต้นปาล์มแห้งบดเป็นผงเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีเพียง 1 ชนิด เท่านั้น ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มีประสิทธิภาพเหมือนกันทั้ง 2 แหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่าฟังไจจะเจริญได้ดีในอาหารที่ประกอบด้วยฟีน 40 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรท 0.02 เปอร์เซ็นต์, โปรทีโอสเปปตอน 0.025 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่นำไปละลายในน้ำมันปาล์ม pH 5.5

Enokibara *et al.* (1992) พบว่า *Favolus arcularius* สามารถผลิตเอนไซม์ carboxymethyl-cellulose hydrolyzing (CMCase) ในอาหารที่ทำจากเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase III สามารถแยก CMCase ได้เป็น 3 ประเภท คือ CMCase I, CMCase II และ CMCase III พบว่าสามารถผลิต CMCase III ได้มากที่สุด และเมื่อนำมาทดสอบหาโมเลกุลด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามีโมเลกุลประมาณ 28,000 ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้สามารถย่อย cellooligosaccharide ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและเซลโลไบโอส

รัฐพล (2542) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนจากดินตามแหล่งต่างๆ โดยนำตัวอย่างดินมาทำ pour plate บนอาหารแชนนูเทรียนต์ (NA) แล้วนำไปเลี้ยงที่ 45 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทดสอบว่าเป็นแบคทีเรียทนร้อนหรือเป็นแบคทีเรียที่เจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวนูเทรียนต์ (NB) ที่อุณหภูมิ 20, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี drop plate และวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบกัน พบแบคทีเรียทนร้อน 33 ไอโซเลต โดยพบว่ามีเชื้อเจริญในช่วง 20-45 องศาเซลเซียส อยู่ 9 ไอโซเลต และเจริญช่วง 20-55 องศาเซลเซียส อยู่ 24 ไอโซเลต และจากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยเลี้ยงเชื้อที่แยกได้บนอาหารแข็งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส แล้วทดสอบด้วยสีกองโกเรด เพื่อดูโซนไฮโดรไลซิส พบว่ามี 19 ไอโซเลต ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ เมื่อนำทั้ง 19 ไอโซเลต มาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือแบคทีเรียหมายเลข 19 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 22.67 mUnit และค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.165 unit/mg protein

Horikoshi *et al.* (1984) สามารถแยกเชื้อ *Bacillus* sp. No. N-4 ซึ่งเป็น cellulytic alkalophilic จากดิน และพบว่ามีลักษณะคล้ายกับ *Bacillus pasteurii* แต่พบว่าเชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่พีเอชสูง ซึ่งไอโซเลตนี้สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชระหว่าง 8-11 และพบว่าให้ผลผลิตที่ดีคือให้กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ดี และพบว่าอัลคาไลน์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส มี 2 ชนิด คือ E1 และ E2 มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 10 โดย E2 จะเสถียรที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และ E1

จะเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด นี้สามารถย่อยเซลโลเตตระไอสและให้เซลโลไบโอส

ธงชัยและคณะ (2532) ศึกษาเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ FKN125 ซึ่งจำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus fumigatus* FKN125 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยกระดาษกรองได้ดีที่สุด โดย crude cellulase มีความสามารถสูงที่สุดในการย่อยสลายกระดาษกรองและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่ 65 องศาเซลเซียส และ pH 3.6-4.6 เอนไซม์นี้สามารถรักษาความคงตัวในการย่อยสลายวัสดุได้ดีมากที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ที่พีเอช 3.0-7.0

วิไลวรรณและอมรรัตน์ (2533) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 62 ชนิด จากตัวอย่าง 13 ประเภท และทำการทดสอบหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีการย้อมสีคองโก เรด ในวุ้นและโดยวิธีหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า มีจุลินทรีย์ 28 ชนิด ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้และในจำนวนนี้มีอยู่ 3 ชนิด ที่ผลิตเอนไซม์ที่มีแอกติวิตีสูง โดยเมื่อทดสอบประเภทจุลินทรีย์พบว่า L91 คือ *Candida tropicalis*, A4 คือ *Trichosporon* sp. และ J5 คือ *Aspergillus niger*

Kitpaisarn (1984) สามารถแยกฟังไจที่สลายเซลลูโลสจาก *Pleurotus cystidiosus* และ *Agaricus bisporus* ได้จำนวน 30 ไอโซเลต และนำมาทดสอบแอกติวิตีในการย่อยสลายเซลลูโลสพบว่าไอโซเลตที่ 27B ซึ่งจำแนกว่าเป็นเชื้อ *Humicola* sp. ให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงบนรำข้าว ข้าวและซีเลื่อย พบว่ารำข้าวให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดโดยเกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 8 วัน ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเกิดแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

Li and Gao (1996) ได้แยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากดินพบเชื้อ *Streptomyces* sp. ซึ่งเป็น aerobic gram-positive และสลาย crystalline cellulose ได้อย่างสมบูรณ์ โดยเมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ β -cellulose, Avicel, Whatman CF11 หรือ CMC พบว่าเชื้อตัวนี้สามารถผลิต Endo-cellulase activity ที่แตกต่างกันไปตามชนิดของแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้สายพันธุ์นี้ยังสามารถผลิต FPase, β -glucanase และ short fiber generating activity ได้ด้วย

การนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์

1. อุตสาหกรรมผงซักฟอก เซลลูเลสจะไปทำให้เจลลี่ที่อยู่ในสภาพแข็งตัวอ่อนลงปล่อยให้สิ่งสกปรกหลุดออกมา และเอนไซม์เซลลูเลสนี้มีลักษณะที่เฉพาะมาก คือ ทำงานกับส่วนเจลลี่ของเส้นใยเท่านั้นซึ่งเจลลี่จะเป็นแหล่งเก็บกักสิ่งสกปรกเอาไว้ นอกจากนี้เซลลูเลสยังไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อผ้าทำให้เซลลูโลสในผ้าไม่ถูกย่อย ที่สำคัญที่สุด คือ ไม่เป็นอันตรายต่อมือเวลาซักเพราะเซลลูเลสไม่สามารถย่อยผิวหนังของมนุษย์ได้ (วีระสิทธิ์, 2533)

2. อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เนื่องจากอาหารสัตว์มีส่วนผสมของสารพวกเยื่อใยที่สัตว์ไม่สามารถย่อยได้ ซึ่งสารเหล่านี้มีผลไปรบกวนการย่อยสลายการดูดซึมของสารอาหารชนิดอื่นๆ ด้วย จึงได้ใช้เอนไซม์เซลลูเลสผสมในอาหารสัตว์เพื่อย่อยสลายสารเยื่อใยในลำไส้ ทำให้สารเยื่อใยมีคุณค่าทางอาหารมากขึ้น เนื่องจากสารเยื่อใยมักจะไปเกาะยึดกับสารอาหาร 2 ตัว คือ โปรตีนและไขมัน รวมทั้งเอนไซม์ที่ย่อยอาหารด้วยซึ่งจะทำให้อาหารเหล่านี้ใช้ประโยชน์ไม่ได้ การย่อยสารเยื่อใยจะทำให้สารอาหารพวกโปรตีนและไขมันสามารถถูกย่อยและดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้เพิ่มขึ้น (นวลจันทร์, 2534)

3. อุตสาหกรรมน้ำผลไม้ เซลลูเลสใช้ในการเพิ่มผลผลิตของน้ำผลไม้โดยมีผลทำให้สกัดน้ำผลไม้ได้ง่ายขึ้น รวมทั้งลดความหนืดของน้ำผลไม้ด้วย (ประพันธ์, 2534)

4. ใช้ในการป้องกันสิ่งแวดลอม เซลลูเลสช่วยในการย่อยสลายขยะทั้งที่เกิดจากพวกเซลลูโลสและเส้นใยหรือกระดาษที่ลอยอยู่บนผิวน้ำของของเหลวซึ่งจะเป็นตัวขัดขวางการหมัก และทำให้การทำความสะอาดเป็นไปได้ง่ายขึ้นซึ่งเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้ของแข็งและของเหลวยังสามารถถูกแยกจากกันได้อย่างรวดเร็ว ขยะก็จะลดลงและยังทำให้สามารถวางแผนแก้ปัญหาโดยการขยายกำลังการผลิตได้ด้วย (นิตยา, 2539)

5. ใช้ในการตกแต่งผ้าใยเซลลูโลส ซึ่งจะให้ผลการต้านการเกิดขนและเม็ดขนดี ผ้าเรียบและนุ่มขึ้น ผ้ามีความเป็นเงามันและมีสีสันสดใสขึ้น (กำจร, 2541)

ไซแลนเนส (xylanase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม glycanhydrolases ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท

1. Endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylanase หรือเรียกว่า β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylan xylanohydrolase [EC3.2.1.8] การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ประเภทนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับไซแลนแบบไม่เฉพาะเจาะจงในพันธะของไซแลนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จำนวนมาก

2. Exo-(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylanase หรือเรียกว่า β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylan xylohydrolase เอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะ β -(1 $\rightarrow$ 4) จากปลาย non reducing end แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียว

3. β -xylosidase หรือ xylobiase [EC 3.2.1.37] เอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไดแซคคาไรด์ เช่น ไซโลไบโอส (xylobiose) และสามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ให้มีขนาดเล็กลงได้

เอนไซม์ไซแลนเนส พบได้ทั่วไปในพวกโปรคาริโอต (prokaryote) และ ยูคาริโอต (eukaryote) ในยูคาริโอตจะพบเอนไซม์ได้ในโปรโตซัว แมลง หอย และเมล็ดธัญพืชที่กำลังงอก สำหรับในโปรคาริโอตจะพบในแบคทีเรีย ไชยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) จากทะเล และแอคติโนมัยซีส (actinomycetes) เอนไซม์ไซแลนเนสมีทั้ง intracellular enzyme และ extracellular enzyme โดย intracellular enzyme จะพบในแบคทีเรียลำไส้และโปรโตซัว ส่วน extracellular enzyme พบว่าสามารถผลิตได้โดยเชื้อราในลำไส้แกะ (ชลธิชา, 2542)

เอนไซม์ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ตั้งอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยเอนไซม์ที่สามารถฟอกสีเยื่อกระดาษมีทั้งเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้โดยตรง คือ เอนไซม์ลิกนินเนส (ligninase) และเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นสารที่เชื่อมต่อระหว่างเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งเมื่อย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสแล้วจะช่วยให้ลิกนินหลุดออกมาด้วย ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เช่น เอนไซม์ไซแลนเนส และเอนไซม์แมนเนส นอกจากนี้เอนไซม์ไซแลนเนสยังนำมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายของเหลือทิ้งจากการเกษตร โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ พอลิโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ได้แก่ ไกลโคไบโอส (xylobiose) ไกลโคไตรโอส (xylotriose) น้ำตาลไซโลส (D-xylose) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นสารให้ความหวาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลไซโลส ยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมในการผลิตไซลิทอล (xylitol) ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์มาก โดยใช้เป็นสารที่ให้ความหวานที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้เอนไซม์ไซแลนเนสยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้อีกด้วย เนื่องจากสามารถย่อยสลายผนังเซลล์พืชได้ ทำให้สัตว์สามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น และในอนาคตคาดว่าจะมีการพัฒนานำเอนไซม์ไซแลนเนสไปใช้ในการทำโปรโตพลาส (protoplast) ของพืช โดยช่วยทำให้ผนังเซลล์พืชบางลง และในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ซึ่งใช้เอนไซม์ไซแลนเนสเพื่อช่วยทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น (ชลธิชา, 2542)

ในการย่อยสลายสารต่างๆ นั้นโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบต่างๆ จะมีผลอย่างยิ่งในการย่อยสลาย ถ้าเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีที่จำเพาะและซับซ้อนก็จะทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ยาก เช่น สารประกอบที่เป็นพวกฮาโลเจน (Halogen) สารประกอบที่มีหมู่ฮาโลเจนประกอบอยู่มาก (Large number of halogens) สารประกอบที่ละลายน้ำได้น้อย (Low solubility in water) สารประกอบที่มีหลายพันธะ (Highly branched compound) และสารประกอบที่มีประจุแตกต่างกัน (Atomic charge difference)

ภาวะแวดล้อมจะมีผลโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยถ้าระดับพีเอช อุณหภูมิ ความเค็ม ตลอดจนสารเคมีต่าง ๆ อยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมแล้วการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ก็จะไม่ดีเท่าที่ควร และอาจทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายได้ Zaidi, Murakami และ

Alexander (1988) ศึกษาพบว่าในแหล่งน้ำที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ต่ำเกินไป จะมีผลต่อการย่อยสลายของสารอินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะไม่สามารถแบ่งตัวแบบทวีคูณได้ สารประกอบที่มีอยู่ไม่ถูกย่อยสลายจึงทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายในที่สุด ในทางตรงข้ามถ้ามีปริมาณสารอินทรีย์อยู่มากเกินไปก็จะสามารถยับยั้งการย่อยสลายได้ ในภาวะนี้จะมีการสร้างสารที่เป็นพิษต่อการเจริญทำให้จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ลดลง

ขบวนการย่อยสลายในทางชีวภาพจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกลุ่มจุลินทรีย์ต่างๆ ที่ปะปนกัน อัตราการเจริญและการย่อยสลายสารต่าง ๆ จะมีเปอร์เซ็นต์ความถี่สูงขึ้นเมื่อใช้จุลินทรีย์หลายชนิดผสมกัน จุลินทรีย์ชนิดแรกสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นได้ ให้ผลผลิตเป็นสารที่ถูกย่อยเกิดขึ้น แล้วมีจุลินทรีย์ชนิดที่สองสามารถย่อยสลายสารที่เกิดขึ้นต่อไปได้ จึงเป็นการเกี่ยวข้องกันทางเมตาบอลิซึม (Metabolism) ที่เรียกว่า โคเมตาบอลิซึม (Cometabolism) ทำให้การย่อยสลายสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ในการย่อยสลายสารนั้นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ Autotrophic microorganism และ Heterotrophic microorganism การที่จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มาอยู่ร่วมกันนั้น จะมีการย่อยสลายสารต่างๆ แล้วสร้างเป็นกรดอะมิโน เปปไทด์ น้ำตาล โพลีแอลกอฮอล์ วิตามิน เอนไซม์ สารควบคุมการเจริญ (Growth factor) สารปฏิชีวนะและสารพิษ (Toxin) (Murakami และ Alexander, 1989) ซึ่งจะมีผลช่วยกระตุ้นให้การย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้นหรือไม่ก็ยับยั้งการย่อยสลาย (Lewis, Hodson และ Freeman, 1984)

ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมจะมีผลโดยตรงต่อปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในกลุ่มของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอาหาร และการขนส่งมวลสาร (Wiggins และ Alexander, 1988) ช่วงระยะเวลา Lag phase ในการย่อยสลายสารต่างๆ จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร โคแฟกเตอร์ และสารอาหารที่จำเป็น เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (Lewis, Kollig และ Hodson, 1986) ดังนั้นการเติมสารอินทรีย์บางชนิดลงไปจะทำให้เกิดการย่อยสลายได้ดีขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จะมีความต้องการสารอินทรีย์ในการย่อยสลายสารที่ย่อยได้ยาก (Xenobiotic) แตกต่างกัน (Swindoll, Aelion และ Pfaender, 1988)

Steffensen และ Alexander (1995) ได้รายงานว่าการย่อยสลายของจุลินทรีย์เกิดได้ช้าเนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการสารบางอย่างในการเจริญ โดยทำการทดลองใช้ *Pseudomonas putida* ย่อยสลาย Benzylamine และ Caprolactum การย่อยสลายจะเกิดได้ไม่ดีนัก แต่เมื่อเติมฟอสฟอรัสลงไปการย่อยสลายจะเกิดอย่างรวดเร็ว เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ร่วมด้วยโดยไม่ใส่ฟอสฟอรัส ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย Benzylamine ก็จะไม่ดีเหมือนกับการเติมฟอสฟอรัสลงไปด้วย แสดงให้เห็นว่า *P. aeruginosa* มีส่วนช่วยทำให้การย่อยสลาย Benzylamine ดีขึ้น

Murakami และ Alexander (1989) ได้ทดลองเลี้ยง *Pseudomonas* sp. 2 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญใน Phenol หรือ p-Nitrophenol (PNP) *Pseudomonas* sp. PN101 จะย่อยสลาย PNP ให้ NO_2^- และ phenol แต่ไม่ย่อยสลาย phenol ส่วนเชื้ออีกสายพันธุ์คือ *Pseudomonas* sp. PN111 จะย่อยสลาย phenol แต่ไม่ย่อยสลาย PNP เมื่อระดับ phenol เพิ่มขึ้น *Pseudomonas* sp. PN111 ก็ จะทำการย่อยสลายต่อไป จึงเป็นการควบคุมระดับของ Phenol ไม่ให้เป็นอันตรายต่อ *Pseudomonas* sp. PN101

ได้มีการพัฒนาการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน สารย่อยสลายยาก (Recalcitrance) สารสังเคราะห์ เช่น โพลีไวนิล คลอไรด์ (polyvinyl chloride), ไนลอน (nylon), โพลีไดคลอโรสไตรีน (polydichlorostyrene) และโพลียูรีเทน (polyurethane) รวมทั้งยาปราบศัตรูพืช เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียวไม่สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ จึงได้ปรับปรุงวิธีการและเพิ่มจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์เพื่อทำให้การย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้น (Perry, 1979)

Grbic-Galic และ Vogel (1987) ได้ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างมีเทน (Mixed methanogenic cultures) ในการย่อยสลายไทลูอินและเบนซีนในสภาพไร้อากาศ (Anaerobe) ภายในเวลา 60 วัน จะเกิดการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างมีเทนมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์

Pedro, Alvarez และ Timothy (1991) ได้เปรียบเทียบการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว (Pure culture) กับการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ (Mixed culture) ที่แยกได้จากน้ำมันและฟีนอล พบว่าการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถย่อยสลายเบนซีน ไทลูอิน และไซลีน ได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียว

ในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมักใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ในการย่อยสลาย เพราะจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายสารได้ต่างกัน ดังนั้นการนำเอาจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเสียในน้ำดีขึ้น จุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำจะย่อยสลายสารอินทรีย์โดยมันจะสร้างเอนไซม์แล้วปล่อยออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ เอนไซม์ที่สำคัญมีหลายชนิด เช่น อะไมเลส (amylase), กลูโคส ไอโซเมอเรส (glucose isomerase), โปรตีเอส (protease) เพคตินเนส (pectinase), กลูโคส ออกซิเดส (glucose oxidase) และไลเปส (lipase) แหล่งในการสร้างเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเป็นรา และ *Bacillus* sp. โดยเฉพาะ *Bacillus* sp. จะพบในน้ำทะเล น้ำจืด หรือในดินตะกอน มันจะสร้างเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในการที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ รวมทั้งอุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสีย

การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน

จากเกิดปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันในสิ่งแวดล้อมแหล่งต่าง ๆ จึงได้มีการศึกษาวิจัย เพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันมาใช้ในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นโดย เน้นศึกษาในรูปของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในน้ำมันและมีความซับซ้อนของโครงสร้าง สูง มีการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยในหัวข้อที่เกี่ยวข้องในทุก ๆ ด้านโดยเริ่มตั้งแต่การศึกษาถึงองค์ประกอบและโครงสร้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการย่อยสลายจนถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ เพื่อปรับปรุงสภาวะแวดล้อมของจุลินทรีย์ให้สามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้สูงขึ้น รวมทั้งการศึกษาเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) มีชื่อตามระบบว่ากลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัสคือ E.C.3.1.1.3 ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของน้ำมันหรือไขมันได้กรดไขมันและกลีเซอรอล และสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) จากกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับ หรือแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่างๆ (transesterification) โดยทั่วไปไลเปสพบในคนและ สัตว์ซึ่งเกี่ยวกับกระบวนการย่อยอาหาร สำหรับปัจจุบันมีการสกัดไลเปสจากจุลินทรีย์และผลิตจำหน่ายและพบลักษณะปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสนี้ใน 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ ทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ (non-specific lipase) และทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะที่พันธะเอสเทอร์ตำแหน่ง 1,3(1,3-specific lipase) (ปราณี, 2543)

1. สารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon compound) (เพิ่มศักดิ์, 2550)

สารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลประกอบด้วยธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้นที่เรียกว่า สารประกอบไฮโดรคาร์บอน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโมเลกุลประกอบด้วยพันธะเดี่ยวระหว่างคาร์บอน-คาร์บอนเพียงอย่างเดียว เรียกว่า ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว ส่วนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโมเลกุลมีพันธะคู่ หรือพันธะสามระหว่างคาร์บอน-คาร์บอนรวมอยู่ด้วย เรียกว่า ไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว (unsaturated hydrocarbon)

โมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อะตอมของคาร์บอนต่อกันเป็นสายยาวหรือต่อกันเป็นโซ่ตรง (straight chain) หรือต่อกันเป็นสายยาวที่มีกิ่งสาขาแยกออกจากโซ่ตรง(branch chain) โดยไม่มีวงของคาร์บอนในโมเลกุลนั้นเลยเรียกว่า อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) หรือแบบโซ่เปิด โมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อะตอมของคาร์บอนต่อกันเป็นวง และอาจจะมีกิ่งแยกออกจากวงของคาร์บอน เรียกโมเลกุลประเภทนี้ว่าไฮโดรคาร์บอนแบบโซ่

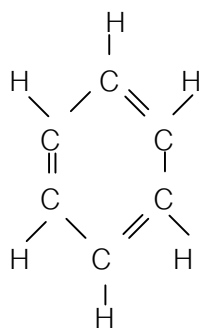
ปิด หรือ อะลิไซคลิกไฮโดรคาร์บอน (alicyclic hydrocarbon) และโมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีวงแหวนของเบนซีนเป็นโครงสร้างหลักเรียกว่า อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon)

น้ำมันเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ที่มีความซับซ้อนและมีองค์ประกอบเป็นสารต่างๆกว่า 100 ชนิด ซึ่งสามารถแยกได้โดย Silica gel chromatography ได้เป็นสารประกอบประเภทอิ่มตัวได้แก่ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นกิ่งก้าน(aliphatic) และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นวง(aromatic) หรือสารประกอบประเภท asphaltic ซึ่งได้มีการศึกษาต่อมาถึงการย่อยสลายของสารประกอบดังกล่าว (Brown *et al.*, 1969)

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสารประกอบอิ่มตัวได้แก่ n-alkanes, branch alkanes และ cycloalkanes (naphthenes) n-alkanes ถูกย่อยสลายได้ง่ายที่สุดจากการทำปฏิกิริยาบริเวณปลายที่เป็น primary alcohol, aldehyde และ monocarboxylic acid ในการย่อยสลายของ carboxylic acid ในกระบวนการ β - oxidation จะได้ผลผลิต 2 ชนิด คือ shorter fatty acid และ acetyl coenzyme A ซึ่ง fatty acid ที่เกิดขึ้นนี้พบว่าเป็นตัวที่ทำให้เกิดเป็นพิษตกค้างหลังจากที่เกิดการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Atras and Bartha, 1973)

2. เบนซีน (Benzene) และอนุพันธ์ของเบนซีน (มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550)

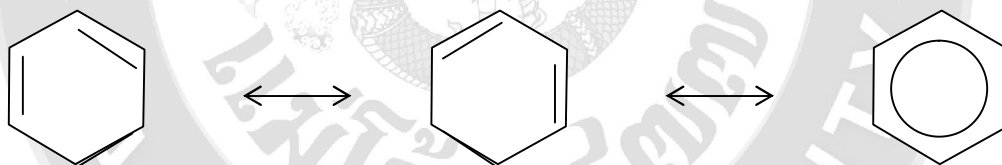
ในปี ค.ศ. 1825 Michael Faraday ได้แยกสารตัวอย่างออกจากก๊าซที่ได้จากการจุดไฟให้แสงสว่าง ต่อมาเรียกว่า เบนซีน เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้จากการกลั่นกรดเบนโซอิกกับแคลเซียมออกไซด์ นับเป็นตัวอย่างของสารอะโรมาติกตัวแรก ต่อมาในปี ค.ศ. 1834 ได้ค้นพบสูตรโมเลกุลของ เบนซีนเป็น C_6H_6 จากสูตรนี้แสดงให้เห็นว่า เบนซีนเป็นสารประกอบไม่อิ่มตัว แต่ในขณะนั้นไม่มีใครเสนอสูตรโครงสร้างที่แท้จริงของเบนซีนว่าเป็นอย่างไร จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1865 Kekulé ได้พยายามค้นคว้าและเสนอสูตรโครงสร้างของเบนซีน โดยตั้งสมมติฐานว่า เบนซีนต้องประกอบด้วยวงรูปหกเหลี่ยมที่แบนราบมีคาร์บอน 6 อะตอมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวและคาร์บอนแต่ละอะตอมต่างก็สร้างพันธะกับไฮโดรเจน 1 อะตอม ดังภาพ 1



ภาพที่ 1 แสดงการค้นคว้าและเสนอสูตรโครงสร้างของเบนซีน

ที่มา: มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550

จากการศึกษาโครงสร้างของเบนซีนพบว่า ความยาวพันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมทุกพันธะมีความยาวเท่ากันคือ $1.39 \text{ \AA}$ ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมพันธะคู่ ($1.34 \text{ \AA}$) และพันธะสาม ($1.54 \text{ \AA}$) นั้นหมายความว่าพันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลของเบนซีนไม่ได้เป็นพันธะเดี่ยวหรือพันธะคู่อย่างใดอย่างหนึ่ง แต่ประกอบด้วยพันธะคู่ที่มีการเคลื่อนที่ไปรอบวงจริง และจากการวัดมุมระหว่างพันธะของคาร์บอนแต่ละอะตอมเป็น 120° นักวิทยาศาสตร์เรียกปรากฏการณ์ทำนองนี้ว่า เรโซแนนซ์ (resonance) หมายถึงปรากฏการณ์ที่ไม่สามารถแสดงสูตรโครงสร้างที่แท้จริงของสารได้ ดังนั้นจึงเขียนสูตรโครงสร้างอย่างย่อของเบนซีนได้ดังนี้



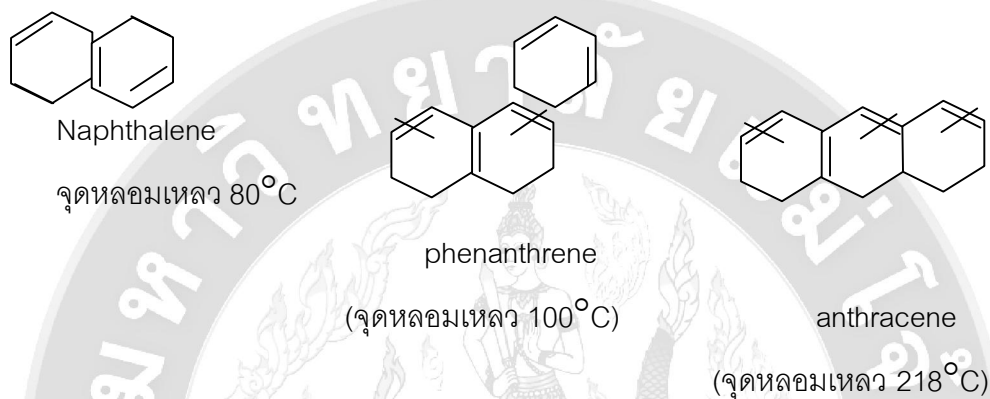
ภาพที่ 2 แสดงการเขียนสูตรโครงสร้างอย่างย่อของเบนซีน

ที่มา: มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550

อนุพันธ์ของเบนซีน เกิดจากไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุลของเบนซีนถูกแทนที่ด้วยธาตุใดธาตุหนึ่ง หรือหมู่ธาตุใดหมู่ธาตุหนึ่ง สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เป็นอนุพันธ์ของเบนซีนจึงมีอยู่มากมายและการเรียกชื่อ IUPAC ของอนุพันธ์เหล่านี้จะอ่านโดยใช้เบนซีนเป็นชื่อหลักดังต่อไปนี้

ถ้าเบนซีนมีหมู่แทนที่เพียงหมู่เดียวให้อ่านหมู่แทนที่ แล้วตามด้วยชื่อหลักเบนซีน สารประกอบเหล่านี้โดยมากมีชื่อสามัญ และบางครั้งชื่อสามัญมักนิยมเรียกมากกว่าชื่อ IUPAC เช่น ถ้าหมู่ที่ต่อกับเบนซีนเป็นหมู่ที่ซับซ้อนมาก ๆ อาจจะเรียกชื่อเป็นสารประกอบของแอลเคน หรือแอลคีน หรืออื่น ๆ แล้วเรียกเบนซีนเป็นหมู่แทนที่เป็นหมู่ฟีนิล (phenyl group)

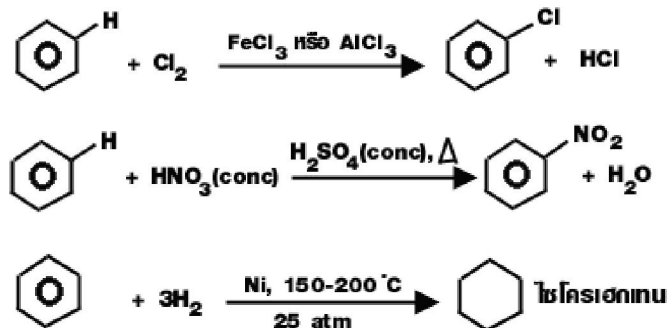
การระบุตำแหน่งทั้งสองที่หมู่เอทิลแทนที่อยู่อาจจะระบุเป็นตัวเลขก็ได้ หรือที่สะดวกและนิยมมากกว่าคือใช้คำนำหน้าว่า *ortho* – สำหรับตำแหน่ง 1, 2 *meta* – สำหรับตำแหน่ง 1, 3 และ *para* – สำหรับตำแหน่ง 1, 4 โดยมักใช้เป็นตัวย่อ *o* – *m* – และ *p* – แทน *ortho* – *meta* – และ *para* – ตามลำดับ แต่ถ้ามีหมู่แทนที่มากกว่า 2 หมู่ขึ้นไปจะระบุตำแหน่งที่แทนที่ด้วยตัวเลขอย่างปกติ เช่น ถ้ามีวงอะโรมาติกมาเชื่อมต่อกัน โดยมีด้านใดด้านหนึ่งร่วมกัน เรียกว่าพอลินิวเคลียร์อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (polynuclear aromatic hydrocarbon) เช่น



ภาพที่ 3 แสดงการเชื่อมต่อกันของวงอะโรมาติก

ที่มา: มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550

สมบัติของเบนซีน เป็นของเหลวไม่นำไฟฟ้า ติดไฟ ให้เปลวไฟสว่าง มีเขม่ามาก เกิดปฏิกิริยาคายพลังงาน ไม่ละลายน้ำ เป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะ เกิดปฏิกิริยาแทนที่ ดังนี้



ภาพที่ 4 แสดงการเกิดปฏิกิริยาแทนที่ของเบนซีน

ที่มา: มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550

3. ประโยชน์ของเบนซีนและอนุพันธ์

เบนซีนเป็นตัวทำละลายและเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบต่าง ๆ แต่การสูดดมเบนซีนในปริมาณมาก ๆ ทำให้เกิดอาการคลื่นเหียนและอาจถึงตาย เนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว นอกจากนี้ การที่ต้องสัมผัสกับเบนซีนต่อเนื่องกันนาน ๆ จะทำให้ไขอ่อนในโพรงกระดูกซึ่งทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดถูกทำลาย ดังนั้น ห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับเบนซีนจึงต้องมีระบบถ่ายเทอากาศอย่างดี และถ้าไม่จำเป็นควรใช้โหลอื่นเป็นตัวทำละลายแทน

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนประกอบด้วยสารอินทรีย์กลุ่มใหญ่และหลากหลายชนิด โดยคำจำกัดความแล้วหมายถึง สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น แต่ในความหมายที่ใช้โดยทั่วไปหมายรวมถึงสารอินทรีย์พวก heteroatoms ที่ได้จากปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์ของมันด้วย

จากการที่มีอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับปิโตรเลียม จึงจำเป็นต้องมีการติดตามตรวจสอบการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ ซึ่งโดยทั่วไปทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณของสารไฮโดรคาร์บอนโดยตรง หรือโดยตรวจหาหรือนับจำนวนของ hydrocarbon-degrading bacteria ในดินที่มีการปนเปื้อนของปิโตรเลียม เช่น การตรวจพบแบคทีเรียที่ย่อยสลายก๊าซไฮโดรคาร์บอนได้เป็นจำนวนมากในดิน บ่งชี้ว่ามีการเพิ่มขึ้นมาของก๊าซธรรมชาติ

การประเมินค่ากิจกรรมการย่อยสลาย (biodegrading activity) ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ทางตรงที่สุด ได้แก่ การวิเคราะห์ "reactant" ซึ่งได้แก่สารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนนั้น หรือวิเคราะห์หาผลผลิตสุดท้ายที่เกิด เช่น CO_2 ส่วนการตรวจสอบทางอ้อมสามารถกระทำได้โดยการตรวจนับจำนวนของจุลินทรีย์ (microbial enumeration) หรือตรวจวัด specific activity ของประชากรจุลินทรีย์ในแหล่งดินนั้น ซึ่งเป็นหลักฐานแสดงถึง biodegradation ที่เกิดขึ้นทางอ้อม

ในการวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน โดยทั่วไปต้องทำการสกัดเอาสารนั้นออกจากโครงสร้างของดิน ก่อนนำมาวิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิคทาง gas chromatography, liquid chromatography หรือ spectrophotometer ส่วนการวิเคราะห์หาผลผลิตสุดท้ายที่เกิดขึ้นเช่น CO_2 มักนิยมตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีที่คาร์บอน ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารไฮโดรคาร์บอนนั้น และตรวจวัดโดยอาศัยเครื่อง liquid scintillation counter

4. น้ำมันเครื่อง (Motor oil)

คือ น้ำมันที่ใช้สำหรับหล่อลื่นในเครื่องยนต์เกือบทุกชนิด เช่น รถยนต์ มอเตอร์ไซค์ รถบรรทุก เพื่อลดการเสียดสีและความเสียหายระหว่างลูกสูบกับผนังเครื่องยนต์ ผลิตจากน้ำมันดิบ น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วอาจปนเปื้อนด้วยองค์ประกอบทางเคมี เช่น แมกนีเซียม

ทองแดง สังกะสี และโลหะหนักชนิดอื่นๆ (โครงการเพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับสารเคมีและสิ่งแวดล้อมสำหรับเยาวชน, 2552)

องค์ประกอบของน้ำมันเครื่อง (PTT, 2008)

ลักษณะทางกายภาพ (Physical State): ของเหลว (Liquid) ลักษณะสีและกลิ่น (Appearance Color and Odor): น้ำตาล (Brown), กลิ่นน้ำมัน (Oily Odor) การละลายได้ในน้ำ (Solubility in Water): ไม่ละลายน้ำ (Insoluble) ค่าความหนืดที่ 100°C (Kinematics Viscosity @ 100°C , mm^2/s): 14.5 – 16.0 ประกอบด้วย Lubricating Oils (Petroleum), Hydrotreated neutral oil based > 30 % WT และ Distillates (Petroleum), Hydrotreat heavy paraffinic > 30 % WT และมี Additive ประมาณ 70% oils (petroleum), C 20-50 hydrotreated neutral oil-base

5. การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

จากการศึกษาของกรรณิกา, (2541) พบว่าในสภาพธรรมชาติเชื้อราที่ย่อยน้ำมันได้ในดินมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน 6-82% ของเชื้อราในดินทั้งหมด และแบคทีเรียที่ย่อยน้ำมันได้ในดินมี 0.13-50% ของแบคทีเรียในดินทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hollaway, *et. al.*, (1980) พบว่ามีแบคทีเรีย 0.003-100% ของแบคทีเรียในทะเลที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ ดังนั้น จะเห็นว่าแบคทีเรียและราแต่ละชนิดในสภาพธรรมชาติที่แตกต่างกันจะมีความสามารถในการย่อยสลายของน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ นั้นแตกต่างกันไป (รัฐพร, 2541) นอกจากรา และแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมัน ยังพบจุลินทรีย์ประเภทอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการย่อย สลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

ประเภทของจุลินทรีย์	สายพันธุ์	อ้างอิง
แบคทีเรีย (Bacteria)	<i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Nocadia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Corynebacterium</i> และกลุ่มแบคทีเรียพวก cocci	Buchanan and Gibbons, 1974
	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> sp.	ประหยัด, 2543
	<i>Bacillus thermoleovorans</i>	Tomohisa, et al., 2001
	<i>Pseudomonas putida</i> GPo1 <i>alkB</i> , <i>Acinitobacter</i> spp. <i>alkM</i> , <i>Rhodococcus</i> spp. <i>alkB1</i> , <i>Rhodococcus</i> spp. <i>alkB2</i> , <i>Pseudomonas putida</i> <i>xylE</i> , <i>Pseudomonas putida</i> <i>ndoB</i> ,	Margesin, et al. ,2003
รา (Fungi)	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> และ <i>Verticillium</i> <i>Phanerochaete</i> , <i>Pleurotus</i> และ <i>Coriolus</i>	Davie and Hughes, 1968
อื่น ๆ (Others)	สาหร่าย <i>Protheacozopi</i>	Frederric Chaillan ,et. al.,2004
	กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ จีโนส <i>Gordonia</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Burkhold</i> และ <i>Mycobacterium</i>	Frederric Chaillan ,et. al.,2004
	<i>mycobacterium fortuitum</i> Strain NF4 <i>mycobacterium ratisbonense</i> Strain SD4	Mahmoud and Alexander, 2000
	<i>mycobacterium</i> sp. Strain PYR-1 <i>nidA</i>	Margesin, et al. ,2003
	ฟังไจได้แก่ <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Amorphoteca</i> , <i>Neosartorya</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Graphium</i>	Frederric Chaillan , et. al.,2004
	เชื้อยีสต์ได้แก่ <i>Candida</i> , <i>Yarrowia</i> และ <i>Pichia</i>	Frederric Chaillan ,et. al.,2004

ในสภาพธรรมชาติน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียและราบางชนิด ที่อาศัยอยู่ทั้งในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำและสภาพแวดล้อมบก ซึ่งพบว่ามีเพียงแบคทีเรียและราบางชนิดเท่านั้นที่ย่อยสลายน้ำมันได้ จากการศึกษพบว่า เชื้อราในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันมีอยู่เพียง 6-82% ของเชื้อราในดินทั้งหมด และพบว่ามีแบคทีเรียในดิน 0.13 - 50 % ของแบคทีเรียในดินทั้งหมดที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ (กรรณิกา, 2541) ส่วนในการศึกษาของ Hollaway, et. al.,(1980) พบว่ามีแบคทีเรีย 0.003-100% ของแบคทีเรียในทะเล ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ ซึ่งแบคทีเรียและราแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการย่อยสลายของน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ นั้นแตกต่างกันไป

1. สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Nocadia*, *Streptomyces*, *Desulfovibrio*, *Corynebacterium* และกลุ่มแบคทีเรียพวก cocci (Buchanan and Gibbons, 1974)

2. ราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

ในการทำ bioremediation ของดินที่ปนเปื้อนน้ำมันพบว่า เชื้อรามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคราบน้ำมันได้ดี เนื่องจากราสามารถเจริญได้ดีบริเวณที่มี pH ต่ำและสารอาหารน้อย ๆ ในปีค.ศ. 1968 Davie and Westlake ได้ทำการแยกเชื้อ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Verticillium* ที่สามารถเจริญในน้ำมันได้ และ ได้แยกเชื้อราจุดขาว (white rot fungi) *Phanerochaete*, *Pleurotus* และ *Coriolus* ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายคราบน้ำมันได้รวดเร็วมาก

3. จุลินทรีย์อื่น ๆ ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

นอกจากแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้แล้ว สิ่งมีชีวิตอื่น เช่น สาหร่าย *Protheacozopi* และยีสต์ ก็สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เช่นกัน มีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ใช้อากาศที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนจากดินที่มีการปนเปื้อนปิโตรเลียม และ กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียจากอินโดนีเซีย พบว่ามี 33 ชนิด คือ แบคทีเรีย 8 ชนิด ฟังก์ไจ 21 ชนิด และยีสต์ 4 ชนิด และนำมาศึกษาโดยเทคนิคทางโมเลกุลและ ฟีนไทป์ สายพันธุ์ของแบคทีเรียจีโนส *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkhold* และ *Mycobacterium* ซึ่งมี 4 สายพันธุ์ถูกพบขึ้นใหม่และยังไม่มีรายงาน ส่วนฟังก์ไจได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* และ *Graphium* และเชื้อยีสต์ได้แก่ *Candida*, *Yarrowia* และ *Pichia* และพบว่าไฮโดรคาร์บอนอิมัลชันสามารถย่อยสลายได้มากที่สุด ในขณะที่ อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนย่อยสลายได้น้อยกว่า (Frederric, et. al.,2004)

แบคทีเรียรีดิคูลาในเตรท (*Pseudomonas* sp.BS2201, BS2203 และ *Brevibacillus* sp.BS2202) ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนได้ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (ทดลอง 10 วัน ในอาหารเหลว) เชื้อสามารถย่อยสลาย total extractable material (TEM) ได้ 20 - 25 % รวมไปถึง alkanes ทั้งหมด 90 - 95 % ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (ทดลอง 50 วัน) เชื้อย่อยสลาย TEM ได้ 15 - 18 % ย่อย alkanes บางตัวได้ 20 - 25 % และ ย่อยโพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนได้ 15 - 18% นอกจากนี้เชื้อสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวได้เช่นกัน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนที่ไม่มีตัวรับอิเล็กตรอนของไนเตรท (Grishenkov, *et. al.*, 2000)

Mana.,*et. al.*, 2001 ได้ศึกษาความไวในการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีในของเสียในระดับห้องทดลอง ได้เพาะเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากสถานที่ปนเปื้อน พบว่าการย่อยสลายจะเกิดขึ้นภายใน 45 วันปริมาณของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดจะลดลงถึง 70% ของปริมาณไฮโดรคาร์บอนเริ่มต้น ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและ อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจะถูกย่อยสลายได้มากที่สุด คือ 70% และ 60% ตามลำดับ

น้ำมันจัดว่าเป็นทรัพยากรธรรมชาติประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีบทบาทอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และการพัฒนาประเทศ อุตสาหกรรมประเภทต่าง ซึ่งส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนน้ำมันในสิ่งแวดล้อมต่างๆ มากยิ่งขึ้น แต่ในสิ่งแวดล้อมเหล่านั้นก็ยังมีกรย่อยสลายน้ำมันโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในแหล่งนั้น เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้คัดเลือกมาจากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน พบว่ามี 33 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ (*Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Burkholderia* and *Mycobacterium Dietzia*) รา 21 สายพันธุ์ (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* และ *Graphium*) และยีสต์ 4 สายพันธุ์ (*Candida*, *Yarrowia* and *Pichia*.) ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวได้ดีที่สุด คือ n-alkane, isoalkane และ isoprenoid ส่วนสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจะถูกย่อยสลายได้น้อยกว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเนื่องจากมีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า (Frederic, 2004)

การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีน้ำมันปนเปื้อน พบว่ามีแบคทีเรีย 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่อง แบคทีเรียกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ (*Bacillus* and *Pseudomonas* spp.) สามารถย่อยสลาย medium- and long-chain alkanes ในดินที่มีน้ำมันดีเซลปนเปื้อนได้ดีกว่ากลุ่มที่ 1 (Mahiran, 2004)

Pseudomonas sp. BS2201, BS2203 และ *Breibacillus* sp. BS2202 ซึ่งเป็น Nitrate-reducing bacterial ที่คัดแยกจากดินที่มีน้ำมันปิโตรเลียมปนเปื้อนสามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนปิโตรเลียมได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งสภาวะที่มีออกซิเจนสามารถย่อยสลาย alkane (C10–C35) ได้ 90-95% ในเวลา 10 วัน ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถย่อยสลาย alkane ได้ 20-25% นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbons ได้ 15-18% (V.G. Grishchenkov, 2000)

Harayama *et al.* (2004) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยทำการคัดเลือกแบคทีเรียจากการปนเปื้อนน้ำมันที่แพร่กระจายในแหล่งธรรมชาติ ซึ่งพบแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Alcanivorax* และ *Cycloclasticus* ซึ่ง *Alcanivorax* มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น แอลเคนได้ดี ส่วน *Cycloclasticus* มีคุณสมบัติสามารถทำให้กลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนแตกสลายตัวได้

Harayama *et al.* (1999) พบว่า น้ำมันดิบประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนหลัก 4 ชนิด คือ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว (saturated hydrocarbon) สารประกอบไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว (nonsaturated hydrocarbon) ไฮโดรคาร์บอนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน สารประกอบไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัวไฮโดรคาร์บอนซึ่งสามารถย่อยสลายได้ยาก เมื่อมีการปนเปื้อนในน้ำจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพของน้ำมันโดยอาศัย การระเหย การแตกตัวโดยกระแสคลื่น ซึ่งจะทำให้ น้ำมันที่มีการปนเปื้อนเกิดการแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งแบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ต่อไป

Mahmoud and Alexander (2000) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์จากบ่อน้ำมันดิบที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ คือ *Mycobacterium fortuitum* Strain NF4, *Mycobacterium ratisbonense* strain SD4 และใช้วิธีการ high-pressure liquid chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้สามารถย่อย acyclic isoprenoids และ alkanes ได้ดี

Ghazali *et al.* (2004) การสลายตัวด้วยกระบวนการทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอนของดินที่ปนเปื้อน โดยใช้กลุ่มของแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน มีการทดลองนำตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอนมาเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมันดิบ หรือไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนตลอดการทดลอง โดยสายพันธุ์จุลินทรีย์จะพิจารณาจากแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีในน้ำมันดิบ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดหรือทั้งสอง ความสามารถที่สลายไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้น วิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว พบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการสลายอัลเคนสายขนาดกลาง และสายยาวในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล หลังจากที่ยบ่มนานเกิน 30 วัน ปรากฏว่าไม่พบอัลเคน แบคทีเรียกลุ่มนี้ประกอบด้วย *Bacillus* และ *Pseudomonas* spp.เป็นส่วนมาก

6. ปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

6.1 ลักษณะทางกายภาพของ oil pollutants

diphenylmethane ซึ่งเป็นส่วนประกอบของน้ำมันจะอยู่ในสภาพของของเหลวที่อุณหภูมิ 30°C และสามารถถูกย่อยสลายโดยเชื้อ *pseudomonas* sp. แต่ที่ 20°C จะอยู่ในสภาพของของแข็ง ซึ่งเชื้อไม่สามารถย่อยสลายได้ เช่นเดียวกับ naphthalene จะไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ถ้าอยู่ในสภาพของของแข็งเช่นกัน (Gatellier, et al., 1973)

6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

อุณหภูมิมีผลต่อการย่อยสลายส่วนประกอบต่าง ๆ ของน้ำมันจากการศึกษาของ Antai, (2003) รายงานว่าที่อุณหภูมิต่ำจะชะลอการระเหยของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันลดลง และพบว่าที่อุณหภูมิ 20°C น้ำมันที่มีความเข้มข้นต่ำจะถูกย่อยสลายได้ดีกว่าน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูงและส่วนประกอบที่เป็นพิษจะระเหยได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่อุณหภูมิ 10°C ส่วนประกอบที่เป็นพิษที่สามารถระเหยได้จะมีอัตราการระเหยต่ำลงมาก ซึ่งสารพิษนี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันลดต่ำลง นอกจากนี้การย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถเกิดขึ้นได้ในอุณหภูมิต่ำประมาณ 0°C และอุณหภูมิสูงประมาณ 70°C แต่มีอัตราการย่อยสลายที่แตกต่างกันไป

6.3 ผลของสารอาหารต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

อัตราส่วนของการแพร่กระจายของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในรูป carbon/nitrogen (C/N) และ carbon/phosphorus (C/P) มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยทั่วไป และการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนส่งผลกระทบต่อปริมาณ C ที่เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้ความสามารถในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในบริเวณที่ถูกปนเปื้อนต่ำลง (Choi, et al., 2002) ในการกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้น จำเป็นต้องเติมฟอสฟอรัสลงไปในทะเลด้วย อย่างไรก็ตาม ปริมาณฟอสฟอรัสที่มากเกินไปจะเป็นตัวยับยั้งการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ด้วย (Ghazali, 2004) โดยทั่วไปอัตรา C/N = 60-100:1 เป็นอัตราที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Bartha, 1979)

6.4 ผลของออกซิเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

ปริมาณออกซิเจนจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะในปฏิกิริยาออกซิเดชันของจุลินทรีย์ที่ต้องอาศัยเอนไซม์ออกซิจีเนส และมีบทบาทมากกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ (aerobes) การปนเปื้อนน้ำมันในแหล่งน้ำ พบว่าปริมาณออกซิเจนจากอากาศสามารถที่จะสลายได้ โดยตรงทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการย่อยสลายน้ำมัน ในขณะที่การ

ปนเปื้อน ในดิน พบว่าปริมาณออกซิเจนในดินจะขึ้นอยู่กับปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ออกซิเจนจากอากาศ ชนิดของดิน และปริมาณน้ำในดิน ทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ ในดินนั้นค่อนข้างช้า เนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนที่จำกัด แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสลายน้ำมันสามารถเกิดขึ้นได้ ในสภาพที่ไม่ มีออกซิเจนโดยจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิตได้เช่นกัน (Bailey ,et al., 1973)

6.5 ผลของ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันจะเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลางโดยเฉพาะในดินบางชนิด ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าจะมีค่าความเป็นกรดต่างรุนแรงมากทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ช้า เนื่องจากสภาพที่เป็นกรดต่างรุนแรงนี้ จะยับยั้งการ เพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ แต่ถ้าทำการปรับ pH ของดินที่มีความเป็นกรด (pH 4.5) ให้มีค่า pH เป็นกลาง (pH7.4) แล้วอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนพวกน้ำมันเชื้อเพลิง (gasoline) จะเพิ่มเป็น 2 เท่าและอัตราการย่อยสลายจะลดลงเมื่อค่า pH ของดินสูงขึ้น (pH8.5) (Ghazali, 2004)

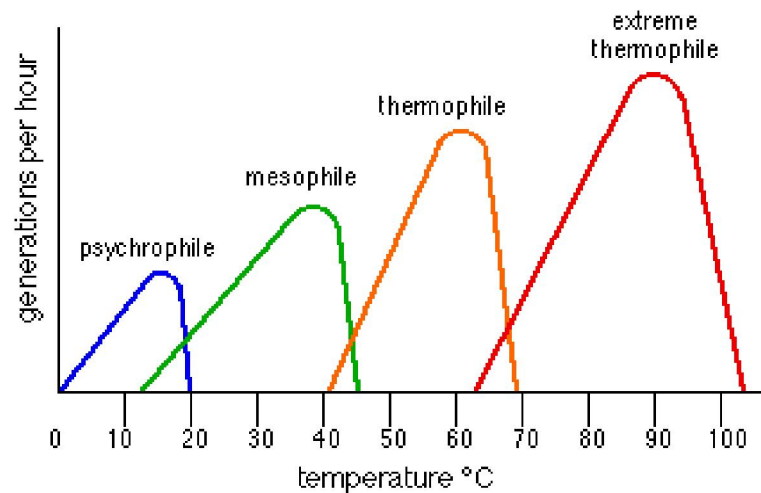
6.6 ผลของความเค็มต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ระดับความเค็มต่างๆ (ตั้งแต่ 3.3 -28.4%) พบว่าอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะลดลงเมื่อระดับความเค็มของน้ำสูงขึ้น เนื่องจากความเค็มมีผลต่อความสามารถในการแลกเปลี่ยนน้ำของผนังเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์ตาย และยังพบที่ความเค็มของน้ำทะเลไม่เกิน 20% จะมีจุลินทรีย์ในปริมาณสูงและสามารถย่อยสลายน้ำมันได้พอสมควร (Ward and Brock, 1978)

7. ปัจจัยที่ผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

7.1 อุณหภูมิ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันไป เช่น Psychrophilic microbe, Mesophilic microbe, Thermophilic microbe และ extreme thermophiles microbe จุลินทรีย์ที่อาศัยในบริเวณแอนตาร์กติก สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20-30°C และอุณหภูมิสูงที่สุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโต คือ อุณหภูมิน้อยกว่า 37 °C ซึ่งที่อุณหภูมินี้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนได้ดี (Susan, 2003)



ภาพที่ 5 ช่วงอุณหภูมิต่างๆ ที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต

Yoshiki *et. al.*, 2007 พบว่า แรงตึงผิว DW2-1 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในน้ำเสียระดับปานกลางที่สังเคราะห์ขึ้น ($>1 \times 10^{10}$ [CFU]/ml) ระหว่างอุณหภูมิที่ 20°C และ 38°C และอัตราการย่อยสลายของน้ำมันสลัดอยู่ที่ 90% หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs ไลเปสและกระบวนการแรงตึงผิวแบบชีวภาพ (BSF) ของแรงตึงผิว DW2-1 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs อยู่ที่ 1720 U/l และ 480 U/ml ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไปเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน DW2-1 จะเป็นตัวหลักที่ทำให้เกิดการย่อยสลายถึง 90% ของน้ำมันสลัด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทั่วไปแล้วอาจสรุปได้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ สามารถใช้เป็นดัชนีในการบ่งบอกว่าสิ่งแวดล้อมบริเวณต่างๆ มีการปนเปื้อนจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือไม่ ซึ่งพบว่าในบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้เพียง 0.1% จากจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมด แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะพบว่ามีจุลินทรีย์กลุ่มนี้เท่านั้นที่เจริญเติบโตได้หรือคิดเป็น 99.67 % ของจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมด

Tomohisa, *et al.* (2001) ได้ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ใต้พื้นดิน บริเวณถ้ำเก็บน้ำมันปิโตรเลียมใน Minami-aga (Niigata) และ Yabase (Akita) พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ คือ *Bacillus thermoleovorans* ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 50 - 80°C แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 70 °C ซึ่งสามารถย่อย *n*-alkanes สายยาว ได้ดีกว่า C12 และ C15

อุณหภูมิเป็นปัจจัย ที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตเร็วหรือช้า อุณหภูมิของน้ำที่ผิวดินแตกต่างกันมาก ที่ขั้วโลกอุณหภูมิ 0 °C จนถึงบริเวณศูนย์สูตรมีอุณหภูมิ 30 °C น้ำทะเลมากกว่า

90 % มีอุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C จึงเหมาะกับการเจริญของไซโครไฟล์เท่านั้น ในน้ำพุร้อนบางแห่งมีอุณหภูมิ 75-85 °C ก็พบจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นเทอร์โมไฟล์ นอกจากนี้อุณหภูมิก็ยังเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลทำให้ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปด้วย (นงลักษณ์, 2544)

7.2 อากาศ

การย่อยสลายน้ำมันในแหล่งน้ำต่างๆ โดยจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะในปฏิกิริยาออกซิเดชันของจุลินทรีย์ ที่ต้องอาศัยเอนไซม์ออกซิจีเนส และสำหรับสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งน้ำนี้ ออกซิเจนจากอากาศสามารถที่จะละลายได้โดยตรง ทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการย่อยสลายน้ำมัน สภาพแวดล้อมบนบกนั้น พบว่า ปริมาณออกซิเจนในดินจะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ออกซิเจนจากอากาศได้ ชนิดของดิน และปริมาณน้ำในดิน ทำให้สภาพบนบก ออกซิเจนจะเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับอัตราเร็วในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ (บัญญัติ, 2532)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการออกซิเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น Aerobic type เจริญได้เฉพาะบริเวณที่มีออกซิเจนเท่านั้น Microaerophile type เจริญได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ถ้ามีออกซิเจนมากจะเจริญช้าๆ Anaerobic type เจริญได้ดีในที่ที่ไม่มีออกซิเจน และ Facultative anaerobic type เจริญได้ทั้งสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแปลงระบบเมตาบอลิซึมของตนเองได้ Farinazleen (2004) ได้คัดเลือก *Bacillus* และ *Pseudomonas* spp. จากดินที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อน พบว่าสามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 150 rpm

งานวิจัยของ Grishchenkov *et al*, 2000 พบว่า *Pseudomonas* sp. BS2201, BS2203 และ *Breibacillus* sp. BS2202 ถูกแยกออกมาจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม เพื่อจุดประสงค์ในการศึกษา ความสามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมด้วยไฮโดรคาร์บอน ภายใต้ปัจจัยแวดล้อมทั้งแบบการใช้ออกซิเจนและแบบไม่ใช้ออกซิเจน ในการดำรงชีวิต ภายใต้สภาวะการใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต (การทดลองทางวิทยาศาสตร์ในอาหารเหลว ใช้เวลา 10 วัน) ความตึงมีค่าลดลง 20–25% ของวัดถูกกัดโดยรวม (TEM) รวมถึง มากกว่า 90–95% ของการวิเคราะห์ alkanes (n-C10–C35) ภายใต้สภาวะการไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต (การทดลองทางวิทยาศาสตร์ ใช้เวลา 50 วัน) สารอินทรีย์เหล่านี้ย่อยสลายได้ 15–18% ของ TEM, 20–25% ของ alkanes และ 15–18% ของวงโคจรไฮโดรคาร์บอน ความตึงยังช่วยย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัว ภายใต้เงื่อนไขที่ไม่ต้องใช้ ออกซิเจนดำรงชีวิต

งานวิจัยของ Frédéric *et.al.*, 2004 พบว่าการคัดเลือกการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไฮโดรคาร์บอนแบบให้ออกซิเจน การย่อยสลายของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กถูกคัดแยกออกจากดินที่ปนเปื้อนด้วยมลพิษจากน้ำมันปิโตรเลียม และแบคทีเรียสีน้ำเงินที่ขาดออกซิเจนจากอินโดนีเซีย แสดงผลได้ชัดเจนจาก 33 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน แบคทีเรีย 8 ชนิด เชื้อรา 4 ชนิด และยีสต์ 4 ชนิด ถูกจำแนกถึงลำดับขั้นที่เฉพาะเจาะจงด้วยโมเลกุลและเทคนิคต่างๆ ที่ปรากฏให้เห็นลักษณะอันเด่นชัด ความดีของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เช่น *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* และ *Mycobacterium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ใหม่นี้ยังไม่มี การอธิบาย เชื้อราจะขึ้นอยู่กับ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* and *Graphium* และยีสต์ ได้แก่ *Candida*, *Yarrowia* และ *Pichia*.

เมื่อทำการวิเคราะห์โคลนในทะเลและน้ำทะเล พบว่า มีแบคทีเรียและยีสต์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากกว่า 10% และยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดอยู่ในจีนัส *Candida* ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีสามารถจำแนกได้ ดังนี้ *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *C. tropicalis* and *C. intermedia*. *Y. lipolytica* ซึ่งยีสต์นี้สามารถย่อยสลายส่วน aliphatic ของน้ำมันดิบ Bombay High ได้ 78% แต่ไม่สามารถย่อยสลายส่วน aromatic หรือ asphaltene นอกจากนี้ แต่ละไอโซเลตยังต้องการอากาศ ไนโตรเจน และฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ (S.S. Zinjarde, 2002)

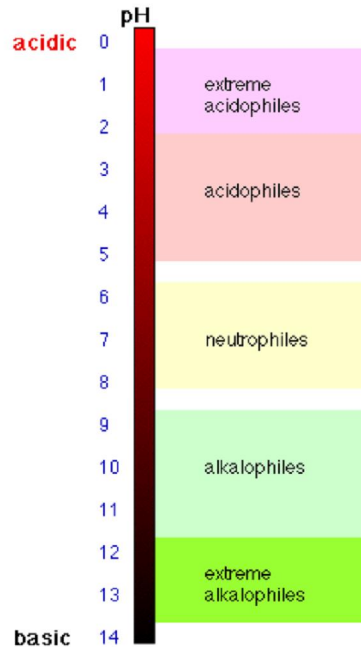
Schaefer *et al.* (2006) จุลินทรีย์ทั่วไปมีความสามารถในการเปลี่ยนอัลเคนเป็น carboxylic acid ได้ และสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ จากการทดลองมีการนำไส้เดือนเข้ามาช่วยย่อยสลายน้ำมัน พบว่าการใช้ไส้เดือนสามารถใช้เวลาสั้น และใช้ต้นทุนในการดำเนินงานต่ำ กลไกในการย่อยสลายน้ำมันนั้นมี 3 กลไกคือ

1. กระบวนการให้ออกซิเจนแก่ดินโดยการขุดโพรงที่อยู่ของไส้เดือน
2. การเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์
3. การเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน

S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของการต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (DO: 1–6 mg/l; Eh:12–300 mV)

7.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากงานวิจัยของ Hao et al., 2004 พบว่า thermophile bacteria สายพันธุ์ TH-2 ที่มีชีวิตอยู่ในบริเวณ Shengli ที่มีน้ำมัน ในภาคตะวันออกของประเทศจีน สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 85 °C และเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง



ภาพที่ 6 ช่วง pH ต่างๆ ที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต

เมื่อปรับ pH น้ำเสียด้วย Tris-HCl ให้เป็น pH 7.8 พบว่าสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน และมีประสิทธิภาพในสลายได้ดีที่สุด คือ ย่อยสลาย *n*-alkanes ได้ 97% และประสิทธิภาพการย่อย 86% ย่อยสลาย total aliphatic hydrocarbons ได้ 40% และ ประสิทธิภาพการย่อย 30% และ ย่อยสลาย total aromatic hydrocarbons ได้ 25% และ ประสิทธิภาพการย่อย 17% ในเวลา 10 วัน (M.L. Nievas, 2005)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายน้ำมันดิบ BH สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 130 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินที่มีน้ำมันปนเปื้อน เช่น *Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 and *Pseudomonas* sp. DS10-129 ซึ่งแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตจะเจริญเติบโตและย่อยสลายน้ำมันดิบได้น้อยกว่าแบคทีเรียที่รวมเป็นกลุ่ม(mix culture) โดยที่ความเข้มข้นของน้ำมันดิบ 1% mix bacteria จะย่อยสลายน้ำมันดิบ BH ได้สูงสุด 78% ที่อุณหภูมิ 30 °C pH 7.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการย่อยสลายน้ำมันดิบ BH ส่วน *Pseudomonas* sp. DS10-129 จะย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 66%, *Bacillus* sp. DS6-86 ย่อยสลาย

น้ำมันดิบได้ 59%, *Micrococcus* sp. GS2-22 ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 49%, *Corynebacterium* sp. GS5-66 ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 43%, *Flavobacterium* sp. DS5-73 ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 41% (Rahman K.S.M,2002)

Rahman *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายทางชีวภาพในน้ำมันดิน ที่มีการปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติ โดยทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมัน 130 ไอโซเลต พบว่า การผสมกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมัน สามารถลดระดับของน้ำมันดิบได้ถึง 78 % ในขณะที่ *Pseudomonas* sp. หรือ DS10-129 สามารถลดระดับน้ำมันดิบได้ 66 % *Bacillus* sp. หรือ DS6-86 สามารถลดระดับน้ำมันได้ 59 % *Micrococcus* sp. หรือ GS2-22 สามารถลดระดับน้ำมันได้ 49 % *Corynebacterium* sp. หรือ GS5-66 สามารถลดระดับน้ำมันได้ 43 % *Flavobacterium* sp. หรือ DS5-73 สามารถลดระดับน้ำมันได้ 41 % อัตราการการย่อยสลายโดยแบคทีเรียกลุ่มผสมลดลงจาก 78 % ถึง 52 % ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดิบเพิ่มขึ้นจาก 10 % ถึง 13 % อุณหภูมิ 30 °C และความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายทางชีวภาพ

S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8)

7.4 ความเค็ม

จากการศึกษาของ Suparna, 2004 พบว่าเชื้อ ES1 ที่แยกจากบริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อนสามารถทนต่อความเค็มได้สูงสุด 3.5% NaCl และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่มี 0.5% NaCl ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้สูงสุด 61% เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน และความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมัน turbine (TuO) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมหลักคือ cycloalkanes และ isoalkanes ซึ่งได้รับมาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแหล่งน้ำมัน ที่นำกลับมาปรับปรุงให้ดีขึ้น เมื่อกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชื่อ Atsuta A ถูกเพาะเลี้ยงในสารละลายเกลือเจือจางที่ 0.5% (w/v) TuO จะเกิดการย่อยสลาย 90% (Hitoshi *et al.*, 2008)

S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของการต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (DO: 1–6 mg/l; Eh: 12–300 mV) และเงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8) ด้วย NaCl ความเข้มข้นที่ 3–15% (ECs of 45–200 mS/cm)

8. เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) มีชื่อตามระบบว่า กลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัสคือ E.C.3.1.1.3

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของ น้ำมันหรือไขมัน ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล และสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยา เอสเทอริฟิเคชัน (esterification) จากกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับ หรือ แลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่างๆ (transesterification) ไลเปสแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตาม ความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate) ได้แก่

1. ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (group specific)

ไลเปสมีระดับของความจำเพาะต่อกรดไขมัน เช่น ไลเปสจาก *Candida antarctica* จะมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายโซ่สั้นมากกว่าสายโซ่ยาว

2. ความจำเพาะต่อตำแหน่ง (position specific)

ไลเปสโดยทั่วไปมักมีความจำเพาะต่อตำแหน่งโดยเฉพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1,3 specific lipase) ของไตรกลีเซอไรด์

3. ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่ง (non-position specific)

หมายถึง ไลเปสที่เข้าทำปฏิกิริยากับไขมันได้อย่างไม่เจาะจง จะเป็นตำแหน่งที่ 1, 2 หรือ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ก็ได้ ปัจจุบันมีการนำไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมการดัดแปลงไขมันและน้ำมัน รวมไปถึงการสังเคราะห์ไขมันชนิดใหม่ขึ้น เช่น โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ (structured triglyceride) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของไขมันทั้งทางกายภาพและโภชนาการ ในร่างกายมนุษย์มีเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากตับอ่อน เป็นไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้น ผลสุดท้ายของการย่อยไขมันในร่างกาย ได้แก่ กรดไขมัน 2-มอนอกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล เป็นส่วนใหญ่ โดยปกติแล้วกรดไขมันที่มีคาร์บอนมากกว่า 12 ตัว ที่ถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์บุผนังลำไส้ นั้น จะถูกนำไปสร้างเป็นไตรกลีเซอไรด์ขึ้นใหม่ แล้วถูกลำเลียงผ่านท่อน้ำเหลือง (lymphatic vessel) เพื่อส่งไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนและไขมันที่เรียกว่า ไคโลไมครอน (chylomicron) ในทางตรงข้าม กรดไขมันที่มีคาร์บอนน้อยกว่า 12 ตัว จะถูกดูดซึมและลำเลียงผ่านทางเส้นเลือด (portal vein) นำเข้าสู่ตับได้โดยตรงในรูปอิสระเช่นเดียวกับ 2 มอนอกลีเซอไรด์ จึงนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว (มยุรี , 2548)

มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีข้อดีหลายประการเช่น เอนไซม์มีความคงตัวใน organic solvents, เอนไซม์ไม่ต้องการ

cofactors, เอนไซม์มีความจำเพาะต่อ substrate น้อย (broad substrate specificity) และที่สำคัญไลเปสมีความจำเพาะเจาะจงในเรื่อง enantioselectivity มีการรายงานว่ามีเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ประโยชน์ทางการค้าในปัจจุบัน มีต้นกำเนิดมาจาก 34 แหล่งของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งในนั้นมี 18 แหล่งแยกได้จากพวก fungi เช่น *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei* เป็นต้น และ 7 แหล่งจากแบคทีเรีย เช่น *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium viscosum* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ไลเปสได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ (organic synthesis), ใช้เติมในผงซักฟอกเพื่อช่วยประสิทธิภาพการซักล้าง, เพิ่มรสชาติในอาหาร, ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ, และในอนาคตอาจมีการนำมาใช้เพื่อการบำบัดของเสีย เนื่องจากประโยชน์อันหลากหลายของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (กัลยา, 2544)

9. แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

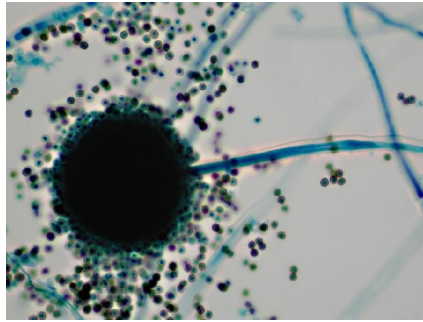
เราสามารถแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากแหล่งต่าง ๆ มากมาย ซึ่งดินเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จำนวนมาก ที่ได้จาก *Penicillium citrinum*, *Pseudomonas* sp. และ *Aspergillus terreus* นอกจากนี้ ยังสามารถพบจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในเนยแข็ง ผลปาล์ม และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (มยุรี, 2548)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีสมบัติในการทำงานแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และกลุ่มของไขมันที่พบในแหล่งที่คัดเลือกจุลินทรีย์ ซึ่งในที่นี้จะแบ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสไว้ 3 จำพวกใหญ่ ๆ คือ

1. เชื้อรา

เชื้อราถือว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ดี และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร เช่น *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีและเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

Hatzinikolaou และคณะ (1996) พบว่า *Aspergillus niger* BTL สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่นเดียวกับ *Aspergillus niger* A116 นอกจากนี้ยังมีเชื้อราอีกหลายชนิด (species) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่น *Rhizopus arrhizus* NRRL2286, *R. oryzae*, *R. oligosporus*, *R. delemar* CDBB H313, *Penicillium citrinum*, *P. roqueforti* S-86, *P. chrysogenum* P. cyclopium, *P. caseicolum*, *P. camembertii*, *P. simplicissimum*, *Fusarium solani* FS1, *Hendersonula toruloidea* typeA ATCC 64930, *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* al., และ *Calvatia gigantea*



ภาพที่ 7 แสดงการเลี้ยงแบบ slide culture ของ *Aspergillus niger* ซึ่งแสดงให้เห็นโคนิเดียมสีดำยื่น ออกไปรอบๆ

ที่มา <http://www.bsru.ac.th/~sci/dept/biot/rubrong.doc>, 2550

2. ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่ง ที่มีผู้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจนถึงระดับการค้า เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ศึกษาไม่ก่อให้เกิดโรค และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ พบว่ายีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ *Candida rugosa* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Yarrowia lipolytica* 681 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่า *Yarrowia lipolytica* 179 ACP, *Candida rugosa* ATCC 14830 และ *Candida utilis* CDBBC245 ซึ่งจะขึ้นอยู่กับกระบวนการหมัก และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ pH และสารเหนี่ยวนำ (inducer) เป็นต้น (มยุรี, 2548)

10. งานวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส

Aleksieva *et al.* (2002) พบว่า การบำบัดทางชีววิทยาเป็นการกำจัดน้ำมันดิบจากการปนเปื้อนให้แตกตัวเป็นอิมัลชัน โดยการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา ซึ่งสามารถเจริญได้โดยใช้น้ำมันดิบที่ปนเปื้อนเป็นแหล่งคาร์บอน

Saisuburamaniyan *et al.* (2004) กล่าวว่าวิธี colorimetric เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในดิน กรดไขมันอิสระจะควบคุมด้วย cupric acetate pyridine reagent และวัดที่ความยาวคลื่น 715 nM การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้รวดเร็วและใช้ในการคัดเลือกผลิตภัณฑ์จากไลเปสจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน

Ghanem *et al.* (2000) รายงานว่ากลุ่มของ *Bacillus alcalophilus* สามารถผลิตไลเปสและจากการศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยอุณหภูมิสูงที่สุด คือ 6 °C ความเป็นกรด-ด่าง 10.6 ซึ่งอยู่ในช่วงเบส

Tano-Debrah *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษากการย่อยสลายทางชีวภาพของไขมัน และน้ำมันในน้ำเสีย ซึ่งได้รับการจัดการและควบคุมโดยเอนไซม์ต่างๆ และจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ในระบบบำบัดของน้ำเสีย ที่มีความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันสูง สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต จากตัวอย่างน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน

Aleksieva *et al.* (2002) แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอยู่ในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก และจากการสำรวจแบคทีเรียกลุ่มนี้ สามารถผลิตปริมาณไลเปสได้จาก 17 สายพันธุ์ ที่ผลิตไลเปสสูง จะเจริญในอาหารแข็ง tributyrin ส่วนใหญ่เป็น *Bacillus* sp. จากการสำรวจ พบว่า ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในค่ากิจกรรมไลเปสเริ่มแรก คือความเป็นกรด-ด่าง 6 ในอาหารเหลว สามารถมีผลิตภัณฑ์อื่นอีกมากมาย ที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทน tributyrin เช่น triolein trimyristin trilaurintricaprin tricaprylin tributyrin Tween 80 น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก กลูโคส และหางนม อาหารที่มี 20 % ของหางนมรวมกับ 2 % triolein มีค่ากิจกรรมไลเปสสูงขึ้นโดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 และอุณหภูมิ 30 °C นาน 64 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ *Bacillus* sp. สามารถผลิตไลเปสนอกเซลล์ 15 U/ml และภายในเซลล์ 168 U/ml

Fadil *et al.* (2003) พบว่า น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอกมีไขมัน และน้ำตาลสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารที่มีประโยชน์ของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตไลเปส

D'Annibale *et al.* (2006) ศึกษาการแยกแยะที่สามารถผลิตไลเปสในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอกโดยวัดค่ากิจกรรมไลเปสนอกเซลล์

Lanciotti R *et al.* (2005) ใช้ *Yarrowia lipolytica* เป็นสายพันธุ์ ที่ได้จากการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอกได้ ถึงแม้จะมีการศึกษาว่ากลุ่มจุลินทรีย์ใช้น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตไลเปส แต่ยังไม่มีการค้นพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ใดในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก ที่สามารถใช้กิจกรรม lipolytic ในตอนนี้เราได้เริ่มทดลอง *Bacillus* sp. แบคทีเรียจากน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกที่ให้ค่ากิจกรรมไลเปสสูง

Lanciotti *et al.* (2005) จากรายงานในห้องปฏิบัติการพบว่า *Bacillus* sp. ที่มีอยู่มากมายในสิ่งแวดล้อม สามารถผลิตไลเปสได้ ในการศึกษานี้ได้ทำการสำรวจสารอาหารที่กระตุ้นในการผลิตไลเปส

Kim *et al.* (2000) พบว่า กลุ่มไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus pumilus* จากดิน มียีนส์ของไลเปสที่เหมือนกับ *E.coli* และมีคุณสมบัติของลำดับโปรตีน และคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกัน

Ghanem et al. (2000) รายงานว่ากลุ่มของ *Bacillus alcalophilus* สามารถผลิตไลเปสและจากการศึกษาพบว่า ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมไลเปสโดยอุณหภูมิสูงที่สุดคือ 6 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 10.6

Castro-Ochoa et al. (2005) แยก *Bacillus thermoleovorans* จากบ่อน้ำพุร้อนและได้ทำการศึกษาลักษณะของ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ การชะล้าง ที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

Chen et al. (2004) แยก *Bacillus* sp. จากสายการผลิตนมผง และศึกษากิจกรรมไลเปส รวมไปถึงความแตกต่างของสารตั้งต้นที่อาจมีผลต่อค่ากิจกรรมไลเปส

ณัฏฐภัทรและทรัพย์ทวี (1998) ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ผลิตจากแบคทีเรียกรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล นอกจากนี้ ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อย หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้ถูกสกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และ แบคทีเรีย) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญ เนื่องจากผลิตง่าย การเก็บเกี่ยวและการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ ด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทนต่อค่าความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และ ยา

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (สมบุญ, 2539)

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์นั้นแตกต่างกันตั้งแต่ง่าย ๆ จนถึงกรรมวิธีที่ยุ่งยากต้องใช้เครื่องมือ ราคาแพง รวมทั้งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน ประสิทธิภาพของวิธีการเก็บเชื้อก็แตกต่างกันไป ดังนั้นการที่จะเลือกใช้วิธีใดในการเก็บรักษาเชื้อนั้นควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมสอดคล้องกับจุดประสงค์ในการใช้เชื้อจุลินทรีย์

ปัจจัยที่นำมาใช้พิจารณาในการเลือกวิธีการเก็บรักษาเชื้อ

1. คงสภาพการมีชีวิต (maintenance of viability)

วิธีการต่าง ๆ มีผลต่อการมีชีวิตอยู่รอดของจุลินทรีย์ ซึ่งจะตายไปในระหว่างกระบวนการเก็บเชื้อ (preservation process) และในช่วงการเก็บ (storage) ดังนั้นควรเลือกวิธีที่ทำให้จุลินทรีย์ตายในระหว่างกระบวนการน้อยที่สุด และตายในช่วงการเก็บน้อยที่สุดด้วย รวมทั้งสามารถเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้ได้ยาวนาน

2. การเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากร (population change through selection)

ควรเลือกวิธีที่ทำให้จุลินทรีย์ที่มีชีวิต (viable cell) เหลืออยู่จำนวนมากใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในตอนเริ่มต้น เพื่อขจัดปัญหาการเปลี่ยนแปลงลักษณะ (characteristics) บาง อย่างของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการ เพื่อกคงความอยู่รอดของจุลินทรีย์

3. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic change)

วิธีการเก็บรักษาเชื้อไม่ควรทำให้เกิดการผ่าเหล่า (mutation) หรือการสูญหายของ plasmids ไปจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้ลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียสูญหายไปหรือมีลักษณะใหม่เกิดขึ้นมาส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสารต่าง ๆ โดยเชื้อจุลินทรีย์นั้น ๆ รวมทั้งการศึกษาทางสรีรวิทยาของเชื้อด้วย

4. ความบริสุทธิ์ (purity)

ต้องเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อไว้ให้อยู่ในสภาพบริสุทธิ์ (pure) ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ จากภายนอก

5. ค่าใช้จ่าย (expens)

ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งในด้านแรงงาน เครื่องมือ วัสดุ สถานที่เก็บรักษาเชื้อ พลังงานที่ใช้ในกระบวนการเก็บเชื้อและเวลาที่เชื้อเก็บไว้ได้นานแค่ไหน ตัวอย่างเช่น การเก็บเชื้อด้วยวิธี freeze-drying ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง แต่เป็นวิธีที่ประหยัดแรงงาน สามารถเก็บเชื้อไว้ได้นาน ๆ โดยไม่ต้องเสียเวลาทำการเลี้ยงเชื้อใหม่

6. จำนวนเชื้อที่ต้องเก็บรักษา (number of cultures)

ควรเลือกวิธีการที่เหมาะสมกับจำนวนสายพันธุ์ที่ต้องการเก็บรักษา และพื้นที่ที่ใช้ในการเก็บ (storage) เช่น บางวิธีเหมาะสมในเก็บรักษาสายพันธุ์ที่มีจำนวนน้อย แต่หากต้องการเก็บเชื้อหลากหลายสายพันธุ์มากขึ้นก็จะสิ้นเปลืองแรงงานและต้องใช้พื้นที่ในการเก็บ (storage) มากขึ้น เป็นต้น

7. ความสำคัญของเชื้อที่ต้องการเก็บรักษา (value of cultures)

ความสำคัญของสายพันธุ์เป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงเป็นอย่างยิ่ง ในการเลือกวิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่มีความสำคัญมาก ๆ จะต้องเลือกใช้วิธีการที่สามารถรักษาสายพันธุ์ให้มีชีวิตรอดและคงลักษณะต่าง ๆ ไว้ได้ แต่หากเป็นสายพันธุ์ธรรมดาทั่วไป ที่ไม่สำคัญนั้นปัจจัยที่ควรคำนึงถึงก็คือค่าใช้จ่ายและแรงงานที่ต้องใช้ในการเก็บรักษา

8. การขนส่งเชื้อไปยังผู้ใช้ (supply and transportation of cultures)

ในกรณีที่ต้องส่งเชื้อจุลินทรีย์ไปยังสถานที่ต่าง ๆ นั้น จำเป็นต้องเก็บแต่ละสายพันธุ์ไว้ หลาย ๆ ซ้ำเป็นจำนวนมาก ต้องมีพื้นที่ในการเก็บไว้ (storage) ก่อนแจกจ่าย จึงต้องเลือกวิธีการที่เหมาะสม เพื่อสะดวกในการเก็บรักษาในการขนส่งทางไปรษณีย์ ซึ่งอาจต้องใช้เวลาหลายวัน และจะต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบของไปรษณีย์ในการส่งเชื้อเข้าประเทศหรือท้องถิ่นแต่ละแห่ง

9. ความถี่ในการนำเชื้อมาใช้ประโยชน์ (frequency of use of cultures)

จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่ใช้ใน bioassay หรืออุตสาหกรรมการผลิตสารต่าง ๆ ซึ่งต้องใช้ บ่อย ๆ นั้นควรเลือกวิธีการเก็บรักษาที่ไม่ทำให้ stock culture เกิดการปนเปื้อนและนำมาใช้ได้เลยไม่มีวิธีการเก็บรักษาเชื้อวิธีใดที่บรรลุจุดประสงค์ทั้ง 9 ข้อได้ ดังนั้นการเลือกใช้จึงต้องคำนึงถึงความสมดุลย์ของผลประโยชน์ที่จะได้รับรวมทั้งผลเสียจากวิธีนั้นด้วย

วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ (Kirsop และคณะ, 1984; Robert และคณะ, 1995)

1. Subculture

เป็นการย้ายเชื้อจุลินทรีย์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งบรรจุในหลอด หรือขวด หลอดหนึ่งใช้เป็น seed stock อีกหลอดใช้เป็น working culture นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อเชื้อเจริญแล้วจึงนำไปเก็บไว้ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ หรืออาจเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°C แต่ต้องทำการย้ายเชื้อเสมอ ๆ เพื่อป้องกันเชื้อตายไปหมด ความถี่ห่างในการย้ายเชื้อมากน้อยแค่ไหน ขึ้นกับชนิดของเชื้อ โดยทั่วไปต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 3 เดือน

2. Drying

เป็นวิธีการเก็บจุลินทรีย์ไว้บนตัวกลางที่แห้ง และป้องกันการดูดซับน้ำเข้าไปอีกในระหว่างการเก็บ เหมาะกับการเก็บรักษาเชื้อรา ยีสต์ ซึ่งทนทานต่อความแห้งหรือมีค่า aw ต่ำกว่าแบคทีเรีย แต่ก็มีแบคทีเรียหลายสกุล สามารถเก็บรักษาได้โดยวิธี drying ซึ่งใช้ตัวกลางแตกต่างกัน

1. เก็บบนทรายหรือดินหรือ kieselguhr หรือซิลิกาเจล โดยการหยด suspension ของเชื้อ คลุกเคล้ากับตัวกลางที่ปลอดเชื้อซึ่งบรรจุในขวดที่ป้องกันความชื้นได้ แบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดและคงสภาพเดิมไว้ได้หลายปี

2. เก็บบนแถบกระดาษหรือแผ่นกระดาษ (paper strips or paper discs) โดยหยด suspension ของเชื้อบนแถบกระดาษกรองหรือแผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อนำไปทำให้แห้ง แล้วเก็บไว้ในซองพลาสติก หรือ aluminium foil ที่ปลอดเชื้อและปิดสนิท

3. เก็บบน predried plug โดยบรรจุวัสดุเช่น peptone, แป้งหรือ dextran ในหลอดเล็ก ๆ แล้วหยด suspension ของเชื้อลงไป จากนั้นจึงนำไปทำให้แห้งและดูดอากาศออก เพื่อให้เชื้ออยู่ในสุญญากาศ เหมาะสำหรับเชื้อที่เปราะบางไม่ทนทานต่อกระบวนการเก็บแบบ freeze-drying

4. เก็บบนแผ่นเจลาติน (gelatin discs) นำเชื้อจุลินทรีย์มาผสมกับ gelatin medium ซึ่งมีส่วนผสมอื่น ๆ อีกขึ้นกับสปีชีส์ จากนั้นจึงหยดบนจานปลอดเชื้อแล้วทำให้แห้งหรือนำไปทำ freeze-dried เก็บหยดเจลาตินนี้ในขวดที่มี silica gel เพื่อดูดซับความชื้น วิธีการนี้เก็บแบคทีเรียไว้ได้นานหลาย ๆ ปี

3. Freeze-drying

เป็นกระบวนการดึงน้ำออกจากตัวอย่างแช่แข็ง (frozen sample) โดยการระเหิดโดยการผสมแบคทีเรียลงในอาหารที่เหมาะสม แล้วนำไปทำให้เย็นจัดจนเป็นน้ำแข็ง จากนั้นจึงดึงน้ำออกจากตัวอย่างในสุญญากาศ น้ำที่ระเหิดออกมาจะถูกดูดซับด้วย phosphorous pentoxide หรือถูกเก็บไว้ที่ condenser ของเครื่องทำความเย็น ตัวอย่างที่ทำให้แห้งแล้วจะถูกทำให้อยู่ในสภาพสุญญากาศหรือมี inert gas แล้วใส่ไฟเชื่อมหลอดแก้ว (vials หรือ ampoules) ให้ปิดสนิท

ในการทำ freeze-drying นั้นควรมีการทดลองหาสภาพที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละสปีชีส์ เช่น ควรนำแบคทีเรียมาจาก growth phase ช่วงใด อุณหภูมิใดที่ควรใช้ในการบ่มเชื้อก่อนนำมาเก็บรักษา ส่วนประกอบของ suspending medium ที่เหมาะสม อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะในขณะทำ freezing ความชื้นควรคงเหลืออยู่เท่าใด เหล่านี้เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตอยู่รอดและคงคุณสมบัติไว้ได้ยาวนานของเชื้อ

4. Freezing

เป็นวิธีการที่ลดค่า aw หรือ available water โดยการทำให้น้ำกลายเป็นน้ำแข็ง จากนั้นจึงนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกดึงน้ำออกนี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเช่นที่ -20°C , -30°C , -40°C , -70°C , -140°C , -196°C แต่ที่ -70°C นิยมใช้กับจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย มัยโคพลาสมา โปรโตซัว ไวรัส มีวิธีการเก็บดังนี้

4.1 เก็บบนเม็ด glass bead ที่ -70°C

โดยการผสมแบคทีเรียใน glycerol suspending medium แล้วนำไปคลุกเคล้ากับ glass bead จากนั้นจึงเก็บไว้ที่ -70°C เป็นวิธีการที่ง่ายแต่ก็มีข้อเสียคือต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และสิ้นเปลืองพลังงานในการผลิตความเย็นที่ -70°C หรือในกรณีที่กระแสไฟขัดข้องทำให้สูญเสียสภาพ -70°C ก็จะมีผลต่อการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ ในกรณีที่ต้องใช้เชื้อในการศึกษาบ่อย ๆ นั้น ไม่สามารถนำ

เชื้อมาใช้ได้เลยต้องนำมา subculture ก่อน นอกจากนี้ยังไม่สามารถแจกจ่ายหรือบริการเชื้อทางไปรษณีย์ได้

4.2 เก็บในไนโตรเจนเหลว

ที่อุณหภูมิ -196°C เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเก็บรักษา แบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว สาหร่าย ไวรัส ยีสต์ bacteriophage, mammalian cell, tissue culture โดยการผสมสิ่งเหล่านี้ใน cryoprotectants ที่เหมาะสมซึ่งบรรจุในหลอดแก้วเล็ก ๆ จากนั้นจึงนำไปแช่ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

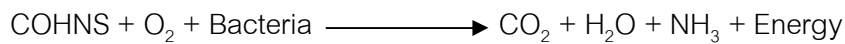
การหาลำดับเบสดีเอ็นเอของจุลินทรีย์

เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของเส้นดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ โดยผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการหลาย ๆ แห่งสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง นอกจากนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิต หลาย ๆ ชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่าง ๆ หรือจาก nucleotide database ซึ่งเป็นฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ที่เก็บรวบรวมทุกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีผู้รายงานไว้ เช่น GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) และ DDBJ (DNA Database of Japan) (Takamatsu, 1998) การใช้เทคนิค DNA sequence analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด ซึ่งเป็นการศึกษาในระดับดีเอ็นเอโดยตรง นำที่จะให้ผลการตรวจสอบที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

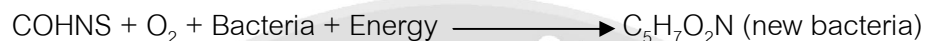
ความสำคัญของจุลินทรีย์ในการกำจัดขยะและน้ำเสีย

จุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย มีความสำคัญมากในกระบวนการบำบัดขยะและน้ำเสีย หลักการที่สำคัญคือการใช้แบคทีเรียไปย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในขยะและน้ำเสีย ปฏิกริยาชีวเคมีของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารอินทรีย์นั้นมีสองชนิดคือ แบบใช้ออกซิเจนและแบบไม่ใช้ออกซิเจน เนื่องจากสารอินทรีย์ในขยะและน้ำเสียมีหลายชนิด ซึ่งมีองค์ประกอบใหญ่เป็นคาร์บอน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ นิยมเขียนสัญลักษณ์ COHNS แทนสารอินทรีย์ในขยะและน้ำเสีย (เสริมพล และไชยยุทธ, 2524)

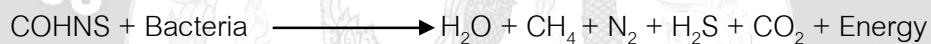
ในปฏิกิริยาแบบใช้ออกซิเจน Aerobic bacteria จะเป็นตัวการทำลายสารอินทรีย์เพื่อให้ได้พลังงานดังสมการ



พลังงานที่ได้จะถูกนำมาใช้สร้างเซลล์ใหม่ดังสมการ



ดังนั้นออกซิเจนจะต้องมีเพียงพอสำหรับในปฏิกิริยาแบบนี้ COHNS ที่ถูกเผาผลาญเพื่อพลังงาน จะมีประมาณ 70% ของ COHNS ทั้งหมด ถ้าไม่มีออกซิเจน Anaerobic bacteria และ Facultative Bacteria จะเจริญเติบโต ส่วน Aerobic bacteria จะตายหมด ในปฏิกิริยาแบบไม่ใช้ออกซิเจน COHNS จะถูกทำลายดังสมการ



ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์จะเจริญได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอาหารที่เหมาะสม ซึ่งจะแตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยทั่วไปปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน ความเป็นกรดด่างของอาหาร อุณหภูมิ และออกซิเจนในกรณีของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (Moat และ Foster, 1995)

แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงานของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50 – 55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ (Bosze และคณะ 1995) นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญของเซลล์โดยตรง การเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและการใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเซลล์ (Stanbury และคณะ, 1995)

ตารางที่ 5 ชนิดและหน้าที่ของแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์

แบคทีเรีย	หน้าที่ในการทำงาน
<i>Aeromonas aerogenes</i>	ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ จะออกซิไดซ์คาร์โบไฮเดรตและกรดอินทรีย์สายสั้นๆ ให้เป็นสารประกอบอินทรีย์คาร์โบไฮเดรตและน้ำแทน
<i>Bacillus subtilis</i>	สามารถออกซิไดซ์คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ และสารประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน น้ำมัน โปรตีน และแป้ง โดยสามารถทำงานได้ดีในการย่อยสลายตะกอน เนื่องจากสามารถหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็ก อีกทั้งยังสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่กั้นบ่อได้ในขณะที่กำลังเจริญเติบโต
<i>Cellulomonas biazolea</i>	เปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้
<i>Enterobacter</i> sp.	เจริญเติบโตได้ดีทั้งที่ไม่มีออกซิเจนและสภาพที่มีอากาศ โดยภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนจะออกซิไดซ์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบง่ายๆ ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ กลายเป็นแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ของพืชน้ำ แต่ในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำๆ จะเกิดการหมักของสารประกอบคาร์บอนทำให้เกิดกรดอินทรีย์
<i>Nitrosamines</i> sp.	ออกซิไดซ์แอมโมเนีย-ไนโตรเจนให้เป็นไนไตรต์-ไนโตรเจน ซึ่งต้องการออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอ การเจริญเติบโตยังต้องอาศัยสารประกอบอินทรีย์ของคาร์บอนที่ละลายน้ำ แต่กระบวนการทำงานจะถูกจำกัดเมื่อมีสารประกอบอินทรีย์มากกว่า 20 ppm
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	ออกซิไดซ์ไนไตรต์-ไนโตรเจน ให้เป็นไนเตรต โดยขบวนการทำงานจะถูกยับยั้งโดยปริมาณแอมโมเนีย
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	ลดระดับไนไตรต์-ไนโตรเจน ในสภาพที่ไม่มีอากาศ หน้าที่หลักคือ ออกซิไดซ์สารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้

ที่มา : อัมพล (2546)

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการหมักระดับห้องปฏิบัติการ ต้องคำนึงถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาไปเป็นระดับนาร่องและระดับอุตสาหกรรมด้วย ดังนั้นราคาของวัตถุดิบที่ใช้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องมีการพิจารณาให้เหมาะสม กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แป้งจากธัญพืชชนิดต่างๆ แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง หรืออาจใช้ข้าวโพดหรือเมล็ดธัญพืชที่บดเป็นชิ้นเล็กๆ (Stanbury และคณะ, 1995) ในปัจจุบันวัตถุดิบที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อหมักเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร (Akidumila และ Glatz, 1998) เช่น รำข้าว กากน้ำตาล เวย์ น้ำแช่ข้าวโพด (Stanbury และคณะ, 1995) การนำเอาวัตถุดิบเหล่านี้มาใช้นอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบในรูปของผลผลิตที่ได้แล้วยังสามารถลดปัญหาการจัดการของเสียเหล่านี้ได้อีกด้วย (Akidumila และ Glatz, 1998)

การศึกษาลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ส่วนใหญ่จะเน้นผลผลิตในรูปของเอนไซม์มากกว่าผลผลิตที่เป็นตัวเซลล์ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในสูตรอาหารจึงเป็นแหล่งที่ส่งเสริมให้มีการผลิตเอนไซม์ได้สูง ได้แก่ น้ำมัน แหล่งไขมันที่ได้จากพืชและสัตว์ต่างๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง (Shabtia และ Daya – Mishne, 1992; Kojima และคณะ, 1994) น้ำมันมะกอก (Del Rio และ คณะ, 1990; Sugihara และ คณะ, 1991; Benjamin และ Pandey, 1996) ไขมันสัตว์ (Bendnarski และคณะ, 1993) อย่างไรก็ตามแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์นี้อาจเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมหรือไม่เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์ก็ได้

ในการศึกษานี้ต้องการหาแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้สูงสุด รวมทั้งเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในประเทศ มาทดแทนแหล่งคาร์บอนที่มีราคาสูง พบว่า รำข้าว กากน้ำตาลและแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายโดยทั่วไป เนื่องจากประเทศไทยมีการผลิตข้าวในปริมาณถึง 17.2 – 21.3 ล้านตัน (งามชื่น, 2537) รำข้าวซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการบวนการสีข้าวนั้นจะมีปริมาณถึง 9.33 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณข้าวทั้งหมด (Tomus, 1989) กากน้ำตาลเป็นวัสดุที่เกิดจากการกระบวนการผลิตน้ำตาล ซึ่งในแต่ละปีปริมาณกากน้ำตาลมากกว่า 1.6 – 2.4 ล้านตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2534 – 2536) ส่วนแป้งมันสำปะหลังเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปมาจากมันสำปะหลังซึ่งเป็นสินค้าทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้มากจนเป็นสินค้าส่งออกอีกอย่างหนึ่งของประเทศ (ศานิต, 2540) ดังนั้นจึงเลือกกากน้ำตาลมาใช้ในการศึกษาเพราะหาง่ายในท้องถิ่น ร้านค้าการเกษตรและยังมีราคาถูกอีกด้วย

แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะจุลินทรีย์จะใช้ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีไนโตรเจนไม่เพียงพอจะทำให้จุลินทรีย์ไม่

สามารถสังเคราะห์เซลล์ได้ (ธีระ, 2539) จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้ในโตรเจนได้แตกต่างกันออกไป บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ บางชนิดเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์นั้นๆ (Boze และคณะ, 1995; Stanbury และคณะ, 1995)

โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดจะต้องเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีกว่า อนินทรีย์ไนโตรเจน อินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้อาจเป็นโปรตีน ยูเรีย เปปโตน ทรีปโตน สารสกัดจากเนื้อ และกรดอะมิโนบางชนิด (Stanbury และคณะ 1995) แต่อินทรีย์ไนโตรเจนเหล่านี้จะมีข้อจำกัดในแง่ของราคาที่ค่อนข้างสูง (ยกเว้นยูเรีย) การนำไนโตรเจนนี้มาใช้ในการผลิตอุตสาหกรรมจึงเป็นไปได้ยาก (Parekh และคณะ, 1999) และเมื่อเปรียบเทียบราคาสารอินทรีย์ไนโตรเจนกับอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้วพบว่าอินทรีย์ไนโตรเจนจะมีราคาสูงกว่ามาก (ตารางที่ 6) ดังนั้นการใช้อนินทรีย์ไนโตรเจนในระดับอุตสาหกรรมจึงมีความเป็นไปได้มากกว่าการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน

ตารางที่ 6 ราคาของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน (สำรวจราคาในระหว่างปี 2543 – 2544)

ชนิดของไนโตรเจน	ปริมาณ (กรัม)	ราคา (บาท)
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH ₄) ₂ SO ₄)	500	280
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH ₄ Cl)	500	320
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	500	560
โซเดียมไนเตรต (NaNO ₃)	500	350
เปปโตน (peptone)	500	1,600
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	500	2,300

การใช้อนินทรีย์ไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์นั้นพบว่าเกลือแอมโมเนียมเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถใช้เกลือแอมโมเนียมในการเจริญได้ดี โดยเกลือแอมโมเนียมที่ใช้ส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นเกลือแอมโมเนียมที่มีราคาถูกที่สุด นอกจากนี้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์หรือแก๊สแอมโมเนียมที่ใช้ในการปรับค่าพีเอชในกระบวนการหมักก็สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ได้ด้วย ส่วนไนเตรตในรูปของโซเดียมไนเตรตหรือแอมโมเนียมไนเตรตก็สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงจุลินทรีย์ได้เช่นกัน (Solomons, 1969) นอกจากนี้ อนินทรีย์ไนโตรเจนแล้ววัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมบางประเภทสามารถที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยง

เชื้อได้ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง เป็นต้น (Stanbury และคณะ, 1995)

พีเอช

พีเอชมีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญและระบบเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะค่อยๆ ลดลงเมื่อพีเอชสูงหรือต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสม จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงของพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน บางชนิดเจริญได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชต่ำประมาณ 2 – 5 (acidophile) บางชนิดเจริญได้ดีที่พีเอชเป็นเบสประมาณ 9 – 11 (alkalophile) แต่โดยทั่วไปแล้ว จุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชอยู่ในระดับกลางๆ (neutralophile) หรือพีเอชประมาณ 7.0 (Moat และ Foster, 1995) ดังนั้นการที่จะให้เชื้อมีอัตราการเจริญได้สูงและคงที่จำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

วิธีการควบคุมพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดนิยมใช้แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เป็นบัฟเฟอร์ แคลเซียมคาร์บอเนตจะทำหน้าที่ควบคุมพีเอชโดยจะแตกตัวเมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงหรือต่ำเช่น กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เติมน้ำไปภายหลัง อย่างไรก็ตามส่วนประกอบบางอย่างในอาหารเช่นฟอสเฟต (PO_4^{3-}) ก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชได้ นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอัตราส่วนที่สมดุลกันก็จะช่วยควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ด้วย (สมใจ, 2537)

อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดกิจกรรมของเซลล์ โดยเซลล์จะมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงอย่างไม่อาจหลีกเลี่ยงได้ อุณหภูมิจะมีผลต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีในเซลล์เพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์หรือโปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพการทำงานได้ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์จึงเป็นอุณหภูมิที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ได้สูงสุดโดยไม่ทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์เสียคุณสมบัติไป อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป บางชนิดเจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (psychrophiles) บางชนิดเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิปานกลางประมาณ 25–45 องศาเซลเซียส (mesophiles) และบางชนิดเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (thermophiles) (Daniel, 1995) ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งสำคัญ

ออกซิเจน

ออกซิเจนมีความสำคัญสำหรับการเจริญของเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic microorganisms) ออกซิเจนจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจ (respiratory

chain) การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอเชื้อจะมีการเจริญได้ดี เนื่องจากสภาวะที่มีการให้อากาศจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายอาหารและสร้างพลังงานได้สูง ทำให้มีพลังงานเพียงพอต่อการนำไปสร้างสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้อย่างเพียงพอ (สารโจนและประวิทย์, 2538) นอกจากนี้ความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์ยังขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถเมตาบอลิซึมได้ง่ายรวดเร็วความเข้มข้นสูงจะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว และมีความต้องการของออกซิเจนสูงจนอาจเกินความสามารถในการให้อาหารของถังหมักได้ จุลินทรีย์แทบทุกชนิดสามารถนำออกซิเจนไปใช้ได้ก็ต่อเมื่อออกซิเจนอยู่ในรูปของเหลว จึงเปรียบเทียบกับสารอาหารอื่นที่ละลายอยู่ในอาหาร เช่น กลูโคส กรดอะมิโน และเกลือแร่ต่างๆ แต่ออกซิเจนจะแตกต่างจากอาหารอื่นในส่วนข้อจำกัดในการละลาย โดยออกซิเจนสามารถละลายน้ำได้ในปริมาณที่จำกัดกว่าสารอาหารอื่น ดังนั้นการให้อากาศอย่างต่อเนื่องจึงเป็นสิ่งจำเป็นในกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ (Daniel และคณะ, 1979)

การเลี้ยงเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการนิยมใช้เครื่องเขย่า (shaker) ในการให้อากาศการเขย่านี้จะทำให้เกิดการถ่ายเทของออกซิเจนจากอากาศที่อยู่ช่องว่างระหว่างอาหารกับจุลกลีที่ปิดพลาสติกลงสู่อาหารเหลว (Solomons, 1969) เครื่องเขย่ามีอยู่ 2 แบบ คือ เครื่องเขย่าที่มีให้อากาศโดยการเคลื่อนที่กลับไปกลับมาตามแนวราบ (reciprocal shaker) และเครื่องเขย่าที่มีการให้อากาศโดยการหมุนเป็นวง (rotary shaker) อัตราการส่งผ่านออกซิเจนโดยเครื่องเขย่าแบบกลับไปกลับมาตามแนวราบจะสูงกว่าการเขย่าแบบหมุนเป็นวง แต่การเขย่าแบบหมุนเป็นวงจะมีโอกาสที่อาหารจะหกหรือเปื้อนจุลกลีได้น้อยกว่าทำให้ปลอดภัยจากการปนเปื้อนได้ดีกว่า ส่วนการเลี้ยงเชื้อในระดับนำร่องและระดับอุตสาหกรรมจะมีการให้ออกซิเจนโดยติดตั้งระบบให้อากาศและเครื่องกวนในถังหมัก แต่ก็มีถังหมักบางชนิดที่ออกแบบให้มีระบบให้อากาศที่ดีพอโดยไม่จำเป็นต้องให้เครื่องกวน (Daniel และคณะ, 1979; Stanbury และคณะ, 1995) การให้อากาศและการกวนนอกจากจะเป็นการเติมออกซิเจนให้เพียงพอับความต้องการในการเกิดกิจกรรมของ จุลินทรีย์แล้วยังเป็นการรักษาการกระจายตัวของเซลล์ให้แขวนลอยอยู่ในอาหารอย่างสม่ำเสมออีกด้วย (Daniel และคณะ, 1979)

อาหารและกรรมวิธีการป้อนอาหารให้จุลินทรีย์

แหล่งอาหารที่สำคัญของจุลินทรีย์ ได้แก่ คาร์บอน, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, วิตามิน และธาตุอาหารอื่นๆ

1. แหล่งคาร์บอน

กากน้ำตาล จะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในระยะแรกของการเลี้ยงจุลินทรีย์ได้กากน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet) ต่อมาจึงมีการนำกากน้ำตาลจากอ้อยมาใช้ ซึ่งกากน้ำตาลจากอ้อยมี ไบโอดีโน

อยู่ในปริมาณที่มากพอ โดยไม่ต้องเติมกากน้ำตาลที่ได้จากหัวบีทเข้าไปอีก (Rose และ Harrison, 1970) นอกจากนี้กากน้ำตาลยังให้ธาตุอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตด้วย เพราะมีวิตามิน biotin, calcium pantothenate, inositol, thiamin, pyridoxine, riboflavin และ folic acid (Imrite, 1969) แต่อย่างไรก็ตามกากน้ำตาลก็มีข้อเสียอยู่บ้าง เพราะมักมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปะปนมาด้วย เช่น sulfurdioxide, hydroxymethyl furfural, potassium imidodisulphonate, fatty acids และธาตุโลหะหนัก เช่น ทองแดง สังกะสี (ปราโมทย์, 2520; Rose และ Harrison, 1971) นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อปริมาณการผลิตของเซลล์จุลินทรีย์ที่จะได้ (บุหลันและคณะ, 2519)

การใช้คาร์บอน (carbon assimilation) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการใช้น้ำตาล โดยที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถจะซึมผ่านเข้าตัวเซลล์ได้ง่าย สำหรับน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น น้ำตาลซูโครส จะถูกย่อย (hydrolyze) โดยเอนไซม์อินเวอร์เทส ที่บริเวณ periplasmic space ก่อนที่จะถูกนำเข้าไปในตัวเซลล์ จุลินทรีย์ ส่วนน้ำตาลแล็กโทสจะไม่สามารถนำเข้าไปใช้ได้เลย และน้ำตาลมอลโทสอาจถูกนำไปใช้ได้ โดยการซึมผ่านแบบธรรมดาและแบบ active transport ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไม่ควรมากเกินไป เนื่องจากจะไปส่งผลทำให้จุลินทรีย์ผลิตแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการให้เกิดขึ้นในกระบวนการผลิต (Tirmazi และคณะ, 1973)

ในการใช้กลูโคสในสภาพ aerobic นั้นจะถูกใช้โดยผ่าน glycolytic pathway (TCA cycle) ประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคสทั้งหมดและที่เหลือโดย pentose phosphate pathway อีก 6 เปอร์เซ็นต์ การใช้คาร์บอนของจุลินทรีย์ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็น substrate จุลินทรีย์จะมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้อยู่ในรูปที่สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ แต่ทั้งนี้ก็ย่อมมีผลต่อการเจริญเติบโตและระยะเวลาที่ต้องการในการเปลี่ยนแปลงด้วย โดยปกติการใช้น้ำตาลซูโครสจะไม่มีปัญหาเพราะจะ hydrolyzed ได้ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งจะสามารถซึมผ่านเข้าตัวเซลล์ได้เลย (Peppler, 1960; phaff, 1968; Chen และ Chiger, 1985)

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของกากน้ำตาลในประเทศไทย

สารประกอบ	ร้อยละ
น้ำ	17-25
น้ำตาลซูโครส	30-40
น้ำตาลอินเวิร์ท	10-20
น้ำตาลทั้งหมด	50-60
เถ้า	7-15
สารอินทรีย์	10-20
ไนโตรเจน	0.86
ฟอสฟอรัส	0.18
โพแทสเซียม	3.0
แคลเซียม	0.5
เหล็ก	0.045
ทองแดง	0.045
โซเดียม	0.38

ที่มา : พัทธา (2520)

2. แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์จะใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปริมาณแอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ ซึ่งขึ้นกับปริมาณไนโตรเจนในสารอาหาร และสภาวะการเลี้ยง ส่วนประกอบของไนโตรเจนในเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงในช่วงร้อยละ 5-10 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะมีผลต่อคุณสมบัติของ จุลินทรีย์ อัตราส่วนระหว่างเซลล์ไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรต จะมีความสำคัญในการเตรียม จุลินทรีย์ผง นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังใช้โมโนแอมโมเนียมฟอสเฟต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมคาร์บอเนต แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์หลายชนิดได้ดี (Rose และ Harrison, 1971) Menzinsky (1950) รายงานว่า กากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลต่ำและมีปริมาณไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์สูงจะให้ผลผลิตดีกว่ากากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลสูง และมีปริมาณไนโตรเจนต่ำ (Prescott และ Dunn, 1959) สำหรับกากน้ำตาลจากหัวบีทและอ้อยมีปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการเจริญเติบโต จึงต้องมีการเติมไนโตรเจนลงไปในรูปเกลือแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต หรือ ฟอสเฟต (Reed และ Peppler, 1973) นอกจากนี้ใน

โตจนจะเป็นแหล่งอาหารแล้ว ธาตุนี้ยังมีความสำคัญต่อความสามารถในการขยายตัวและความคงทนในการเก็บรักษาจากน้ำตาลจากอ้อยอีกด้วย

สำหรับทางการค้านิยมเติมไนโตรเจนในรูป aqueous ammonia, anhydrous ammonia, ammonium salt และยูเรีย โดยจะต้องพิจารณาในเรื่องราคา การใช้ประโยชน์ของยีสต์และผลต่อการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ประกอบกับส่วนพวกไนเตรตและไนไตรท์ เชื้อจุลินทรีย์จะสามารถใช้ได้ในการเข้าสู่เซลล์ของ ammonium ions ของจุลินทรีย์นั้นจะเข้าสู่เซลล์โดย K^+ -carrier system และจะแตกตัวเป็น glutamate และ glutamine ก่อนที่จะรวมกันเข้ากับ amino acid และ nucleotides ตัวอื่นๆ ส่วน ammonium hydroxide และยูเรียจะเข้าสู่เซลล์โดยผ่านแบบธรรมดา แล้วถูก hydrolyzed โดย enzyme urea aminolyase ให้กลายเป็น ammonia และ CO_2

3. แหล่งฟอสเฟต

ฟอสเฟต สามารถใช้ได้ในรูปแบบแคลเซียมซูเปอร์ฟอสเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต หรือกรดฟอสฟอริก ขึ้นอยู่กับความยากง่ายของการจัดหา ความบริสุทธิ์ของสารที่ใช้ และความสะดวกในการนำมาใช้ (Rose และ Harrison, 1970) เซลล์จุลินทรีย์จะดูดซึมสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตได้ดีกว่า ไดไฮเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Rose และ Harrison, 1971; Rosen, 1968) รายงานว่า ฟอสเฟตเป็นแร่ธาตุอาหารที่สำคัญ และอาจจะเติมในรูปแบบไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แคลเซียมแอสซิฟอสเฟต กรดฟอสฟอริก หรือรูปอื่นๆ นอกจากนี้บางประเทศใช้ซูเปอร์ฟอสเฟต ซึ่งราคาถูกแต่เนื่องจากซูเปอร์ฟอสเฟตมีฟลูออไรด์อยู่จำนวนหนึ่งซึ่งเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ จึงมักนิยมใช้ไดไฮเดียมฟอสเฟตแทน (Rosen, 1968) มีรายงานว่า กากน้ำตาลแทบทุกชนิดขาดไนโตรเจน และฟอสเฟต ซึ่งฟอสเฟตที่มีส่วนใหญ่อยู่นิรูปสารอินทรีย์ แต่บางส่วนจะรวมอยู่ในสารอินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (White, 1954) ดังนั้น ในทางอุตสาหกรรมทางการค้าจึงมักเติมลงไปในรูปแบบแอมโมเนียมฟอสเฟต อัลคาไลน์ฟอสเฟต โพแทสเซียมฟอสเฟต และโซเดียมฟอสเฟต นอกจากนี้รายงานยังกล่าวถึงปริมาณฟอสเฟตที่จุลินทรีย์ต้องการยังขึ้นกับปริมาณไนโตรเจนด้วย จุลินทรีย์ที่มีไนโตรเจนสูงจะต้องการฟอสเฟตมากขึ้นด้วย (Reed และ Peppler, 1973) ปริมาณฟอสเฟต (P_2O_5) ในเซลล์จะอยู่ในช่วงร้อยละ 1.4-5.0 ของน้ำหนักแห้ง และในจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงร้อยละ 1.8-3.5 ฟอสฟอรัสมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์จุลินทรีย์ เพราะมีส่วนเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของเซลล์ และจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายเมื่อมีแหล่งพลังงาน เช่น กลูโคส สารเมตาฟอสเฟตจะถูกเก็บในเซลล์ในรูป phosphate energy ได้มากกว่าในรูปแบบ polyphosphate

4. ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารอื่นๆ ที่จะเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้แก่ โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม (Rosen, 1968) ส่วนธาตุอาหารที่จำเป็นในปริมาณน้อยบางชนิด (minor element) ได้แก่

สังกะสี, เหล็กและทองแดง ซึ่งธาตุเหล่านี้มักมีอยู่แล้วอย่างเพียงพอในกากน้ำตาล ยกเว้นแมกนีเซียม ซึ่งอาจเติมไปในรูปของ $MgSO_4$ ในกากน้ำตาลเพื่อให้เพียงพอ (Reed และ Peppler, 1973)

โพแทสเซียมและโซเดียมไอออนของธาตุทั้งสองจะเข้าสู่เซลล์โดยการ active transport ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ หากในอาหารไม่มีโพแทสเซียม ไอออน เซลล์จะไม่สามารถดูดซึมฟอสเฟตได้

แมกนีเซียม และแคลเซียมไอออนทั้งสองจะเข้าสู่เซลล์ด้วยการ active transport โดยการใช้ ATP เช่นเดียวกับการนำโพแทสเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ และยังขึ้นกับปริมาณออกซิเจนด้วย ความสำคัญของแมกนีเซียมไอออนมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และ cellular activities ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น enzyme activator ในขณะที่แคลเซียมไอออนมีความจำเป็นต่อการเจริญ น้อยกว่า

ซัลเฟอร์มักถูกใช้ในรูปแบบของซัลเฟต และนำเข้าสู่เซลล์โดยการ active transport ซึ่งจะผ่านเข้าไปในเซลล์ได้มาก ถ้ามีกลูโคสในอาหารเพียงพอ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ซัลไฟด์, ไทโอซัลเฟต, เมทไทโอนีน และกลูคาไทโอนแทนได้เช่นกัน

สำหรับ trace element นั้นทำหน้าที่เป็น catalyst หรือ activators ซึ่งขึ้นอยู่กับระบบ เอนไซม์ และวิตามิน แร่ธาตุที่มี 2 ประจุ เช่น Ba^{2+} , Au^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , และ Cu^{2+} สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวเซลล์ได้อย่างรวดเร็วโดยการรวมตัวเข้ากับหมู่ฟอสเฟตและคาร์บอกซิลที่ผิวเซลล์ (Chen และ Chiger, 1985)

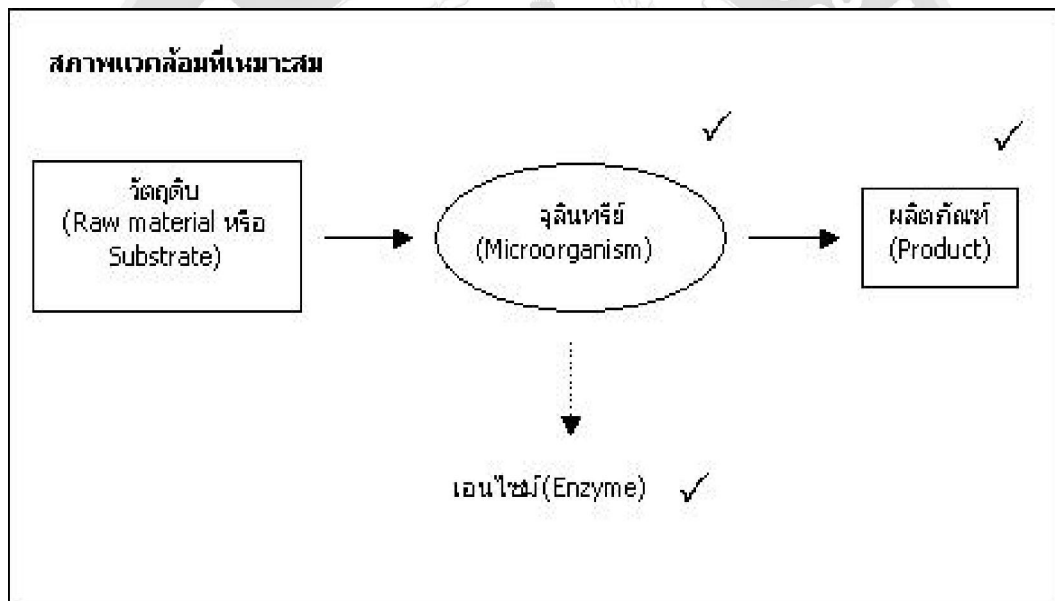
5. แหล่งวิตามิน

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ต้องการวิตามินสำหรับการเจริญเติบโต (growth substance) ซึ่งมี biotin, pantothenic acid และ inositol (Henry, 1976) ในกากน้ำตาลมีสารเหล่านี้อยู่บ้างโดยเฉพาะกากน้ำตาลอ้อยมีอยู่มาก (Rosen, 1968) ต่อมาพบว่า thiamin ทำให้ผลผลิตจุลินทรีย์ลดลง ปริมาณ growth substance ที่ต้องการภายใต้สภาวะที่มีอากาศอย่างเพียงพอจะเป็น 0.25 กรัม ไบโอติน 12 กรัม pantothenic acid และ 300 กรัม inositol ต่อกรัมของจุลินทรีย์แห้ง เนื่องจากปริมาณสารอาหารที่ให้โดยเฉพาะคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่จะเป็นผลต่อคุณสมบัติของจุลินทรีย์เพื่อจะให้ได้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องรักษาอัตราส่วนระหว่างกากน้ำตาล ฟอสเฟต และไนโตรเจนที่ป้อนให้ถูกต้อง (Matsuda, 1961; Burrows, 1970)

ไบโอตินถูกนำเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์โดยการ carrier transport system และขึ้นกับสภาวะการเจริญเติบโตของยีสต์ การให้อากาศปริมาณที่มากขึ้นจะทำให้ความต้องการไบโอตินลดลงและถ้ามียูเรียเพียงพอความต้องการไบโอตินก็จะลดลงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถใช้ biocytin, biotine-D-sulfoxide และ D-biotin methyl ester แทนไบโอตินได้

การออกแบบและสร้างถังหมักผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์

การหมัก เป็นเทคโนโลยีแห่งการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ เป็นศาสตร์แห่งการประมวลเอา วิชาความรู้ในแขนงต่างๆ มาพัฒนาในการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ เรียกว่า “เทคโนโลยีชีวภาพ” (Biotechnology) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพหรือถังหมัก (fermenter) เป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้สภาวะการหมัก (condition) นั้นเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ ทำให้ได้จุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์จาก จุลินทรีย์นั้นเป็นไปตามความต้องการและตอบสนองทั้งในเชิงเศรษฐศาสตร์, เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ นั่นก็คือจากกระบวนการหมักสุดท้ายแล้วจะได้ผลิตผล (product or output) ที่มีคุณภาพ ไม่มีสิ่งอื่นใดเจือปน ได้ปริมาณมาก และต้นทุนต่ำ, คุ่มค่า นำไปประยุกต์ใช้กับการเกษตรและสิ่งแวดล้อมได้ดี โดยที่เกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปสามารถปฏิบัติงานได้เอง



ภาพที่ 8 สภาวะการหมักจุลินทรีย์

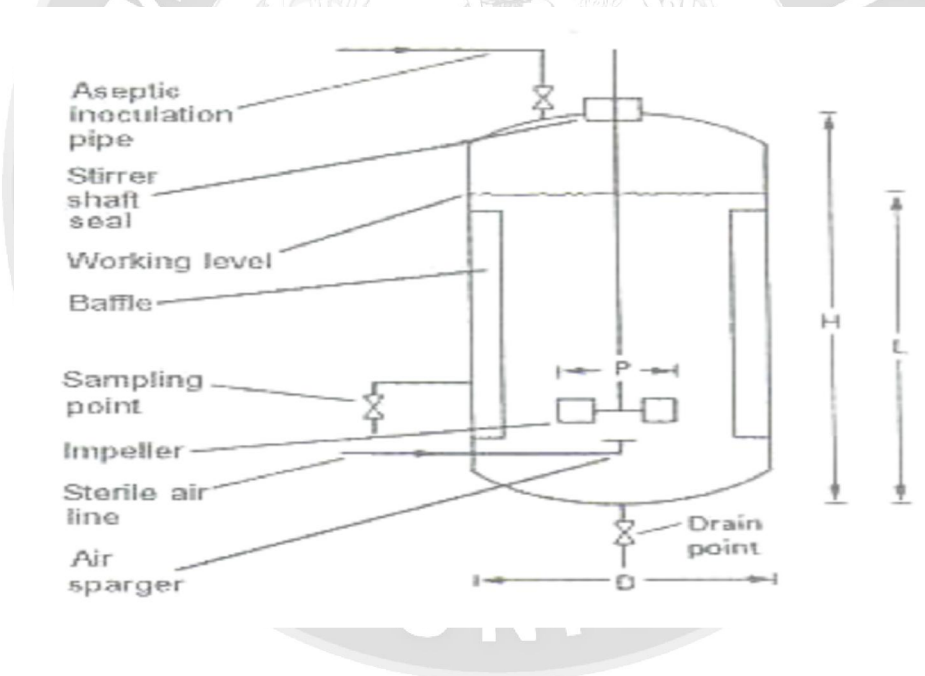
ที่มา : มอลินี อัสวดิษฐเลิศ หน่วยบริหารจัดการความรู้

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ : ไบโอเทค (ระบบออนไลน์)

การออกแบบถังหมักที่ดีนั้นต้องใช้ความรู้ในด้านต่างๆ หลายสาขาวิชา คือ จุลชีววิทยา ชีววิทยา ชีวเคมี พันธุศาสตร์ รวมถึงศาสตร์อื่น เช่น วิศวกรรมศาสตร์ เกษตรศาสตร์ แพทยศาสตร์ คอมพิวเตอร์และเศรษฐศาสตร์ เป็นต้น เพื่อนำสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กนี้มาประยุกต์ให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษย์ โดยครอบคลุมตั้งแต่เทคโนโลยีที่ใช้ในการเกษตรกรรม จนถึงการผลิตยารักษาโรค เริ่มตั้งแต่

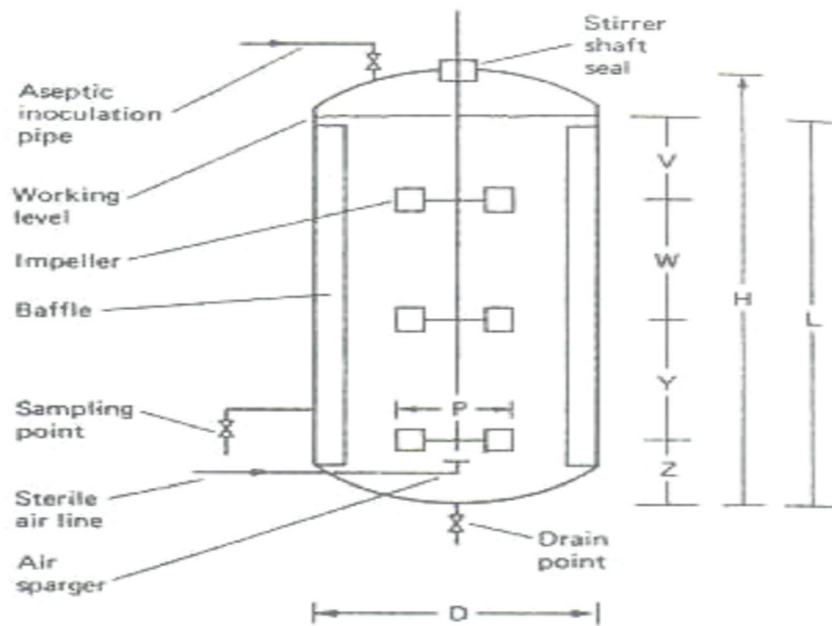
เทคโนโลยีค่อนข้างง่าย เช่น การทำน้ำปลา ซีอิ๊ว แหนม จนถึงเทคโนโลยีที่อาศัยกระบวนการหลายขั้นตอน เช่น การออกแบบและใช้ความรู้ทางวิศวกรรมเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติพิเศษตามที่ต้องการที่ไม่อาจผลิตได้ตามธรรมชาติ แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการออกแบบถึงหมักกันหลายรูปแบบ แต่ก็มีเพียงไม่กี่แบบเท่านั้นที่ประยุกต์ใช้ได้ดี นอกจากนี้ราคายังค่อนข้างสูงมากหากเทียบกับการที่เกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปต้องการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ ระบบการทำงานยังซับซ้อน การซ่อมบำรุงเองทำได้ยาก รวมถึงปริมาณการผลิตต่อครั้งต่อหน่วยยังไม่มากพอที่จะตอบสนองทั้งในเชิงเศรษฐศาสตร์, เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

การออกแบบถึงหมักมีหลายรูปแบบ แต่มีเพียงไม่กี่แบบที่ใช้ได้ดีกับกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศในระดับอุตสาหกรรม แบบถึงหมักที่นิยมใช้กันมากที่สุด ได้แก่ ถึงหมักรูปทรงกระบอกตั้งที่มีใบพัดสำหรับกวนผสมและมีท่อให้อากาศทางด้านล่างใต้ใบพัด ตัวอย่างถึงหมักที่ประกอบด้วยใบพัด 2 ชุด (ภาพที่ 9) ตัวอย่างถึงหมักที่ประกอบด้วยใบพัด 3 ชุด (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ถึงหมักที่ประกอบด้วยใบพัดชุดเดียว

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1984



ภาพที่ 10 ถังหมักที่ประกอบด้วยใบพัด 3 ชุด

ที่มา : Stanbury and Whitaker, 1984

หน้าที่สำคัญของถังหมัก ได้แก่ การทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการ การออกแบบถังหมักเพื่อใช้ในกระบวนการหมักแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไปบ้าง แต่โดยทั่วไปจะต้องมีสมบัติพื้นฐานดังนี้คือ

1. มีความแข็งแรง ทนความร้อนและความดันได้สูง
2. มีระบบการให้อากาศ การกวนผสม และการควบคุมฟอง ที่ดี
3. มีระบบควบคุมอุณหภูมิ และ pH
4. มีที่เก็บตัวอย่างจากถังหมักได้สะดวก โดยไม่เกิดการปนเปื้อน
5. มีการสูญเสียเนื่องจากการระเหยจากถังหมักได้น้อย
6. มีรูปแบบการควบคุมการทำงาน การเก็บเกี่ยวผลผลิต การทำความสะอาดและการบำรุงรักษาง่าย ใช้แรงงานน้อย
7. ควรใช้กับกระบวนการหมักได้หลายชนิด
8. อยู่ในสภาพปลอดภัยในขณะใช้งานได้เป็นเวลานาน
9. ทนต่อการกัดกร่อน และไม่เป็นพิษ
10. ด้านในของถังควรมีผิวเรียบ ตัวถังทำจากวัสดุราคาถูกที่สุด แต่มีคุณภาพตามต้องการ

การให้อากาศ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ส่วนการกวน มีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารภายในถังหมักกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ การเลือกใช้ระบบการให้อากาศและการกวนแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก ในกระบวนการหมักที่ใช้ของเหลวความหนืดต่ำและมีปริมาณของแข็งทั้งหมดน้อย สามารถใช้ระบบให้อากาศเป็นฟองเล็กๆ (fine bubble aerator) ได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องกวนมีข้อดีคือใช้อุปกรณ์น้อยกว่าและประหยัดพลังงาน ปกตินิยมใช้กับถังหมักที่มีอัตราส่วนความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลาง (HD ratio) 5:1 เพราะการให้อากาศเพียงอย่างเดียวก็ทำให้เกิดแรงหมุนวนของน้ำมากพอที่จะทำให้เกิดการกวนผสมได้เพียงพอ อาหารที่มีความหนืดสูงจำเป็นต้องใช้เครื่องกวนช่วย แต่เครื่องกวนค่อนข้างไม่จำเป็นสำหรับถังหมักที่ต้องการเพาะเลี้ยงยีสต์หรือจุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสีย

ระบบให้อากาศ หมายถึงอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่นำอากาศเข้าสู่ของเหลวภายในถังหมัก มีส่วนประกอบ ที่สำคัญคือ เครื่องสูบลอากาศ เครื่องกรองอากาศและหัวจ่าย (air sparger) การออกแบบหัวจ่ายอากาศเพื่อให้ได้ฟองอากาศที่มีขนาดเริ่มต้นตามความต้องการนั้น จำเป็นต้องทราบว่า จะใช้ระบบให้อากาศเพียงอย่างเดียวหรือใช้กับเครื่องกวนหัวจ่ายอากาศที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปมี 4 แบบ คือ porous sparger, orifice sparger, nozzle sparger และ combined sparger-agitator

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อัจฉราและคณะ (2546) ได้ศึกษาการผลิตขยายเชื้อ *Bacillus thuringiensis* โดยใช้ปลาน้ำ (fish soluble extract) จากโรงงานผลิตปลากระป๋องและ dextrose ในถัง fermenter ขนาดจุ 500 ลิตร การทดลองใช้ปลาน้ำ และ dextrose เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 5 สูตร พบว่า การใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 23.67, 25.33, 24.00, 25.00 และ 26.67 ชั่วโมงตามลำดับ ระยะเวลาสร้างสปอร์และสารพิษ 28.67, 30.33, 29.00, 30.00 และ 32.67 ชั่วโมงตามลำดับ สปอร์มีน้ำหนักแห้ง 3.41, 3.47, 4.25, 4.67 และ 4.18 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณสปอร์ 23.89×10^6 , 44.76×10^6 , 30.54×10^6 , 37.09×10^6 และ 31.83×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ได้ทำการทดลองโดยเพิ่มเติม dextrose หลังจากปลูกเชื้อจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ปลาน้ำ/dextrose อัตรา 12/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ไม่เติม dextrose, ปลาน้ำ/dextrose 12/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose 1 ก.ก. 2 ครั้ง ที่ 5 และ 7 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ, ปลาน้ำ/dextrose 15/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose อัตรา 1 ก.ก. 3 ครั้ง ที่ 5, 7 และ 9 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อ, ปลาน้ำ/dextrose 15/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose 5 ครั้ง ที่ 5, 7, 9, 11 และ 13 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ใช้ระยะเวลาเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุด 23.33, 23.33, 24.00 และ 27.66 ชั่วโมง ระยะเวลาที่ใช้สร้างสปอร์และสารพิษ 29.33, 28.66, 31.00 และ 33.00 ชั่วโมงตามลำดับ ให้ผลผลิตสปอร์ 38.22×10^6 , 44.76×10^6 , 53.35×10^6 และ 66.63×10^6 เซลล์/มิลลิลิตรตามลำดับ ได้น้ำหนักแห้งของผลผลิต 4.10, 4.24, 4.65 และ 4.93 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

การทดลองเพื่อศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 แบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous culture) โดยเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 ลิตรในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 40 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อ 24 ลิตร เหลือเชื้อไว้ปริมาณ 1 ลิตร เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 24 ลิตรเข้าไปเลี้ยงเชื้อต่ออีก จนถึงชั่วโมงที่ 72 เก็บเชื้อ และเติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เช่นเดิม เลี้ยงเชื้อต่ออีกจนถึงชั่วโมงที่ 96 เก็บเชื้อทั้งหมด ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง มาตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อเป็นเปอร์เซ็นต์ packed cell volume (% PCV) พบว่าจะได้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 3.6 เปอร์เซ็นต์ หลังการเลี้ยงเชื้อชั่วโมงที่ 38 ชั่วโมงที่ 72 และชั่วโมงที่ 96 นำเชื้อจากการเก็บชั่วโมงที่ 48 ชั่วโมงที่ 72 และชั่วโมงที่ 96 และเชื้อจากการนำทั้งสามตัวอย่างรวมกัน เตรียมเป็นแอนติเจนชนิดโรสเบงกอล แอนติเจนชนิดทดสอบบนแผ่นกระຈก และแอนติเจนชนิดทดสอบในหลอดแก้ว ทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (agglutination) กับซีรัมเปรียบเทียบกับแอนติเจนที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิตโดยเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (batch culture) พบว่าคุณภาพของแอนติเจนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียวและกึ่งต่อเนื่องเท่าเทียมกัน

สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ผลิตแอนติเจนบรูเซลล่าชนิดโรสเบงกอล แอนติเจนบรูเซลล่าชนิดทดสอบบนแผ่นกระຈก และแอนติเจนบรูเซลล่าชนิดทดสอบในหลอดแก้ว ตามวิธีมาตรฐานของ Office International des Epizooties, OIE, (2000) สำหรับใช้ทดสอบกับซีรัมโค กระบือ เพื่อวินิจฉัยโรคแท้งติดต่อที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Brucella abortus* โดยการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบคราวเดียว (batch culture) ซึ่งทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด เมื่อใส่เชื้อที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปในระบบแล้ว จะไม่มีการเติมสารอาหารใดๆ เพิ่มลงไปอีก (สมใจ, 2545) การผลิตแอนติเจนบรูเซลล่า ใช้เวลาในการเตรียม seed สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ 8 วัน และเลี้ยงเชื้อในถังนาน 48 ชั่วโมงต่อชุด ซึ่งในการเลี้ยงแต่ละครั้งได้แอนติเจนปริมาณน้อย ดังนั้นจึงต้องเลี้ยงเชื้อหลายๆ ชุด เพื่อให้ได้ปริมาณแอนติเจนเพียงพอสำหรับการผลิต 1 ชุดบรรจุ และในการเลี้ยงแต่ละชุดจำเป็นต้องเตรียม seed ใหม่ และเตรียมถังเลี้ยงเชื้อให้ปราศจากเชื้อ (sterile) ทุกครั้ง การทดลองนี้เป็นการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 แบบกึ่งต่อเนื่องซึ่งคล้ายการเลี้ยงเชื้อแบบ batch culture แต่เมื่อความเข้มข้นของเชื้ออยู่ในระดับที่ต้องการแล้ว เก็บเชื้อประมาณ 24/25 แล้วเติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณเท่าเดิม โดยมีเชื้อปริมาณ 1/25 ที่เหลือเป็นเชื้อเริ่มต้น วิธีการนี้นิยมกับการศึกษาจุลินทรีย์โดยไม่จำเป็นต้องเตรียม seed และถังเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกครั้งซึ่งเป็นการประหยัดพลังงาน แรงงานและเวลา (อนันต์และคณะ)

การวิจัยเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบของกลุ่มจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ และศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่างในระดับขวดเยาะกับในถังหมักขนาด 3 ลิตร โดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ และ

สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รวม 4 ชนิดคือ *Bacillus* sp. B 3 – 1, *Pseudomonas* sp. C 1 – 2 , *Yarrowia* sp. D 2 – 1 และ *Acinetobacter calcoaceticus* TISTR 360 , ทำการทดลองในถังหมัก (Fermenter) รูปสี่เหลี่ยมขนาด 3 ลิตร โดยมีการศึกษาปัจจัยแปรผันต่าง ๆ ได้แก่ อัตราส่วนของหัวเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการให้อากาศ และการเติมสารอาหารแก่ระบบ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบ (น้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในอาหาร BH broth 3 ลิตร) ได้ดีที่สุด คือ ที่สภาวะอัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้กับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ เท่ากับ 2 : 1 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 8.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 v.v.m. (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที) โดยที่การเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีกว่าเมื่อไม่มีการเติมสารอาหาร เฉลี่ยเท่ากับ 97.91 เปอร์เซ็นต์ และ 90.88 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่างในระดับถังหมักขนาด 3 ลิตร กับในระดับขวดเขย่าที่สภาวะเดียวกัน ภายในระยะเวลา 7 วัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภัทรา, ระบบออนไลน์)

การศึกษาวิจัยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกในถังหมักให้ได้ปริมาณมากและต้นทุนต่ำ เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* CR1T5 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียที่ดีเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิด (*Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* และ *Streptococcus* sp.) ที่ใช้ในการทดสอบได้ จึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในระดับฟลasks เขย่า ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 6.5 เมื่อมีการเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เมื่อทำการแทนที่น้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ด้วยกากน้ำตาล พบว่าเชื้อ CR1T5 เจริญได้ดีที่สุดใน MRS medium ที่มีกากน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการแทนที่ peptone และ meat extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ด้วยนมผงพร่องมันเนย พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดเมื่อมีนมผงเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ได้ไปปรับใช้กับการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก พบว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยนมสดพร่องมันเนยที่เติม yeast extract ด้วย 0.4 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 6.5 และอัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีเมื่อนำเชื้อมาทำเป็นผงแห้งพบว่าเชื้อสามารถทนต่อกระบวนการ lyophilization ได้ดี เชื้อผงที่เก็บเป็นเวลา 1 เดือนในตู้เย็นยังคงอัตราการรอดชีวิตเท่าเดิม แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้อง เชื้อตายลงประมาณ 2 log number โดยยังคงเหลือเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ไม่ต่ำกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรซึ่งมีปริมาณมากพอที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ (อติภัทรและคณะ, 2547)

การศึกษาแนวทางการสร้างและออกแบบถังหมักก๊าซชีวภาพจากเศษอาหารสำหรับครัวเรือน เพื่อสร้างและออกแบบถังหมักก๊าซชีวภาพจากเศษอาหารในการผลิตก๊าซชีวภาพเพื่อเป็นพลังงานทดแทนก๊าซหุงต้มที่ใช้ในปัจจุบัน โดยได้สร้างถังหมักก๊าซขนาด 60 ลิตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 34.76 เซนติเมตร สูง 52 เซนติเมตรโดยคำนึงถึงความเหมาะสมสำหรับชุมชน การประหยัดทางด้านการลงทุน มีอายุการใช้งานที่ยาวนาน บำรุงรักษาง่าย มีความปลอดภัยในการใช้งาน และผู้ทำการหมักก๊าซชีวภาพจากขยะเศษอาหารนั้น หลังจากการปฏิบัติการต้องไม่เกิดการเจ็บป่วย ดังนั้น ถังหมักก๊าซชีวภาพจากขยะเศษอาหารสำหรับชุมชนจะต้องมีลักษณะและขนาดของถังว่ามีความเหมาะสมกับสภาพของชุมชน ระบบการนำก๊าซที่เกิดขึ้นมาใช้ ระบบการคลุกเคล้าหรือการทำให้ขยะเศษอาหารที่อยู่ในถังหมักมีการเคลื่อนให้ทุกส่วนมีการผสมเข้ากันได้ ความดันที่จะเกิดขึ้น ท่อส่งก๊าซ กลิ่นที่เกิดขึ้นและระบบการจัดเก็บก๊าซที่เกิดขึ้น และทำการทดสอบการหมักเศษอาหารโดยเริ่มต้นจากน้ำเชื้อจากมูลสุกร และใส่เศษอาหารเข้าไปในถังหมักวันละ 1 กิโลกรัมและวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน จากการศึกษาพบว่าเศษอาหารในถังหมัก 1 กิโลกรัมสามารถผลิตก๊าซชีวภาพออกมาได้เฉลี่ย 5,800 ลูกบาศก์เซนติเมตรและนำก๊าซที่ได้ไปตรวจสอบองค์ประกอบของก๊าซโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph พบว่าก๊าซชีวภาพมีองค์ประกอบดังนี้ คือ ก๊าซมีเทน (CH_4) 42.76 เปอร์เซ็นต์, คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 38.0 เปอร์เซ็นต์, ไนโตรเจน (N_2) 19.2 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซอื่นๆ อีก 0.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถนำก๊าซชีวภาพที่ได้ไปใช้เป็นเชื้อเพลิงต่อไปได้ (ชัยวิชิตและวัชรพล, 2549)

ศึกษาการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลในขนาดถังหมัก 1,500 ลิตรแบบเพิ่มปริมาตรเป็นทวีคูณ เริ่มต้นจากความเข้มข้นของน้ำตาลอินเวิร์ทร้อยละ 16 และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RSU No.10 จำนวนเซลล์เท่ากับ 1.11×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขนาดเชื้อเท่ากับ ร้อยละ 10 พบว่าได้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 8.5 โดยปริมาตรในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนสูงสุดของยีสต์ระดับ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการขยายสู่การหมักขนาด 1,500 ลิตรแบบต่อเนื่องสองถัง ได้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 8.0 โดยปริมาตรในชั่วโมงการหมักที่ 8 มีจำนวนเซลล์เป็นเท่ากับ 1.53×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อัตราผลผลิตเท่ากับ 7.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับร้อยละ 78 โดยระบบยังคงมีความเสถียรมากกว่าหนึ่งสัปดาห์ (ยุพกนิษฐ พวงวีระกุล, ระบบออนไลน์)

การทำปุ๋ยหมักจากเศษขยะที่เป็นสารอินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศ วัสดุที่ใช้คือเศษอาหารผสมกับฟางและขยะที่เป็นสารอินทรีย์ (ไม่รวมเศษอาหาร) ผสมกับตะกอนจากบ่อเกรอะที่ค่ายทหารสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา ซึ่งในการทดลองครั้งนี้มีถังหมักทั้งหมด 8 ถัง แต่ละถังมีขนาด $1.0 \times 0.5 \times 0.5$ เมตร โดยถังหมัก 4 ถังใช้สำหรับการหมักเศษอาหารผสมกับฟาง ส่วนอีก 4 ถังใช้สำหรับการหมักขยะที่เป็นสารอินทรีย์ (ไม่รวมเศษอาหาร) ผสมกับตะกอนจากบ่อเกรอะเศษขยะที่เป็นสารอินทรีย์ที่ได้จาก

การคัดแยกขยะที่หลุมฝังกลบขยะของค่ายทหารสุนารี่ อัตราการผสมระหว่างเศษอาหารกับฟาง คือ 1/0.4 โดยปริมาตร หรือคิดเป็น 1/4.77 โดยน้ำหนัก ส่วนอัตราการผสมระหว่างสารอินทรีย์กับตะกอนจากบ่อเกรอะ คือ 1/7.06 โดยปริมาตร หรือคิดเป็น 1/1.58 โดยน้ำหนัก การทดลองนี้ทำการทดลองทั้งหมด 4 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้เวลานานทั้งหมด 90 วัน ส่วนอีก 3 การทดลองใช้เวลาทั้งหมด 100 วัน โดยกำหนดให้อัตราส่วนเริ่มต้นของคาร์บอน/ไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 28-31/1 มีการวิเคราะห์ทางฟิสิกส์ ทางเคมี และการวิเคราะห์หาแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform bacteria) ตลอดจนการทดลองส่วนการสิ้นสุดการทดลองพิจารณาจากอุณหภูมิภายในถังหมักมีค่าเท่ากับอุณหภูมิบรรยากาศ, อัตราส่วนสุดท้ายของคาร์บอน/ไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 15-20/1, วัสดุในถังหมักมีสีดำ, ของแข็งระเหยมีค่าต่ำและมีอัตราการตายของแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมด 99% จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าเศษอาหารผสมกับฟางทำให้เกิดอุณหภูมิสูงสุดภายในถังหมักเท่ากับ 52-56 องศาเซลเซียส ส่วนขยะที่เป็นสารอินทรีย์ (ไม่รวมเศษอาหาร) ผสมกับตะกอนจากบ่อเกรอะทำให้เกิดอุณหภูมิสูงสุดภายในถังหมักเท่ากับ 55-60 องศาเซลเซียส อัตราส่วนสุดท้ายของคาร์บอน/ไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 14-19/1 อัตราการตายของแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดมีค่า 99.98 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเศษอาหารผสมกับฟาง และ 99.99 เปอร์เซ็นต์ สำหรับขยะที่เป็นสารอินทรีย์ (ไม่รวมเศษอาหาร) ผสมกับตะกอนจากบ่อเกรอะซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำปุ๋ยหมักและเป็นวิธีที่ประหยัดและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม (สุดธิดา, 2545)

การผลิตแอลฟา-อะไมเลสโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่าและถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องขนาด 5 ลิตร สูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ระดับขวดเขย่าประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ KH₂PO₄ 0.3 เปอร์เซ็นต์(w/v), MgSO₄·7H₂O 0.02 เปอร์เซ็นต์(w/v) และ CaC₁₂H₂₂O₁₁ 0.017 เปอร์เซ็นต์(w/v) ภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 rpm การผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 5 ลิตร มีสูตรอาหารเหมือนกับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า โดยมีภาวะควบคุมเพิ่มเติมคือปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 (v/v) และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm การกรองด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันและตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟตทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.5 เท่า เอนไซม์ที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 และ 60 องศาเซลเซียส เมื่อต้มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งที่เวลา 35 นาที และ 60 นาที เมื่อไม่มีการเติม และเติมแคลเซียมคลอไรด์ 5 mM ตามลำดับค่า Km และ Vmax ของการย่อยแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 0.64 mg/ml และ 2.78 x

10⁻² nmol/min เอนไซม์ผงและเอนไซม์เหลวสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส โดยสูญเสียแอกติวิตีเพียงเล็กน้อยเมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 8 เดือน *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีนได้ปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีนคือ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5เปอร์เซ็นต์(v/v) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1vvm อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 174.82 ยูนิต/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในช่วงเวลาที่ 84 *Pseudomonas aeruginosa* สามารถผลิตไลเปสได้เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย (NH₄)₂SO₄ 0.13เปอร์เซ็นต์ (w/v), Fructose 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v), K₂HPO₄ 0.09 เปอร์เซ็นต์ (w/v) KH₂PO₄ 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v), MgSO₄·7H₂O 0.02 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ Yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในปริมาตรทั้งสิ้น 4 ลิตร ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักในการผลิตไลเปสคือ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงสุด 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 48 นำเอนไซม์มากรองด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน และทำให้เป็นผงด้วยวิธี ไลโอไฟไลเซชัน ได้แอกติวิตีของเอนไซม์ผงเท่ากับ 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *T.reesei* สายพันธุ์ QM สายพันธุ์ C และเชื้อ *A. pullulans* พบว่า *T.reesei* สายพันธุ์ QM ผลิตเอนไซม์หลักคือเซลลูเลสได้แอกติวิตีสูงสุด 0.296 U/ml ขณะที่ไซแลนเนสเพียงเล็กน้อย (0.089 U/ml) *T.reesei* สายพันธุ์ C ผลิตเอนไซม์ผสมทั้ง 2 ได้ดีมากคือเซลลูเลสสูงที่สุด 5.365 U/ml ขณะที่ *A. pullulans* ผลิตไซแลนเนสเป็นหลักได้ถึง 7.344 (U/ml) แต่ผลิตเซลลูเลสได้ได้น้อยมากในระดับ 0.091 U/ml ดังนั้นจะเห็นได้ว่า *T.reesei* สายพันธุ์ C เหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์ผสมที่มีแอกติวิตีของทั้ง 2 เอนไซม์ได้ดีที่สุด เมื่อนำ crude enzyme มาตกตะกอนด้วย (NH₄)₂SO₄ 80เปอร์เซ็นต์ ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มี endoglucanase สูงกว่า exoglucanase และ beta-glucosidase อยู่มาก เนื่องจากเชื้อ *T.reesei* สายพันธุ์ C เป็นเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองจึงได้มีการเพิ่มกำลังการผลิตเป็นขนาด 1 ลิตร และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จาก *T.reesei* สายพันธุ์ C คือที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสดีที่สุด โดยเฉพาะ endoglucanase มีแอกติวิตีสูงที่สุด การนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ทั้งห้าชนิดมาใช้ในขั้นตอนต่าง

ๆ ในการเตรียมผ้าสำหรับการลอกแบ่ง เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้นไม่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการลอกแบ่งบนผ้าทอ จำเป็นต้องใช้เอนไซม์อะไมเลสที่สามารถลอกแบ่งที่อุณหภูมิสูงได้ ในส่วนขั้นตอนการกำจัดสิ่งสกปรกสามารถใช้เอนไซม์กำจัดสิ่งสกปรกได้ผลดีเทียบเท่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสามารถใช้น้ำเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นกำจัดสิ่งสกปรกได้ผลดีในแง่การดูดซึมน้ำเทียบเท่าการใช้เอนไซม์ที่จัดหาสำหรับการฟอก เอนไซม์ที่ใช้ฟอกผ้ายังมีประสิทธิภาพการฟอกให้ผ้าขาวไม่เท่ากับการฟอกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวที่สามารถฟอกผ้าให้ขาวได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ (นภาและคณะ, 2544)

ต้นแบบถังหมักผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์แม่ใจ (Maejo Fermenter)

ในการวิจัยส่วนนี้จะศึกษาถึงกระบวนการสภาวะการหมัก รวมถึงระบบของถังหมักเพื่อผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ชุมชนและบุคคลทั่วไปสามารถผลิตใช้เองได้ในบ้านเรือน โรงเรียน โรงแรม ตลาดสดหรือในพื้นที่ต่างๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อมโดยคำนึงถึงความเหมาะสมสำหรับชุมชน บ้านเรือนทั่วไป ราคาถูก ประหยัดงบประมาณการลงทุน มีอายุการใช้งานยาวนาน บำรุงรักษาง่าย มีความปลอดภัยและสะดวกในการใช้งาน ผู้ทำการหมักผลิตหัวเชื้อเข้าใจง่าย ไม่สิ้นเปลืองเวลาและได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณภาพที่ดีพอสมควร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปใช้ ดังนั้น ถังหมักผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับชุมชนทั่วไปจะต้องคำนึงถึงลักษณะและขนาดของถังว่ามีความเหมาะสมกับสภาพของชุมชนรวมถึงระบบการผลิตต่างๆ เช่น ระบบการเติมอากาศ ระบบการรับแหล่งน้ำเข้าถังซึ่งช่วยประหยัดเวลาและแรงงานระบบการควบคุมอุณหภูมิหรือการผสมสารอาหารกับจุลินทรีย์ในถังหมัก ระบบระบายอากาศจากภายในถังสู่ภายนอกและระบบการจัดเก็บและบรรจุหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้เหมาะสมกับชุมชนหรือบุคคลทั่วไปมีลักษณะเฉพาะดังนี้



ภาพที่ 11 ถังหมักหัวเชื้อจุลินทรีย์แม่ใจ (Maejo Fermenter)

ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดลักษณะเฉพาะของถังหมักแม่ใจ (Maejo Fermenter)

รายการ	รายละเอียด ขนาดหรือรูปร่างทางกายภาพ
ถังหมัก	เป็นถังรูปทรงกระบอกขนาดบรรจุ 2,000 ลิตรเจาะรูที่ฝาเกลียว ปิดด้านบนเพื่อติดตั้งชุดระบายอากาศสู่ภายนอก (check valve) โดยที่อากาศภายนอกไม่สามารถเข้าสู่ถังได้ ถ้าเป็นระบบเติมอากาศให้เจาะอีกหนึ่งรูบริเวณตรงกลางด้านบนของถังสำหรับต่อท่อออกซิเจนจากเครื่องผลิตออกซิเจนที่ติดตั้งอยู่ด้านบนถังเช่นกันโดยวางอยู่ตรงข้ามกับฝาเกลียวปิดของถัง
ฐานวางถังหมัก	ฐานสี่เหลี่ยมขนาดพอดีถัง สูงประมาณ 1.5 ฟุต สำหรับตั้งวางถัง และเป็นตัวติดตั้งระบบไฟฟ้าต่างๆ เพื่อใช้สำหรับการหมักและจะช่วยให้ระบบการบรรจุหัวเชื้อจุลินทรีย์หรือการนำไปใช้เพราะมีความสูงของฐานวางถังเพียงพอ
ปั้มน้ำหอยโข่งและชุดวนผสมของเหลวในถัง	ใช้เครื่องขนาด 1 แรงม้า 1 เครื่อง ออกแบบติดตั้งเพื่อรับของเหลวได้ 2 แหล่ง คือจากในตัวถังหมักเอง (ด้านล่างถัง) และจากถังผสมเล็กภายนอกเพื่อประหยัดทั้งเวลาและแรงงานในการเติมสารอาหารและหัวเชื้อทั้งช่วยวนผสมของเหลวในถังหมักแทนการกวนอีกด้วย
ถังผสม	ถังพลาสติกขนาด 150 ลิตรใช้สำหรับละลายกากน้ำตาล, ผสมสารอาหารรวมทั้งหัวเชื้อจุลินทรีย์ช่วยให้การผลิตทำได้ง่ายขึ้น โดยถังเจาะรูใส่ท่อตรงขนาด 1 นิ้วต่อกับสายยางที่เชื่อมกับท่อรับแหล่งของเหลวของเครื่องสูบน้ำ
ท่อและอุปกรณ์เสริมต่างๆ	ใช้ท่อพีวีซี (PVC) ข้อต่อ ข้องอ สามทาง เกลียวนอก เกลียวใน ฯลฯ ที่ได้มาตรฐานขนาด 1 นิ้วทั้งหมด
เครื่องผลิตออกซิเจน (ในระบบเติมอากาศ)	ใช้เครื่องผลิตออกซิเจนที่มีตัวกรองอากาศเพื่อป้องกันการปนเปื้อน และมีวาล์วปรับและระดับแสดงอัตราการให้อากาศ

จากตารางดังกล่าวข้างต้น ทำให้กำหนดคุณสมบัติและลักษณะเฉพาะต่างๆ ของถังรวมถึงระบบการติดตั้งถังหมักซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. **ถังหมัก (Fermentation tank)** เป็นถังพลาสติกที่ผลิตจากเม็ดพลาสติกคุณภาพดี เหนียว เป็นเนื้อเดียวกัน แข็งแรง หนา สีไม่ลอกละลายออกจากเนื้อถัง ทนทานต่อการกัดกร่อนของกรดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้ โดยใช้ขนาดปริมาตร 2,000 ลิตร มีฝาเกลียวปิดได้อย่างมิดชิดและมีเกลียวต่อท่อเข้า-ออกได้ 3 ทาง (สำหรับวนของเหลว (ด้านบนและด้านล่าง) และก๊อบบรจุหัวเชื้อจุลินทรีย์) และสามารถรองรับการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ได้ประมาณ 1,800 ลิตรของถังและมีอายุการใช้งาน 10 ปี

2. **ฐานวางถังหมัก (Stand)** เป็นฐานรูปทรงสี่เหลี่ยมขนาดพอดีกับถัง สูงประมาณ 1.5 ฟุต มีตารางเหล็กย่อยภายในทรงสี่เหลี่ยมเพื่อช่วยกันรองรับน้ำหนักของถังหมัก และติดตั้งสะพานไฟ ปลั๊กไฟ และสวิตช์เปิด-ปิดไว้กับด้านหน้าตัวฐาน

3. **ปั้มน้ำหยดโข่ง (Centrifugal Pump)** ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ตัวหมุนหรือตัวพัด ซึ่งจะเป็นตัวที่ทำให้ของเหลวที่อยู่ในเครื่องสูบน้ำมีการเคลื่อนที่แบบหมุน สำหรับอีกส่วนก็คือตัวเครื่องสูบน้ำเอง ซึ่งจะถูกลูกแบบให้ของเหลวหมุนอย่างเร็ว และออกจากเครื่องสูบน้ำที่มีแรงดันและความเร็วของของเหลวนี้สูงกว่าเมื่อของเหลวเข้าสู่เครื่อง ฉะนั้นท่อที่ต่อน้ำออกจากเครื่องไปยังด้านบนของถัง จะต้องรองรับความเร็วของของเหลวที่ไหลอยู่ในท่อนี้ได้ซึ่งก็คือท่อพีวีซี (PVC) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้วเครื่องสูบน้ำจะติดตั้งอยู่กับฐานของถังหมักใช้เพียง 1 เครื่อง ขนาด 1 แรงม้า ติดตั้งโดยออกแบบวาล์วให้รับแหล่งของเหลวได้ 2 ทางคือ แหล่งของเหลวจากภายนอก (ถังผสมหรือ small mixing tank) เพื่อสะดวกในการนำสารอาหาร (เช่น กากน้ำตาล, น้ำตาลทรายแดง, growth factors ฯลฯ) น้ำและหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผสมจนเข้ากันดีแล้วในถังผสมปั๊มเข้าสู่ถังหมัก อีกแหล่งหนึ่งคือของเหลวในถังหมักเองเพื่อที่จะสูบน้ำอาหารด้านล่างวนผสมไปด้านบนของถังซึ่งช่วยในการกระจายตัวของอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ และยังจะช่วยเพิ่มพื้นที่ของของเหลวในการสัมผัสกับอากาศภายในถังหมัก

4. **เครื่องผลิตออกซิเจน (Oxygen Producing Machine)** ติดตั้งอยู่ด้านบนถังเพื่อผลิตออกซิเจนป้อนเข้าในถังหมักให้จุลินทรีย์ได้ใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ใหม่ โดยต่อท่อพีวีซีจากตัวเครื่องด้านบนลงจนสุดด้านล่างถัง

5. **ถังผสม (small mixing tank)** เป็นถังพลาสติกขนาด 150 ลิตร เจาะรูใส่ท่อตรงเชื่อมต่อกับสายยาง สำหรับผสมสารอาหาร น้ำและจุลินทรีย์ให้เข้ากันก่อนปั๊มเข้าถังหมัก การผสมสารอาหารต่างๆ ในถังหมัก จะเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก ไม่สามารถปฏิบัติงานคนเดียวได้ อีกทั้งการผสมในถังหมัก สารอาหารต่างๆ เช่น กากน้ำตาลที่เหนียว, ข้น อาจละลายยาก การใช้ถังผสมเล็กจะช่วยให้ส่วนผสม

ต่างๆ เข้ากันได้เป็นอย่างดีและยังช่วยทุ่นแรง ประหยัดเวลาและแรงงานในการยกส่วนผสมขึ้นไปผสมบน
ถังหมัก

6. **ท่อและอุปกรณ์เสริมต่างๆ (Pipe and Supporting)** เป็นท่อต่อเชื่อมระหว่างจุดซึ่งใช้
ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว ประมาณ 8 เมตร นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์เสริมในการต่อ เช่น ข้อ
ต่อตรง, ข้องอ 90 องศา, สามทาง, เกลียวนอก, เกลียวนใน, วาล์วเปิด-ปิด, ข้อลด, ก๊อคน้ำ, สายยาง,
เทปพันเกลียวและกาว รวมถึงเช็ควาล์วที่ติดไว้ที่ฝาปิดถังเพื่อระบายก๊าซในถังสู่ภายนอกซึ่งช่วยไม่ให้
ถังอัดก๊าซไว้จนระเบิดและไม่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในอากาศภายนอกถัง



อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1.1 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ CONSORT รุ่น C831T
- 1.2 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) ยี่ห้อ VELP รุ่น ZX3
- 1.3 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HV-85
- 1.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น BE 500
- 1.5 ตู้อบแห้ง (Hot air oven) ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น UE 500
- 1.6 เตาให้ความร้อน (Hot plate) ยี่ห้อ VELO รุ่น ARE
- 1.7 เครื่องเขย่าสาร (Shaker) ยี่ห้อ GFL รุ่น 3020
- 1.8 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ PRECISA รุ่น XB4200C
- 1.9 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ PRECISA รุ่น XT220A
- 1.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น WB22
- 1.11 เครื่องตีปั่นตัวอย่าง (Stomacher) ยี่ห้อ INTERSCIENCE
- 1.12 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ ยี่ห้อ TKA รุ่น ROS 700
- 1.13 ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 10-100 ไมโครลิตร ยี่ห้อ SOCOREX รุ่น ACURA 825.0100
- 1.14 ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ SOCOREX รุ่น ACURA 825.0100
- 1.15 ตู้เย็น 4-10 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ MITSUBISHI รุ่น MR-F41R-SL
- 1.16 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ HETTICH รุ่น 5605
- 1.17 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ THERMO ELECTRON รุ่น EV3 130903
- 1.18 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ ยี่ห้อ GFL รุ่น 1086
- 1.19 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น BX511F
- 1.20 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิสำหรับวิเคราะห์ปฏิกิริยา ยี่ห้อ VELP รุ่น FOC 2551
- 1.21 เตาย่อยสำหรับวิเคราะห์ปฏิกิริยา ยี่ห้อ VELP รุ่น ECO6 S/N25703
- 1.22 เครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV GelDoc Transluminator) ยี่ห้อ Bio-rad
- 1.23 เครื่องพีซีอาร์ ยี่ห้อ Thermal hybrid รุ่น Sprint
- 1.24 เครื่องแก้ว

2. สารเคมี

- 2.1 เพปโตน (Peptone) บริษัท Merck, Germany
- 2.2 กลูโคส (Glucose) บริษัท Merck, Germany
- 2.3 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Merck, Germany
- 2.4 สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract) บริษัท Merck, Germany
- 2.5 ภู์น (Agar) บริษัท Merck, Germany
- 2.6 สารละลายแป้ง (Soluble starch) บริษัท Ajax, Australia
- 2.7 สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) บริษัท Merck, Germany
- 2.8 นมพร่องมันเนย (Skim milk) บริษัท Merck, Germany
- 2.9 คาร์บอกซี เมทิล เซลลูโลส (Carboxy methyl cellulose) บริษัท Sigma, USA
- 2.10 ไซแลน (Xylan) บริษัท Sigma, USA
- 2.11 แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) บริษัท J.T. Baker, USA
- 2.12 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
- 2.13 ไตรบูไทรีน (Tributyrin) บริษัท Fluka, USA
- 2.14 ไอโอดีน (I_2) บริษัท Fisher, UK
- 2.15 โพแทสเซียม ไอโอไดด์ (KI) บริษัท Merck, Germany
- 2.16 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท J.T. Baker, USA
- 2.17 คองโก เรด (Congo red) บริษัท Ajax, Australia
- 2.18 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
- 2.19 3,5-ไดไนโตรซาลิซิลิก แอซิด ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) บริษัท Fluka, USA
- 2.20 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
- 2.21 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
- 2.22 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Panreac Quimica, Spain
- 2.23 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Merck, Germany
- 2.24 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
- 2.25 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) บริษัท Fluka, USA
- 2.26 เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
- 2.27 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
- 2.28 โพแทสเซียมไดโครเมต ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) บริษัท Merck, Germany

- 2.29 ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
- 2.30 1, 10-พีนานโทลีนโมโนไฮเดรต ($1,10\text{-C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Sigma, USA
- 2.31 เมอคิวรัสซัลเฟต (HgSO_4) บริษัท Merck, Germany
- 2.32 เพอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
- 2.33 เพอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$] บริษัท Merck, Germany
- 2.34 ผงวุ้นอะกาโรส บริษัท Fluka, USA
- 2.35 สารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$) บริษัท Fluka, USA
- 2.36 เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) บริษัท Merck, Germany
- 2.37 ชุดย้อมสีแกรม (gram's stain set) บริษัท Bio-Medical Laboratory, ประเทศไทย
- 2.38 Master mix บริษัท Eppendorf, USA
- 2.39 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' บริษัท Operon, Germany
- 2.40 520R 5'-ACCGCGGCKCCTCCC-3' บริษัท Operon, Germany
- 2.41 UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit บริษัท MO BIO Laboratories, USA
- 2.42 TaKaRa SUPREC™-PCR บริษัท Takara, Japan
- 2.43 loading dye บริษัท Fermentas LIFE SCIENCES, USA
- 2.44 O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to use บริษัท Fermentas LIFE SCIENCES, USA

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลโล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS broth) บริษัท Merck, Germany
- 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Trypticase soy broth) บริษัท Merck, Germany
- 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Trypticase soy broth) บริษัท Merck, Germany
- 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเทรียนท์ (Nutrient broth) บริษัท Merck, Germany
- 3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์ (Nutrient agar) บริษัท Merck, Germany
- 3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโพเทโท เด็กซ์โตรส (Potato dextrose broth) บริษัท Difco Laboratories, USA
- 3.7 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโพเทโท เด็กซ์โตรส (Potato dextrose agar) บริษัท Merck, Germany

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย

1.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่าง

นำตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ มาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ถ่ายสารละลายความเข้มข้นดังกล่าวลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar, MRS agar, trypticase soy agar, potato dextrose agar และ yeast extract malt extract agar จานละ 1 มิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำ 2 ซ้ำ แต่ละความเจือจาง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีดลาก (streak) บนอาหารแข็งที่คัดแยกได้ จนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ และเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในอาหารแข็งเลี้ยง

1.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารประกอบ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีน แบ่ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส สามารถทำได้ดังต่อไปนี้

1.2.1 การแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้โดยการใช้ skim milk เป็นตัวแทน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยการเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน เก็บเชื้อที่เจริญได้ดีและรอบ ๆ โคโลนีมีบริเวณใส และมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เก็บไว้ในอาหารเดิมที่ทำอาหารแข็งเลี้ยงไว้

1.2.2 การแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายแป้งได้ โดยการใช้ starch เป็นตัวแทน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยการเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน เก็บเชื้อที่เจริญได้ดีและมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เก็บไว้ในอาหารเดิมที่ทำอาหารแข็งเลี้ยงไว้ และตรวจผลการย่อยสลายแป้งโดยการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนโคโลนี ถ้าเกิดบริเวณใส แสดงว่ามีการย่อยสลายแป้งได้

1.2.3 การแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายไขมันได้ โดยการใช้ tributyrin เป็นตัวแทน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยการเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน เก็บเชื้อที่เจริญได้ดีและรอบ ๆ โคโลนีมีบริเวณใส และมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เก็บไว้ในอาหารเดิมที่ทำ slant ไว้

1.2.4 การแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ โดยใช้ carboxy methyl cellulose เป็นตัวแทน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน เก็บเชื้อที่เจริญได้ดีและมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันไว้ในอาหารเดิมที่ทำอาหารแข็งিয়েไว้ แล้วตรวจผลการย่อยสลายเซลลูโลส โดยการย้อมสีโคโลนีด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ คองโกเรด แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียม คลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วนำไปอบในโหลที่มีไอของคลอโรฟอร์มอยู่ นาน 15 นาที สังเกตการเกิดบริเวณสีเหลืองรอบโคโลนี ซึ่งแสดงว่ามีการย่อยสลายเซลลูโลส

1.2.5 การแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ โดยใช้ไซแลนเป็นตัวแทน

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส โดยการเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ xylan agar (ภาคผนวก ก) นาน 3 วัน เก็บเชื้อที่เจริญได้ดีและมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เก็บไว้ในอาหารเดิมที่ทำอาหารแข็งিয়েไว้แล้ว ตรวจผลการย่อยสลายไซแลนโดยการหยดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข) ลงบนโคโลนี ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่ามีการย่อยสลายไซแลนได้

1.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารประกอบ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ทำได้โดยการวัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและบริเวณที่มีการย่อยสลายสารประกอบรอบโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

1.4 การทดสอบกิจกรรมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการบำบัดขยะ

เพาะกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากแต่ละไอโซเลตมาเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาชั่งน้ำหนัก 0.10 มิลลิกรัม ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแขวนลอยเซลล์ที่ได้ไปเติมในส่วนผสมของขยะเปียกและขยะแห้ง (อัตราส่วน 2 : 1 โดยน้ำหนัก) ซึ่งหนักเท่ากับ 500 กรัม เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร

เท่านั้น ทำ 2 ซ้ำ ตรวจหาแอมโมเนียม วัดความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิทุกวัน จนครบ 12 วัน และหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักขยะหลังผ่านการบำบัด

1.5 การทดสอบกิจกรรมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการบำบัดน้ำเสีย

นำเชื้อที่คัดเลือกไว้แล้วว่ามีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายแป้ง โปรตีนและไขมันมาอย่างละ 1 ลูบ เลี้ยงแยกกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริยีนต์ (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที แล้วนำมาวัดค่า optical density (O.D) ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร นำสารละลายแขวนลอยเซลล์แต่ละไอโซเลต และไอโซเลตเชื้อผสมมาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้นของกล้ำเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน และเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้อากาศด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าบีโอดี (BOD) ตามวิธีการของ APHA (1998) นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียโดยเปรียบเทียบค่าบีโอดี (BOD) กับชุดควบคุม (control) ที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์

2. การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน

2.1 การเก็บตัวอย่างดินและน้ำ

เก็บตัวอย่างดินและน้ำ จากแหล่งปนเปื้อนน้ำมันและแหล่งธรรมชาติในบริเวณ จังหวัด เชียงใหม่และพื้นที่ตัวอย่างบางพื้นที่ เช่น บริเวณชายฝั่งทะเลและคลังน้ำมัน เป็นต้น ใส่ในภาชนะ ที่แห้งและปิดสนิท โดยเก็บตัวอย่างดินและน้ำมาไม่น้อยกว่า 500 g และ 500 ml ตามลำดับ

วัดค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ พร้อมบันทึกข้อมูลทางกายภาพบริเวณแหล่งเก็บตัวอย่าง

2.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ

แยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารที่มีสารอาหารสูง

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ โดยชั่งตัวอย่างดิน 5 g และตัวอย่างน้ำ 5 ml ใส่ลงในอาหาร Luria – Bertani Medium (LB broth) 100 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบไม่น้อยกว่า 160 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหาร LB agar ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อเชื้อขึ้นบนอาหารแล้วทำการลาก (streak) โดยใช้อาหารเดิมจนได้โคโลนีเดี่ยว ๆ และเก็บไว้บนอาหารวุ้นเอียง (stock)

แยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเฉพาะ

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ โดยชั่งดิน 10 g ล้างด้วย 0.1% sodium pyrophosphate ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย 30 g glass beads ปริมาตร 90 ml นำไปไว้บนเครื่องเขย่านาน 1 hr เจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9} ใส่ตัวอย่างที่ได้เจือจางไว้ 1 ml ลงใน Bushnell Haas Medium 10 ml เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.22 μm) 50 μl ลงในทุกหลอด และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 °C เป็นเวลานาน 3-6 สัปดาห์

2.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมัน

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันด้วย

วิธีการทางกายภาพเบื้องต้น

1. เลือกเชื้อโคโลนีบนแต่ละจานเพาะเชื้อที่ต่างกันของโคโลนี มาลากเป็นเส้นบนอาหาร NA จนทำให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ และทำการย้อมแกรม Gram's staining (McCourt, 1988) เพื่อดูการติดสี ลักษณะรูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 จะนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB โดยใช้ห้วงถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อบนอาหาร NA ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 hrs โดยมีขวดไม่ใส่เชื้อเป็นชุดควบคุม
3. วัดปริมาณเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้แต่ละขวดมีค่าเท่ากับ 0.5
4. หยดน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละขวดที่ทำกรวัดปริมาณเชื้อแล้ว ขวดละ 2 ml นำไปเขย่าต่ออีก 72 hrs ที่อุณหภูมิ 37 °C สังเกตปริมาณของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ, สีและความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยสังเกตทุก ๆ 24 hrs และทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงกับชุดควบคุม (รัฐพร, 2541) โดยมีการกำหนดระดับความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน ดังนี้

- | | |
|----------|---|
| ระดับ 0 | - ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม |
| ระดับ + | - ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันแตกตัวออกเป็นเม็ดน้ำมันขนาดใหญ่และมีบางส่วนยังไม่แตกตัว |
| ระดับ ++ | - ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันทั้งหมดแตกตัวออกเป็นเม็ดน้ำมันขนาดเล็ก |

2.5 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันด้วยวิธีการทางเคมีวิเคราะห์

1. ทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียโดยวิธี Partition gravimetric (APHA, 1998)

1. นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว NB โดยใช้หัวถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

2. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาตรเชื้อจากค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้แต่ละขวดมีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 หยดน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละขวดที่ทำการวัดปริมาณเชื้อแล้ว ขวดละ 2.0 ml นำไปเขย่าต่ออีก 72 hrs สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. ทดสอบการย่อยน้ำมันเครื่องที่ผิวหน้าอาหารด้วยวิธี Partition gravimetric นำอาหารปริมาณ 100 ml ปรับให้ pH เท่ากับ 1-2 หลังจากนั้นเติม Hexane ซึ่งเป็นตัวสกัด 10 ml เขย่า 3-5 min ทั้งแยกชั้น เก็บส่วนที่เป็นน้ำมันไว้ นำส่วนล่างมาสกัดน้ำมันอีกครั้งโดยเติม Hexane 10 ml เขย่า 3-5 min

4. เก็บส่วนที่เป็นน้ำมันที่สกัดได้จาก 3. กรองด้วย Sodium sulphate anhydrous 1.0 g บนกระดาษกรอง # 40 จากนั้นระเหย Hexane โดยอบที่ 105 °C นาน 30 min หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นไม่น้อยกว่า 30 min ชั่งน้ำหนัก นำน้ำหนักที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำมัน (mg/l)} = \frac{(B - A) \times 10^6}{\text{ปริมาณอาหาร (ml)}}$$

A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องที่มีน้ำมัน

2. ทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรีย โดยวิธีชีวเคมี

1. การเตรียมเอนไซม์

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร NB ที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.1 % by volume และ $CaCl_2$ 0.01 % (ภาคผนวก ก) ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวอยู่ 25 ml โดยมีค่า OD_{600} ของเชื้อเริ่มต้นที่ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 hrs ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 10 min เก็บส่วนบนมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยการไตเตรท (Holme, 1993)

2.1 ผสมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.2 ml และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 mM ปริมาตร 0.3 ml และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 Mol pH 7 ปริมาตร 4 ml เข้าด้วยกัน

ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml จำนวน 2 ใบ โดยขวดที่ 1 ให้เป็นสารละลายมาตรฐาน(blank) ขวดที่ 2 เติมสารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.1 ปริมาตร 0.5 ml

2.2 นำสารละลายทั้ง 2 ขวดไปปั่นที่อุณหภูมิ 65°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 hrs หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายผสมของอะซิโตนและเอทานอล (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 20 ml

2.3 เติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml เติมสารละลายฟีนอลทาลีน 3-4 หยด ลงในสารละลาย ขวดที่ 1 และขวดที่ 2 กำหนดให้ขวดที่ 1 เป็น blank

2.4 นำมาทำการไตเตรท หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.05 Molar ไตเตรทจนกระทั่ง pH ของสารละลายเท่ากับ 11 ซึ่งสีของฟีนอล์ฟทาลีน จะปรากฏเป็นสี ชมพู บันทึกปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายปฏิกิริยาและ สารละลายมาตรฐาน (Blank) จากนั้น นำไปคำนวณ Activity ของไลเปส ซึ่งกำหนดให้ 1 ยูนิตไลเปส คือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ 1 Mmol ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส ในเวลา 1 min ภายใต้ สภาวะที่ทำการทดลอง

การคำนวณค่ากิจกรรมไลเปส (Lipase Activity) โดยการไตเตรต

A คือ ความเข้มข้นของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรทแต่ละครั้ง

B คือ ปริมาตร NaOH ที่ไตเตรทสารละลายปฏิกิริยา- ปริมาตร NaOH ที่ไตเตรทสารละลาย มาตรฐาน

C คือ ปริมาณสารละลายไลเปส ที่ใช้ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลสน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (0.5 ml)

$$\text{ปริมาตรโมลของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท} = \frac{A \times B}{1000} \text{ Mol}$$

$$\text{ดังนั้น กรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น} = \frac{A \times B \times 10^6}{1000} \text{ mMol}$$

เมื่อใช้สารละลายไลเปส C ml ทำปฏิกิริยา ไฮโดรไลสน้ำมันเครื่องเป็นเวลา 60 min

$$\text{กิจกรรมไลเปส} = \frac{A \times B \times 10^6}{1000 \times C \times 60} \text{ U/ml}$$

3. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วย Colorimetric method (Holme, 1993)

3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก

ใส่สารละลายกรดโอเลอิกเข้มข้น 10 mMol (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.3, 0.6, 1.0, 1.3, 1.6, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ml ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรรวมในแต่ละหลอดให้เท่ากับ 5.0 ml ด้วยไอโซออกเทน จากนั้นเติม copper reagent 10.0 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น นำสารละลายชั้นบนของ ไอโซออกเทน ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 nM โดยใช้ไอโซออกเทนเป็น blank นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างการดูดกลืนแสง กับ ปริมาณกรดโอเลอิกเป็น mMol

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

ผสมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.2 ml และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 mMol ปริมาตร 0.3 ml และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 Mol pH 7 ปริมาตร 4 ml เข้าด้วยกัน ในขวดรูปชมพู่ 2 ใบ ขนาด 250 ml โดยขวดที่ 1 ให้เป็นสารละลายมาตรฐาน ขวดที่ 2 เติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml นำสารละลายทั้ง 2 ขวดไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 hrs จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml ในขวดที่ 1 ที่ใช้เป็น Blank และปรับ pH ของสารละลายทั้ง 2 ขวด ให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 Molar HCl ทดสอบด้วยกระดาษ pH เติมไอโซออกเทน 5 ml ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 5 min แยกสารละลายชั้นบนของไอโซออกเทนด้วยวิธีบีบอัด ออกมาทำการวิเคราะห์ โดยเติม copper reagent 1.0 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นบนไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 nM นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก อ่านปริมาณของกรดโอเลอิกในหน่วยไมโครโมล และนำไปคำนวณ Activity โดยกำหนดให้ 1 หน่วยไลเปส คือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ 1 mM ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส ในเวลา 1 min ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

การคำนวณค่ากิจกรรมไลเปสโดย Colorimetric method

$$\text{กิจกรรมไลเปส} = \frac{B}{AX60} \quad \text{U/ml}$$

A คือ เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง (0.5 ml)

B คือ กรดโอเลอิกที่เทียบได้จากกราฟมาตรฐาน

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่คัดเลือกได้ (ภัณทิรา, 2548)

นำเชื้อจากการ Pw3/2, Pw27/1 (ปิยะพรรณ, 2550) และ SA 11/4, SA 6/3 (อัญชลี, 2550) และเชื้อที่ผ่านการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากข้อ 1 ถึง 3 มาทำการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโดยมีสภาวะที่ศึกษาดังนี้

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า) และ ความเค็ม (% NaCl)

1. ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

1.1 ใช้ห้วงถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

1.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อจากค่า OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับ pH เป็น 8.5, 9.0, 9.5 และ pH เดิม(7.30) นำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 hrs นำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

1.3 นำส่วนที่ 2 เชื้อไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่นระหว่างการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

2.1 ใช้ห้วงถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

2.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณ OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับ pH ให้เป็น pH ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ นำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37, 40, 45 °C เป็นเวลา 48 hrs นำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

2.3 นำส่วนที่ 2 นำเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่นระหว่างการศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม

3. การให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

3.1 ใช้ห้วงถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

3.2 เขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณ OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับให้เป็น pH ที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสมกับ

การเจริญเติบโตของเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 100, 150, 200 rpm เป็นเวลา 48 hrs นำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

3.3 ส่วนที่ 2 นำเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ระหว่างการศึกษากการให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า) ที่เหมาะสม

4. %NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

4.1 ใช้หัวถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

4.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อ จากค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับให้เป็น pH ที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม และความเร็วรอบที่เหมาะสม หลังจาก นั้นเติม NaCl 0.5, 1.0, 2.0 % เป็นเวลา 48 hrs นำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

4.3 นำส่วนที่ 2 นำเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้อ อื่นระหว่างการศึกษา %NaCl ที่เหมาะสม

3. การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม

3.1 การออกแบบระบบฐานข้อมูลจุลินทรีย์

โดยใช้โปรแกรม Microsoft Access เพื่อให้สามารถจัดเก็บจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปแบบที่ เป็นระบบง่ายต่อการเรียกข้อมูล โดยการออกแบบให้มีการเก็บบันทึกข้อมูลที่สำคัญของจุลินทรีย์แต่ละ ชนิด รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์เหล่านั้นด้วย

3.2 การจัดเก็บรักษาจุลินทรีย์

เก็บรักษาจุลินทรีย์อย่างน้อย 2 วิธีต่อสายพันธุ์ โดยมีวิธีการเก็บดังนี้

3.2.1 การเก็บรักษาแบบ subculture

เป็นวิธีที่ใช้สำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งหรือแห้งแข็งได้ ทำโดยการ พิมพ์เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด วันเดือนปีที่เก็บเชื้อ ลงบนกระดาศสำหรับติดชื่อเป็นจำนวน 2 ชุด แล้ว นำ กระดาศแต่ละแผ่นไปติดบนหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละหลอด ปิดทับด้วยเทปใสลงบน แผ่นกระดาศอีกครั้ง โดยเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ ใช้ loop ปลอดเชื้อ แต่ละเชื้อมาขีดซิกแซกไปมาบนผิวหน้าวุ้นซึ่งเป็น agar slant เป็นจำนวน 2 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ และสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C

3.2.2 การเก็บเชื้อแช่แข็งบน glass bead

ปิเปตเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 1 มล. ใส่ใน glycerol suspending medium 4 มล. เขย่าบน vortex mixer เพื่อให้เชื้อกระจายใน glycerol suspending medium หลังจากนั้นปิเปตเชื้อที่แขวนลอยใน glycerol suspending medium ใส่ในหลอดบรรจุ glass bead หมุนหลอดไปมาเพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียเคลือบไปบน bead จนทั่ว แล้วจึงใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเอา suspension ของเชื้อที่เหลือที่ก้นขวดออกให้หมด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดน้ำแข็งที่ทำให้ glass bead เกาะติดกัน ติดฉลากชื่อเชื้อบนหลอดเก็บเชื้อ ปิดทับด้วยเทปใสอีกครั้ง นำไปเก็บในกล่องพลาสติกแล้วจึงเก็บใน deep freezer ที่อุณหภูมิ -60°C ถึง -75°C

3.2.3 การเก็บรักษาเชื้อโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-drying)

ใช้พาสเจอร์ปิเปตปลอดเชื้อ ดูด suspending medium ปริมาณ 1-2 มล. ใส่ในหลอด agar slant แล้ว จึงใช้ปลายพาสเจอร์ปิเปตขีดเชื้อเบา ๆ ที่ผิววุ้น ทำให้เชื้อกระจายใน suspending medium อย่างสม่ำเสมอ อย่าให้เกิดฟองอากาศ ใช้นิ้วมือดึงจุกสำลีที่ปิดหลอดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และใช้พาสเจอร์ปิเปตดูด suspension ของแต่ละเชื้อในปริมาตรหลอดละ 0.2 มล. ใส่ลงไปในแต่ละหลอดที่พิมพ์รหัสเชื้อไว้แล้ว ระวังอย่าให้ปลายพาสเจอร์ปิเปตสัมผัสกับคอคออดของหลอด จากนั้นจึงเผาปากหลอดอีกครั้งแล้วจึงอุดด้วยจุกสำลี นำหลอด ampule ที่ใส่เชื้อแล้วไปแช่ใน 95% ethyl alcohol ที่บรรจุในปิกเกอร์แล้วนำไปแช่ใน freezer อุณหภูมิ -70°C เมื่อเชื้อในหลอดเป็นน้ำแข็ง จึงนำปิกเกอร์ใส่ในกระติกน้ำแข็ง เพื่อเคลื่อนย้ายไปที่เครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

3.2.4 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแช่แข็ง

โดยการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ -196°C ในถังไนโตรเจนเหลวหรือ -150°C ในตู้แช่เยือกแข็ง วิธีนี้ใช้สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ถาวร โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเก็บรักษาโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ หรือเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์แบบกึ่งถาวร โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่อยู่ระหว่างการศึกษาทดลองภายในหน่วยงาน

3.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกในการย่อยสลายโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสในอาหารเหลวไนวเทรียนต์ (NB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24

ชั่วโมเมนต์ เก็บเกี่ยวเซลล์โดยบีบเปิดเชื้อแบคทีเรียมา 1.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็กขนาด 1.9 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นใช้บีบเปิดดูดส่วนใสด้านบนทิ้งจนหมด ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, USA) โดยเติมสารละลาย Micro Bead 300 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ถ่ายเซลล์แขวนลอยลงใน Micro Bead tube เติมสารละลาย MD1 50 ไมโครลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าแนวนอนที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที บีบเปิดส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ จะได้ของเหลวประมาณ 300 ไมโครลิตร เติมสารละลาย MD2 100 ไมโครลิตร ผสมเป็นเวลา 5 วินาที นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ใช้บีบเปิดดูดส่วนใสด้านบนออกมาใส่หลอดใหม่ 450 ไมโครลิตร เติมสารละลาย MD3 900 ไมโครลิตร ผสมเป็นเวลา 5 วินาที บีบเปิดส่วนใส 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาดเล็กที่มีตัวกรอง (spin filter) ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง บีบเปิดส่วนใสที่เหลือมาอีก 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาดเล็กที่มีตัวกรอง (spin filter) หลอดเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง เติมสารละลาย MD4 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายตัวกรอง (spin filter) ลงในหลอดขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) หลอดใหม่ เติมสารละลาย MD5 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งตัวกรอง จะได้ดีเอ็นเออยู่ในหลอดที่บรรจุสารละลาย MD5 จากนั้นวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.3.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และทำให้บริสุทธิ์

เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ดัดแปลงจากวิธีการของ Yeung *et al.* (2002), Sow *et al.* (2005) และ Flint และ Angert (2005) โดยใช้ primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 520R (5'-ACCGCGGCKCCTCCC-3') (Operon, Germany) ซึ่งตรงกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง V1-V3 ประมาณ (500 bp) ของยีนส่วน 16S rRNA ทำการเตรียมปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้าย 50

ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาจะประกอบด้วย mastermix (Eppendorf, USA) 20 ไมโครลิตร (Mg 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 200 ไมโครโมลาร์, *Taq* PMA polymerase 1.25 U) 27F 2 ไมโครลิตร (20 พิโกโมลาร์) 520R 2 ไมโครลิตร (20 พิโกโมลาร์) ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนครบ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ PCR Sprint Thermal Cycler (ยี่ห้อ Thermohybrid รุ่น Sprint) โดยตั้งโปรแกรมในการทำงานดังนี้

25 รอบ	Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที
	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Annealing	55 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Terminating	72 องศาเซลเซียส	5 นาที
	Hold	4 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะใช้

หลังจากนั้นทำให้ PCR product บริสุทธิ์ โดยใช้ TaKaRa SUPREC™-PCR, Japan ดังนี้
 ปิเปต PCR product 50 ไมโครลิตร และ TE buffer (pH 8.0) 400 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์นำคอลัมน์นี้ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก (eppendorf) นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทั้งของเหลวที่ตกลงในหลอดขนาดเล็ก (eppendorf) หลอดใหม่ เติม TE buffer (pH 8.0) 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงและดูดดีเอ็นเอที่ค้างอยู่บนฟิวเตอร์ในคอลัมน์ให้หลุดออกมา คว่ำคอลัมน์ลงในหลอดขนาดเล็ก (eppendorf) หลอดใหม่ นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ PCR product ที่บริสุทธิ์ 20 ไมโครลิตร นำไป run gel 5 ไมโครลิตร เพื่อตรวจสอบขนาด ความเข้มข้นของ PCR product และสิ่งปนเปื้อน เริ่มจากเตรียมเจลด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล จากนั้นวางเจลที่มีหลอดที่ปลายด้านหนึ่งลงในเครื่อง run gel เท 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล ใช้ loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES) 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันหยอดลงในหลุมบนเจลและใช้ marker ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas LIFE SCIENCES) จำนวน 5 ไมโครลิตร ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายกับ GenBank database โดยใช้ BLAST จะทราบจีโนมและสปีชีส์

4. การผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียเชิงพาณิชย์

4.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นสำหรับทดสอบการบำบัดขยะและน้ำเสียในเชิงพาณิชย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง โปรตีน และไขมัน จากงานวิจัยการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย ได้แก่ *Bacilli bacterium* (MJUT026), *Bacillus thuringiensis* (MJUT033), *Bacillus cereus* (MJUT076), *Bacillus subtilis* (MJUT120), *Bacillus licheniformis* (MJUT122), *Bacillus* sp. (MJUT173), *Pseudoburkholderia malthae* (MJUT138), *Bacillus amyloliquefaciens* (PB004) และ *Bacillus* sp. (PB014) ที่เจริญในอาหารแข็งมาอย่างละ 1 ลูบ เลี้ยงแยกกันในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเชื้อรหัส MJUT026, MJUT033 และ MJUT076 เลี้ยงในอาหารเหลวทริปติกชอย (Tryptic soy broth) (ภาคผนวก ก) เชื้อรหัส MJUT120, MJUT122, MJUT138, PB004 และ PB014 เลี้ยงในอาหารเหลวนิวเทรียนต์ (Nutrient broth) (ภาคผนวก ก) นำไปเขย่าเพื่อเพิ่มปริมาณ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม

1.1 เชื้อทดสอบการบำบัดขยะ ได้แก่ เชื้อเดี่ยวรหัส MJUT076, MJUT138, และเชื้อผสม MJUT033, MJUT076, MJUT138, MJUT122 และ PB004

1.2 เชื้อทดสอบการบำบัดน้ำเสีย ได้แก่ เชื้อเดี่ยวรหัส MJUT026, MJUT076, PB014, เชื้อผสม 1 (เชื้อผสม MJUT026, MJUT076, MJUT122 และ PB014)

เชื้อผสม 2 (เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014)

4.2 การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้นในระดับอุตสาหกรรมสำหรับทดสอบการบำบัดขยะและน้ำเสียในเชิงพาณิชย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 1.1 และ 1.2 ทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมสูตรต่างๆ มาผลิตในระดับอุตสาหกรรม ทำการขยายเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบน้ำเสียกับกากน้ำตาลในถังหมักขนาด 2,000 ลิตร ทำการหมักแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ ส่วนการทดสอบขยะใช้ถัง ขนาด 200 ลิตร และหมักแบบไม่เติมอากาศ ขั้นตอนการเตรียมถังหมักและการขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์มีดังนี้

4.2.1 การเตรียมถังหมักจุลินทรีย์

นำถังที่ติดตั้งเซ็นเซอร์ขนาด 200 และ 2,000 ลิตร มาทำความสะอาด ซ้ำๆ เช็ดด้วยน้ำร้อน หรือคลอรีนความเข้มข้น 200 ppm ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ประกอบถังหมักจุลินทรีย์กับอุปกรณ์ต่าง ๆ (ภาคผนวก ค) ถังหมักจุลินทรีย์ทดสอบน้ำเสีย เตรียมโดยละลายกากน้ำตาล 155-165 กิโลกรัม เติมน้ำให้ได้ระดับปริมาตร 1,800 ลิตร ถังหมักจุลินทรีย์ทดสอบขยะ เตรียมโดยละลายกากน้ำตาล 15-20 กิโลกรัม เติมน้ำให้ได้ระดับปริมาตร 180 ลิตร (เหลือพื้นที่ว่าง 20 เปอร์เซ็นต์ของถัง)

4.2.2 การขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์

เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงในถังหมักจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ คนผสมให้เข้ากันด้วยชุดกวนน้ำของถังหมัก การหมักแบบเติมอากาศให้เติมอากาศจากเครื่องผลิตออกซิเจนที่ติดตั้งบนถังหมัก วันละ 4 ชั่วโมง เข้าและป่วย ครั้งละ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน ถ้าเป็นการหมักแบบไม่เติมอากาศ ให้ปล่อยทิ้งไว้ตามธรรมชาติ การขยายหัวเชื้อสำหรับทดสอบน้ำเสียทั้งการหมักแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศทำการตรวจวัดค่าความหวาน, ค่าความเป็นกรด-ด่าง และนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ทุกๆ 6 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 และ 72 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการบำบัดขยะและน้ำเสีย

4.3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการบำบัดขยะ

นำขยะเปียก ซึ่งประกอบด้วยเศษอาหารที่มีข้าว และกับข้าวที่เหลือจากการบริโภค มาผสมกับขยะแห้งที่ประกอบด้วยเศษหญ้าและใบไม้ ในอัตราส่วน 2 : 1 โดยน้ำหนัก แบ่งการทดลองออกเป็น 2 แบบดังนี้

แบบที่ 1 การทดลองบำบัดขยะโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ราดโดยตรง (แบบเปียก)

ทดลองนำเชื้อเดี่ยวรหัส MJUT076, MJUT138 และเชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส MJUT033, MJUT076, MJUT138, MJUT122 และ PB004 ที่ผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม ไปราดบนขยะทดสอบ 5 กิโลกรัม ทดลองใช้หัวเชื้อปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 3, 6 และ 12 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร น้ำหนักขยะทดสอบ ซึ่งเท่ากับ 150, 300 และ 600 มิลลิลิตร หมักไว้ในถังหมักขยะ เป็นเวลา 13 วัน เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก ค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) และอุณหภูมิทุกๆ 2 วัน กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ราดจุลินทรีย์

แบบที่ 2 การทดลองบำบัดขยะโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ทำเป็นปุ๋ยหมักจุลินทรีย์ก่อน

แล้วนำมาโรยบนขยะ (แบบแห้ง)

ทดลองนำเชื้อเดี่ยวรหัส MJUT076, MJUT138 และเชื้อผสม MJUT033, MJUT076, MJUT138, MJUT122 และ PB004 ที่ผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม มาทำเป็นปุ๋ยหมักจุลินทรีย์ ทดลองผสมหัวเชื้อปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 3, 6 และ 12 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำหมักขยะทดสอบ ซึ่งเท่ากับ 150, 300 และ 600 มิลลิลิตร ผสมกับ แกลบ รำละเอียด และมูลวัวแห้ง อย่างละ 1 ส่วน หมักไว้ 7 วัน ได้ปุ๋ยหมักจุลินทรีย์แบบแห้งมาโรยบนขยะ 5 กิโลกรัมให้ทั่ว การใช้ปุ๋ยหมักจุลินทรีย์โรยบนขยะจะใช้สูตรละ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมักขยะ คือ 500 กรัม หมักขยะไว้ในถังหมักขยะ เป็นเวลา 13 วัน เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักราคาความเป็นกรด-ด่าง(pH) และอุณหภูมิทุกๆ 2 วัน กับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมจุลินทรีย์

4.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสีย

ทดลองนำเชื้อเดี่ยวรหัส MJUT026, MJUT076, PB014, เชื้อผสม 1 (เชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส MJUT026, MJUT076, MJUT122 และ PB014) และเชื้อผสม 2 (เชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014) ที่ผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรมทั้งแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ ไปเติมในบ่อน้ำเสียของโรงงานแปรรูปสุกรแม่ใจ บริษัทเบทาโกร ภาคเหนือ เกษตรอุตสาหกรรม จำกัด และโรงแรมเชียงใหม่รัตนโกสินทร์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ปริมาณเชื้อละ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของน้ำเสียในบ่อ ทิ้งไว้ตามระยะเวลาเก็บกักน้ำเสีย (retention time) ของบ่อบำบัด คือ 1 วัน สำหรับโรงงานแปรรูปสุกรฯ และ 2 วัน สำหรับโรงแรม ทำการเก็บน้ำทิ้งก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตในการบำบัดน้ำเสีย โดยเปรียบเทียบค่าบีโอดี(BOD) ของน้ำทิ้งก่อนบำบัดและหลังการบำบัด

4.5 การขยายผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมายและการถ่ายทอดเทคโนโลยี

จัดฝึกอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม เรื่อง การใช้เชื้อจุลินทรีย์แทนสารเคมีเพื่อบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติให้กับเกษตรกรชุมชนแม่ใจและชุมชนใกล้เคียง จำนวน 2 รุ่นๆ ละ 50 คน

ผลการทดลอง (Results)

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย

1.1 ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่าง

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำเสีย 5 ตัวอย่าง ปลวก 1 ตัวอย่าง ดิน 8 ตัวอย่าง รำข้าว 1 ตัวอย่าง ฟางข้าว 1 ตัวอย่าง มูลสัตว์ 1 ตัวอย่าง เศษอาหาร 2 ตัวอย่าง เศษผัก 1 ตัวอย่าง ลำไ้หมู 1 ตัวอย่าง และลำไ้ปลาเผา 1 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกมาได้รวมทั้งหมด 373 ไอโซเลต ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 จำนวนไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่าง

ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต ที่แยกได้	รหัสไอโซเลต
น้ำเสีย	หจก. อีสริยะผล	16	MJUT001-MJUT016
น้ำเสีย	อ. เมืองเชียงใหม่ โรงงานปรี้นเซสฟู้ด	12	MJUT017-MJUT028
น้ำเสีย	จ. เชียงใหม่ โรงงานเอสแอนด์พี ซินดิเคท	15	MJUT029-MJUT043
น้ำเสียบ่อดักไขมัน	จำกัด (มหาชน) จ. เชียงใหม่		
น้ำเสียบ่อดักไขมัน	หจก. อีสริยะผล	27	MJUT044-MJUT070
น้ำเสียบ่อดักไขมัน	อ. เมืองเชียงใหม่ โรงงานปรี้นเซสฟู้ด	17	MJUT071-MJUT087
	จ. เชียงใหม่		
ปลวก	อ. สันทราย จ. เชียงใหม่	15	MJUT088-MJUT102
ดิน	อ. สันทราย จ. เชียงใหม่	16	MJUT103-MJUT118
รำข้าว	โครงการเกษตรทฤษฎีใหม่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	25	MJUT119-MJUT143
ฟางข้าว	โครงการเกษตรทฤษฎีใหม่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	22	MJUT144-MJUT165
ดินจากกองปุ๋ยหมัก	โครงการเกษตรทฤษฎีใหม่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	16	MJUT166-MJUT181

ตารางที่ 9 จำนวนไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่าง (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต ที่แยกได้	รหัสไอโซเลต
ดินในนาข้าว	อ. แมริม จ. เชียงใหม่	13	MJUT182-MJUT194
ดินในนาข้าว	อ. พิชัย จ. อุตรดิตถ์	13	MJUT195-MJUT207
ดินในนาข้าว	อ. ปางมะผ้า จ. แม่ฮ่องสอน	11	MJUT208-MJUT218
ดินในป่าเต็งรัง	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	13	MJUT219-MJUT231
ดินในป่าเต็งรัง	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	11	MJUT232-MJUT242
ดินจากแปลงผัก	โครงการเกษตรทฤษฎีใหม่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	10	MJUT243-MJUT252
มูลสัตว์	โครงการเกษตรทฤษฎีใหม่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	24	MJUT253-MJUT276
เศษอาหาร	โรงอาหาร มหาวิทยาลัยแม่โจ้	26	MJUT277-MJUT302
เศษผัก	ตลาดแม่โจ้ อ. สันทราย	15	MJUT303-MJUT317
ลำไส้หมู	โครงการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	10	MJUT318-MJUT327
เศษอาหาร	โรงอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	18	MJUT328-MJUT345
ลำไส้ปลาเผา	จ. นครพนม	28	PB001-PB028
รวม		373	

1.2 ผลการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารประกอบ

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างแต่ละชนิดไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โดยการเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง skim milk, starch, tributyrin, CMC และ xylan ตามลำดับ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณใสที่เกิดขึ้น สามารถคัดเลือกได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบต่างๆ ได้ ดังนี้ คือ

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย skim milk ได้ดี ซึ่งให้ความกว้างของโซนใสตั้งแต่ 10 มิลลิเมตร ขึ้นไป จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ MJUT033, MJUT074, MJUT075, MJUT127, MJUT130,

MJUT173 และ MJUT181 โดยมี MJUT173 ที่สามารถย่อยสลาย skim milk ได้ดี และให้เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสสูงสุดเท่ากับ 38 มิลลิเมตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลาย skim milk ได้ดี

รหัสเชื้อ	ความกว้างของโซนใสรอบโคโลนี (มิลลิเมตร) ¹				
	Skim milk	Starch	Tributylin	Carboxy methyl cellulose	Xylan
MJUT033	28/12 = 16	63/52 = 11	62/59 = 3	-	41/37 = 4
MJUT074	32/22 = 10	42/40 = 2	24/18 = 6	-	4/3 = 1
MJUT075	33/18 = 15	42/28 = 14	31/22 = 9	-	17/16 = 1
MJUT127	32/18 = 14	7/4 = 3	11/10 = 1	-	-
MJUT130	38/23 = 15	-	-	-	-
MJUT173	48/10 = 38	-	-	-	-
MJUT181	19/1 = 18	16/12 = 4	-	-	-

หมายเหตุ ¹ความกว้างของโซนใสรอบโคโลนี (มิลลิเมตร) = ผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการย่อยสลายและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี
 - คือ ไม่มีการเจริญเติบโตหรือไม่เกิดโซนใส

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย starch ได้ดี ซึ่งให้ความกว้างของโซนใสตั้งแต่ 15 มิลลิเมตร ขึ้นไป จำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ MJUT071, MJUT076, MJUT108, MJUT120, MJUT143, MJUT186, MJUT192, MJUT197, MJUT198, MJUT218, MJUT241, MJUT283 และ MJUT339 โดยมี MJUT071 ที่สามารถย่อยสลาย starch ได้ดี และให้เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสสูงสุดเท่ากับ 24 มิลลิเมตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลาย starch ได้ดี

รหัสเชื้อ	ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) ¹				
	Skim milk	Starch	Tributyryn	Carboxy methyl cellulose	Xylan
MJUT071	-	32/8 = 24	36/35 = 1	-	21/20 = 1
MJUT076	46/42 = 4	55/32 = 23	41/35 = 6	-	19/18 = 1
MJUT108	-	24/8 = 16	18.5/18 = 0.5	-	14/3 = 11
MJUT120	14/5 = 9	32/10 = 22	13/8 = 5	-	20/18 = 2
MJUT143	40.5/40 = 0.5	32/15 = 17	49/48 = 1	-	14/4 = 10
MJUT186	-	26/11 = 15	20/10 = 10	-	-
MJUT192	-	20/5 = 15	-	-	-
MJUT197	-	27/5 = 22	-	-	25/5 = 20
MJUT198	-	22/5 = 17	-	-	7/4 = 3
MJUT218	-	23/6 = 17	5.5/4.5 = 1	-	13/5 = 8
MJUT241	-	25/5 = 20	11/10 = 1	-	-
MJUT283	-	21/6 = 15	-	5/2 = 3	15/3 = 12
MJUT339	17/15 = 2	23/8 = 15	-	-	-

หมายเหตุ ¹ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) = ผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการย่อยสลายและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

- คือ ไม่มีการเจริญเติบโตหรือไม่เกิดโซนไฮ

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย tributyrin ได้ดี ซึ่งให้ความกว้างของโซนไฮตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ MJUT006, MJUT011, MJUT019, MJUT026, MJUT035, MJUT036, MJUT125, MJUT138, MJUT162, MJUT184, MJUT186 และ MJUT228 โดยมี MJUT138 ที่สามารถย่อยสลาย tributyrin ได้ดี และให้เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนไฮสูงสุดเท่ากับ 18 มิลลิเมตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลาย tributyrin ได้ดี

รหัสเชื้อ	ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) ¹				
	Skim milk	Starch	Tributyrin	Carboxy methyl cellulose	Xylan
MJUT006	-	-	$18/6 = 12$	-	$7/6 = 1$
MJUT011	-	-	$16/4 = 12$	-	-
MJUT019	$14/10 = 4$	$12/9 = 3$	$24/14 = 10$	-	$18/4 = 14$
MJUT026	$8/5 = 3$	$14/10 = 4$	$36/22 = 14$	-	$14/10 = 4$
MJUT035	$2/1 = 1$	$3/1 = 2$	$18/8 = 10$	-	-
MJUT036	-	$24/19 = 5$	$56/44 = 12$	-	$12/6 = 6$
MJUT125	-	$7/6 = 1$	$25/10 = 15$	-	-
MJUT138	-	$6/5 = 1$	$21/3 = 18$	-	-
MJUT162	$52/51 = 1$	-	$24/12 = 12$	-	$20/11 = 9$
MJUT184	-	$37/24 = 13$	$20/10 = 10$	-	-
MJUT186	-	$26/11 = 15$	$20/10 = 10$	-	-
MJUT228	-	$8/3 = 5$	$45/35 = 10$	-	$8/3 = 5$

หมายเหตุ ¹ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) = ผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการย่อยสลายและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

- คือ ไม่มีการเจริญเติบโตหรือไม่เกิดโซนไฮ

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย carboxy methyl cellulose ได้ดี ซึ่งให้ความกว้างของโซนไฮตั้งแต่ 3 มิลลิเมตร ขึ้นไป จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ MJUT027, MJUT067, MJUT121, MJUT122, MJUT283, MJUT293 และ MJUT298 โดยมี MJUT122 ที่สามารถย่อยสลาย ได้ดี และให้เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนไฮสูงสุดเท่ากับ 8 มิลลิเมตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลาย carboxy methyl cellulose ได้ดี

รหัสเชื้อ	ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) ¹				
	Skim milk	Starch	Tributyrin	Carboxy methyl cellulose	Xylan
MJUT027	-	-	-	6/3 = 3	-
MJUT067	-	-	-	6/1 = 5	-
MJUT121	40/34 = 6	-	8.5/8 = 0.5	7/3 = 4	-
MJUT122	-	12/7 = 5	16/9 = 7	12/5 = 8	11/4 = 7
MJUT283	-	21/6 = 15	-	5/2 = 3	15/3 = 12
MJUT293	-	-	-	5/2 = 3	8/4 = 4
MJUT298	-	-	-	6/3 = 3	-

หมายเหตุ ¹ ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) = ผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการย่อยสลายและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

- คือ ไม่มีการเจริญเติบโตหรือไม่เกิดโซนไฮ

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย xylan ได้ดี ซึ่งให้ความกว้างของโซนไฮตั้งแต่ 15 มิลลิเมตร ขึ้นไป จำนวน 19 ไอโซเลต ได้แก่ MJUT115, MJUT139, MJUT165, MJUT178, MJUT197, MJUT319, MJUT325, MJUT342, PB002, PB004, PB006, PB007, PB009, PB010, PB013, PB014, PB015, PB016 และ PB024 โดยมี PB013 ที่สามารถย่อยสลาย xylan ได้ดี และให้เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนไฮสูงสุดเท่ากับ 25 มิลลิเมตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงไอโซเลตที่ย่อยสลาย xylan ได้ดี

รหัสเชื้อ	ความกว้างของโซนไฮดรอลิซิส (มิลลิเมตร) ¹				
	Skim milk	Starch	Tributyrin	Carboxy methyl cellulose	Xylan
MJUT115	-	-	18/9 = 9	-	20/5 = 15
MJUT139	-	-	45/42 = 3	-	21/5 = 16
MJUT165	-	56/48 = 8	25/20 = 5	-	22/6 = 16
MJUT178	-	9/5 = 4	6/5 = 1	-	27/7 = 20
MJUT197	-	27/5 = 22	-	-	25/5 = 20
MJUT319	11/10 = 1	-	16/10 = 6	-	43/37 = 16
MJUT325	-	-	7/6 = 1	-	26/11 = 15
MJUT342	-	30/25 = 5	5.5/5 = 0.5	-	22/4 = 18
PB002	26/23 = 3	20/8 = 12	21/20 = 1	-	28/13 = 15
PB004	24/21 = 3	24/15 = 9	16/14 = 2	-	26/4 = 22
PB006	21/18 = 3	25/12 = 13	17/13 = 4	-	22/6 = 16
PB007	27/25 = 2	26/22 = 4	18/15 = 3	-	20/4.5 = 15.5
PB009	21/20 = 1	21/20 = 1	18/16 = 2	-	20/2 = 18
PB010	26/25 = 1	25/22 = 3	17/15 = 2	-	27/10 = 17
PB013	-	-	9/6 = 3	-	38/13 = 25
PB014	4/3 = 1	11/8 = 3	10/6 = 4	-	25/5 = 20
HPB015	27/26 = 1	22/13 = 9	22/20 = 2	-	29/11 = 18
HPB016	-	21/15 = 6	15/11 = 4	-	20/4 = 16
HPB024	-	-	-	-	17/1.5 = 15.5

หมายเหตุ ¹ ความกว้างของโซนไฮดรอลิซิส (มิลลิเมตร) = ผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการย่อยสลายและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

- คือ ไม่มีการเจริญเติบโตหรือไม่เกิดโซนไฮ

จากจุลินทรีย์จำนวนดังกล่าว เมื่อนำมาคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบได้สูงและสามารถย่อยสลายสารประกอบได้หลายชนิดเท่านั้น พบว่าสามารถคัดเลือกได้ จำนวน 16 ไอโซเลต ดังแสดงไว้ในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ 5 ชนิด

รหัสเชื้อ	ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) ¹				
	Skim milk	Starch	Tributyrin	Carboxy methyl cellulose	Xylan
MJUT026	8/5 = 3	14/10 = 4	36/22 = 14	-	14/10 = 4
MJUT033	28/12 = 16	63/52 = 11	62/59 = 3	-	41/37 = 4
MJUT067	-	-	-	6/1 = 5	-
MJUT071	-	32/8 = 24	36/35 = 1	-	21/20 = 1
MJUT075	33/18 = 15	42/28 = 14	31/22 = 9	-	17/16 = 1
MJUT076	46/42 = 4	55/32 = 23	41/35 = 6	-	19/18 = 1
MJUT120	14/5 = 9	32/10 = 22	13/8 = 5	-	20/18 = 2
MJUT122	-	12/7 = 5	16/9 = 7	12/5 = 8	11/4 = 7
MJUT125	-	7/6 = 1	25/10 = 15	-	-
MJUT138	-	6/5 = 1	21/3 = 18	-	-
MJUT173	48/10 = 38	-	-	-	-
MJUT178	-	9/5 = 4	6/5 = 1	-	27/7 = 20
MJUT197	-	27/5 = 22	-	-	25/5 = 20
PB004	24/21 = 3	24/15 = 9	16/14 = 2	-	26/4 = 22
PB013	-	-	9/6 = 3	-	38/13 = 25
PB014	4/3 = 1	11/8 = 3	10/6 = 4	-	25/5 = 20

หมายเหตุ ¹ ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) = ผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการย่อยสลายและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี
- คือ ไม่มีการเจริญเติบโตหรือไม่เกิดโซนไฮ

1.3 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

จากการทดสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ พบว่ามี 9 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส และมีผลการทดสอบอยู่ในขั้นที่ดี จึงใช้เทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุลในการยืนยันและจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าว โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA แล้วเปรียบเทียบกับธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BLASTn ของ The National Center

for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) สามารถจำแนกแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต ได้ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 จีโนสและสปีชีส์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

ไอโซเลต	สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
MJUT026	Uncultured Bacilli bacterium	100
MJUT033	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98.6
MJUT076	<i>Bacillus cereus</i>	99.8
MJUT120	<i>Bacillus subtilis</i>	99.8
MJUT122	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.4
MJUT138	<i>Pseudoburkholderia malthae</i>	98.6
MJUT173	<i>Bacillus</i> sp.	99.8
PB004	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.8
PB014	<i>Bacillus</i> sp.	99.6

1.4 ผลการทดสอบกิจกรรมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการบำบัดขยะ

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ในขั้นต้น ได้พิจารณาจากประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ด้วยการหาความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบดังกล่าวข้างต้นได้ดีจะมีค่าความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนีสูง ในการคัดเลือกขั้นต้นนี้จึงได้นำเชื้อ MJUT026, MJUT033, MJUT076, MJUT120, MJUT122, MJUT138, MJUT173, PB004 และ PB014 มาใช้ในการทดสอบการบำบัดขยะ โดยคัดเลือกเชื้อ MJUT026 และ MJUT138 เนื่องจากสามารถย่อยสลาย tributyrin ได้ดี คัดเลือก MJUT033 และ MJUT173 เนื่องจากสามารถย่อยสลาย skim milk ได้ดี คัดเลือก MJUT076 และ MJUT120 เนื่องจากสามารถย่อยสลาย starch ได้ดี คัดเลือก MJUT122 เนื่องจากสามารถย่อยสลาย carboxy methyl cellulose ได้ดี คัดเลือก PB004 และ PB014 เนื่องจากสามารถย่อยสลาย xylan ได้ดี หลังจากนำสารละลายแขวนลอยเซลล์ที่ได้ไปเติมในส่วนผสมของขยะเปียกและขยะแห้งในอัตราส่วน 2 : 1 โดยน้ำหนัก ได้ผลดังนี้คือ

ผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในขยะทุกวัน พบว่าพีเอชของขยะวันแรกถึงวันที่ 3 ของการบำบัด มีค่าเท่ากับ 7 ซึ่งเท่ากับขยะที่ไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์ โดยพบว่าไอโซเลต MJUT076 และ

MJUT138 จะมีค่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชใกล้เคียงกับชุดควบคุม โดยค่าพีเอชของขยะจะสูงขึ้นในวันที่ 4-6 คือเท่ากับ 8 และค่าพีเอชของขยะจะสูงขึ้นอีกในวันที่ 7-12 คือมีค่าเท่ากับ 9 ในส่วนของเชื้อผสมทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชใกล้เคียงกับไอโซเลตเชื้อเดี่ยว MJUT026, MJUT033, MJUT120, MJUT122, MJUT173, PB004 และ PB014 แต่ต่ำกว่าชุดควบคุม ดังแสดงไว้ในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลของพีเอชในแต่ละวันของขยะที่ผ่านการบำบัดด้วยจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

จุลินทรีย์	เวลา (วัน)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
กลุ่มควบคุม	7	7	7	8	8	8	9	9	9	9	9	9
MJUT026	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9	9
MJUT033	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9	9
MJUT076	7	7	7	8	8	8	9	9	9	9	9	9
MJUT120	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9	9
MJUT122	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9	9
MJUT138	7	7	7	8	8	8	9	9	9	9	9	9
MJUT173	7	7	7	8	8	8	8	8	9	9	9	9
PB004	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9	9
PB014	7	7	7	8	8	8	8	8	9	9	9	9
เชื้อผสม A	7	7	7	8	8	8	8	8	9	9	9	9
เชื้อผสม B	7	7	7	8	8	8	8	8	9	9	9	9
เชื้อผสม C	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9	9
หมายเหตุ	เชื้อผสม A หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT033, MJUT076, MJUT120, MJUT122, MJUT138, MJUT173, PB004 และ PB014											
	เชื้อผสม B หมายถึง เชื้อผสม MJUT033, MJUT076, MJUT122, MJUT138 และ PB004											
	เชื้อผสม C หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014											

จากการวัดอุณหภูมิของขยะที่ผ่านการบำบัด พบว่า ในวันแรกขยะมีอุณหภูมิเท่ากับ อุณหภูมิห้อง คือ 31 องศาเซลเซียส ในวันที่ 2-9 ของการบำบัด ขยะที่เติมเชื้อมีอุณหภูมิสูงกว่า อุณหภูมิห้อง การบำบัดขยะโดยใช้เชื้อเดี่ยว พบว่า ไอโซเลต MJUT076 และ MJUT138 มีอุณหภูมิของขยะสูงกว่าขยะที่ไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์ และขยะทั้งที่เติมเชื้อกับไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิ

ของขยะสูงกว่าอุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิของขยะที่ผ่านการบำบัดจะเริ่มลดลงต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง ในวันที่ 10-12 และมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องในวันสุดท้ายของการบำบัด ส่วนการบำบัดขยะด้วยเชื้อผสม พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 3 กลุ่ม มีอุณหภูมิของขยะในวันแรกเท่ากับอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิของขยะจะสูงขึ้นจนกระทั่งวันที่ 10 ของการบำบัด อุณหภูมิของขยะจะเริ่มลดลงจนกระทั่งอุณหภูมิของขยะเท่ากับอุณหภูมิห้องในวันสุดท้ายของการบำบัด แต่อุณหภูมิของขยะที่บำบัดด้วยเชื้อผสมทั้ง 3 กลุ่ม ในระหว่างการบำบัดมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม ดังแสดงไว้ในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลของอุณหภูมิในแต่ละวันของขยะที่ผ่านการบำบัดด้วยจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

จุลินทรีย์	เวลา (วัน)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
อุณหภูมิห้อง	31.0	31.0	30.0	30.0	30.0	31.0	31.0	31.0	30.0	30.0	30.0	28.0
กลุ่มควบคุม	31.0	32.0	32.5	33.0	35.0	36.0	34.0	34.0	31.0	29.0	29.0	28.5
MJUT026	31.0	32.5	31.5	31.5	32.5	33.0	33.0	34.0	31.0	29.5	29.5	28.0
MJUT033	31.0	32.5	33.0	33.0	33.0	35.0	34.0	34.0	31.0	28.8	28.8	28.0
MJUT076	31.0	33.5	33.0	33.0	38.0	38.5	36.0	36.0	33.0	29.0	29.0	28.5
MJUT120	31.0	32.5	31.5	31.5	32.5	33.0	33.0	34.0	31.0	29.5	29.5	28.0
MJUT122	31.0	32.0	33.0	33.0	37.0	38.0	35.0	35.0	33.8	29.0	29.0	28.5
MJUT138	31.0	33.0	35.0	35.0	37.5	38.0	35.5	35.5	33.5	28.8	28.8	28.0
MJUT173	31.0	32.0	32.5	32.5	37.2	38.0	35.5	35.5	33.2	28.5	28.5	28.5
PB004	31.0	32.5	33.0	33.0	33.0	35.0	34.0	34.0	31.0	28.8	28.8	28.0
PB014	31.0	32.0	32.5	32.5	38.0	38.5	35.5	35.5	33.5	28.2	28.2	28.5
เชื้อผสม A	31.0	32.2	31.5	31.5	32.5	33.0	33.0	34.0	31.0	28.2	28.2	28.5
เชื้อผสม B	31.0	32.5	31.5	31.5	32.5	33.0	33.0	34.0	31.0	28.0	28.0	27.5
เชื้อผสม C	31.0	32.0	32.0	32.5	33.0	35.0	34.0	34.0	31.0	28.0	28.0	27.5
หมายเหตุ	เชื้อผสม A หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT033, MJUT076, MJUT120, MJUT122, MJUT138, MJUT173, PB004 และ PB014											
	เชื้อผสม B หมายถึง เชื้อผสม MJUT033, MJUT076, MJUT122, MJUT138 และ PB004											
	เชื้อผสม C หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014											

ผลการวัดแอมโมเนียในขยะทุกวัน พบว่า มีแอมโมเนียเกิดขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 ของการบำบัด และมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึงวันที่ 12 ของการบำบัด โดยไอโซเลต MJUT076 และ

MJUT138 มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงกว่าในขณะที่ไม่เติมเชื้อ จนกระทั่งในวันที่ 10 ของการบำบัดจึงมีความเข้มข้นของแอมโมเนียเท่ากับชุดควบคุม ส่วนเชื้อผสมจะมีความเข้มข้นของแอมโมเนียใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่เกิดปริมาณแอมโมเนียได้ช้ากว่า ดังแสดงไว้ในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ผลของแอมโมเนียในแต่ละวันของขยะที่ผ่านการบำบัดด้วยจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

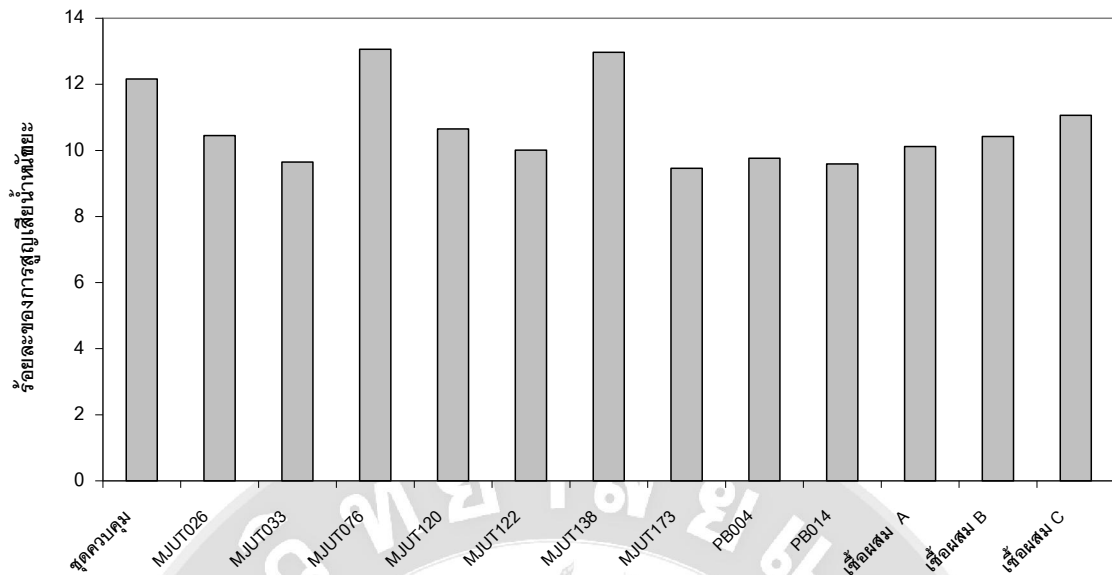
จุลินทรีย์	เวลา (วัน)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
กลุ่มควบคุม	--	--	+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+
MJUT026	--	--	+	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+
MJUT033	--	--	+	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+
MJUT076	--	+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	4+
MJU120	--	--	+	+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+
MJUT122	--	--	+	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+
MJUT138	--	+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	4+
MJUT173	--	--	+	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+
PB004	--	--	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	4+	4+
PB014	--	--	+	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+
เชื้อผสม A	--	--	+	2+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	4+
เชื้อผสม B	--	--	+	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+
เชื้อผสม C	--	--	+	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+

หมายเหตุ เชื้อผสม A หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT033, MJUT076, MJUT120, MJUT122, MJUT138, MJUT173, PB004 และ PB014

เชื้อผสม B หมายถึง เชื้อผสม MJUT033, MJUT076, MJUT122, MJUT138 และ PB004

เชื้อผสม C หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014

การบำบัดขยะโดยใช้เชื้อเดี่ยว พบว่า น้ำหนักขยะที่ผ่านการบำบัดโดยไอโซเลต MJUT076 และ MJUT138 มีค่าลดลง 13.06 และ 12.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับขยะที่ผ่านการบำบัดโดยไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักเท่ากับ 12.16 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการบำบัดขยะโดยใช้เชื้อผสมกลุ่ม A, B และ C พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักขยะใกล้เคียงกับชุดควบคุมคือ 10.12, 10.42 และ 11.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายขยะระหว่างไอโซเลตที่คัดเลือกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

1.5 ผลการทดสอบกิจกรรมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการบำบัดน้ำเสีย

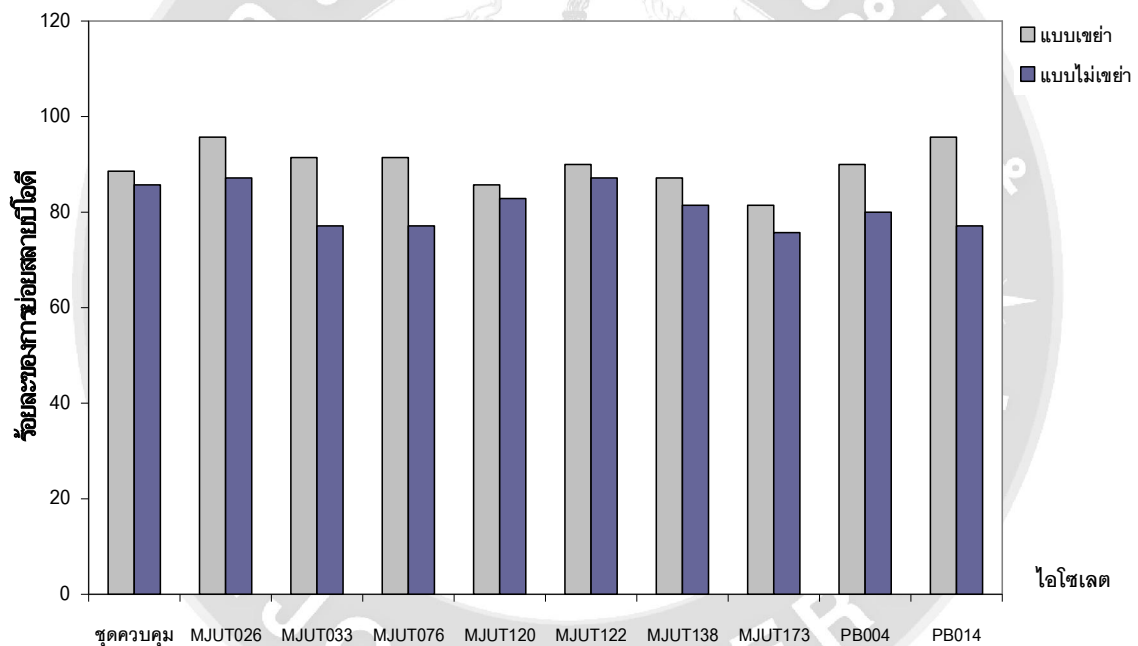
1.5.1 เชื้อเดี่ยว

จากการนำไอโซเลต MJU026, MJU033, MJU076, MJU120, MJU122, MJU138, MJU173, PB004 และ PB014 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน แป้ง ไขมัน ได้มาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบที่เรียแต่ละไอโซเลตในตัวอย่างน้ำเสีย ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นของแต่ละไอโซเลตที่เติมลงไปเท่ากับ 3 เพอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยงโดยการให้อากาศด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งหลังจากเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นแล้วจะบ่มเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์หาค่าบีโอดี นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดลองพบว่าการทดสอบการบำบัดน้ำเสียในระบบฟลask ที่มีค่าบีโอดีเริ่มต้นที่ 4,200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากศึกษาการใช้ไอโซเลตที่คัดเลือกในการบำบัดน้ำเสียในช่วงระยะเวลาที่กำหนด พบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าซึ่งมีการแลกเปลี่ยนออกซิเจนอยู่ตลอดเวลาเหมือนกับชั้นน้ำภายในบ่อบำบัดน้ำเสีย ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเชื้อบีโอดีสามารถลดบีโอดีได้ 88.57 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต MJUT026 และ PB014 สามารถลดค่าบีโอดีได้สูงสุด 95.71 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต

MJUT033, MJUT076 และ MJUT122, PB004 สามารถลดค่าบีโอดีได้ 91.43 และ 90.00 เปอร์เซ็นต์เรียงตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานที่มีสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าเชื้อไฮโซเลต MJUT026, PB014, MJUT033, MJUT076, MJUT122 และ PB004 สามารถลดค่าบีโอดีได้ดีกว่าชุดควบคุม เนื่องจากแต่ละไฮโซเลตเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายแบ่งได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอำพล (2546) ที่พบว่าคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำจะถูกจุลินทรีย์ในระบบนำไปใช้มากที่สุด รองลงมาคือไขมัน และโปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่ไฮโซเลต MJUT120, MJUT138 และ MJUT173 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีน และไขมันได้ดี แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้น้อย จึงทำให้ผลการลดค่าบีโอดีมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายบีโอดีหลังการบำบัดด้วยเชื้อเดี่ยว

ในส่วนของการทดสอบการบำบัดน้ำเสียโดยใช้เชื้อเดี่ยวแบบไม่เขย่าพบว่า ชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไป สามารถลดค่าบีโอดีได้เช่นเดียวกัน แต่ความสามารถในการลดปริมาณบีโอดีนั้นจะต่ำกว่าการบำบัดในสภาวะให้อากาศ โดยสามารถลดได้ 85.71 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณบีโอดีที่ลดลงอาจเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ภายในบ่อบำบัดน้ำเสีย

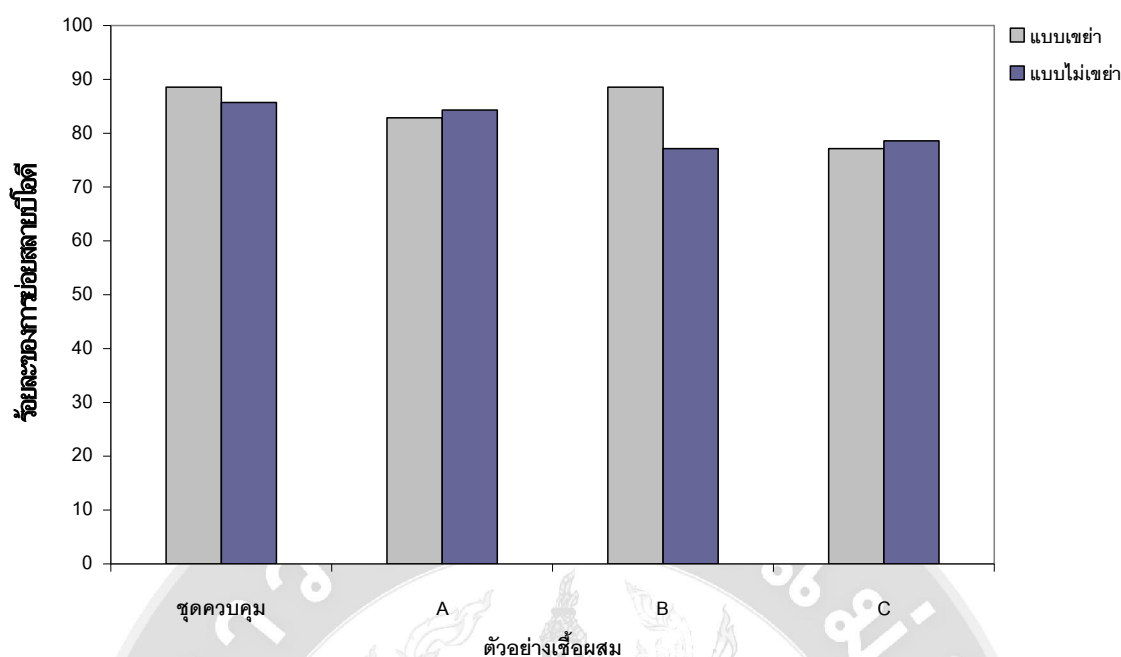
จากการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาบำบัดน้ำเสียแบบไม่เขย่า พบว่าไฮโซเลต MJUT026 และ MJUT122 มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำเสียได้

เท่ากัน โดยสามารถลดบีโอดีได้ 87.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถลดบีโอดีของน้ำเสียลงได้ดีกว่าชุดควบคุม 10.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลต MJUT120, MJUT138, PB004 และ MJUT173 สามารถลดบีโอดีจากตัวอย่างน้ำเสียได้ 82.86, 81.43, 80.00 และ 75.71 ตามลำดับ และ MJUT033, MJUT076 และ PB014 สามารถลดค่าบีโอดีจากตัวอย่างน้ำเสียได้เท่ากันคือ 77.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นปริมาณสารอินทรีย์ที่เพิ่มมากขึ้นในกรณีของไอโซเลต MJUT033, MJUT076, MJUT120, MJUT138, MJUT173, PB004 และ PB014 น่าจะเป็นผลมาจากปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตที่เติมเข้าไปในระบบ ซึ่งกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกที่เกิดขึ้นภายในระบบอาจทำการย่อยสลายสารอินทรีย์จากน้ำเสียได้บ้างในช่วงระยะแรกของการบ่ม แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณออกซิเจนในระบบลดลง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มปริมาณมากขึ้น รวมถึงจุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่กับน้ำเสียที่นำมาทดสอบเจริญเติบโตมากขึ้นและปลดปล่อยสารบางอย่างออกมานอกเซลล์ เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกตายลงและเกิดการย่อยสลายกลายเป็นสารอินทรีย์สะสมอยู่ภายในระบบ ดังนั้น เมื่อวิเคราะห์หาค่าปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำเสียจึงพบว่าปริมาณของบีโอดีสูงกว่าในชุดควบคุม

1.5.2 เชื้อผสม

นำไอโซเลตทั้ง 7 ที่คัดเลือกมาผสมในสัดส่วนที่เท่ากัน และแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 เชื้อไอโซเลต MJUT026, MJUT033, MJUT076, MJUT120, MJUT122, MJUT138, MJUT173, PB004 และ PB014 กลุ่มที่ 2 เชื้อไอโซเลต MJUT033, MJUT076, MJUT122, MJUT138 และ PB004 กลุ่มที่ 3 เชื้อไอโซเลต MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014 โดยกำหนดสัญลักษณ์ของตัวอย่างเป็น A, B และ C ตามลำดับ ตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายอินทรีย์จากน้ำเสีย โดยแบ่งกลุ่มการทดลองและสภาวะที่มีการเขย่าในฟลาสก์เพื่อให้อากาศ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำจากแต่ละตัวอย่างมาหาค่าบีโอดีที่ลดลงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 14)

จากภาพที่ 14 พบว่าตัวอย่าง B, A และ C สามารถลดค่าบีโอดีในสภาวะให้อากาศโดยการเขย่าได้ 88.57, 82.86 และ 77.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อพิจารณาตัวอย่าง A พบว่า สามารถลดค่าบีโอดีได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมคือ 88.57 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายบีโอดีหลังการบำบัดด้วยเชื้อผสม

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองการบำบัดน้ำเสียแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ พบว่า ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย จากภาพที่ 14 พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะเขย่าซึ่งมีการถ่ายเทแลกเปลี่ยนออกซิเจนตลอดเวลา จะมีผลทำให้ตัวอย่างเชื้อเดี่ยว MJUT026, MJUT033, MJUT076, MJUT122, PB004 และ PB014 มี ประสิทธิภาพในการลดปริมาณบีโอดีจากตัวอย่างน้ำเสียได้สูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการหายใจ และกระบวนการย่อยสลาย สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโต ทำให้เซลล์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ เพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน ในขณะที่ระบบที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัดยังคงถูกนำไปใช้ในกระบวนการ หายใจ กระบวนการย่อยสลายสารอาหารและปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ละลายอยู่ในตัวอย่างน้ำ เสีย ทำให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้เซลล์ตายกลายเป็น สารอินทรีย์สะสม ส่งผลให้ค่าบีโอดีเพิ่มสูงขึ้น

2. การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน

2.1 การเก็บตัวอย่างดินและน้ำ

ระยะที่ 1 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและดิน แบ่งออกเป็น 2 แหล่งใหญ่ คือ 1. พื้นที่ธรรมชาติ ในงานวิจัยนี้เลือกบ่อน้ำพุร้อน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ จำนวนทั้งหมด 5 จุด และ 2. พื้นที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว คือบริเวณปั้มน้ำมัน หรืออู่น้ำมัน จำนวนทั้งหมด 2 จุด

ระยะที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำเพิ่มเติม คือ บริเวณป่าบ้านโปง และห้วยใจ จำนวนทั้งหมด 10 จุด และเก็บตัวอย่างดินในบริเวณพื้นที่เพิ่มเติม 1 จุด เนื่องจากผลการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในระยะที่ 1 พื้นที่บริเวณปนเปื้อนพบจุลินทรีย์เจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบจากแหล่งธรรมชาติ

ตอนที่ 1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากแหล่งเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียประกอบด้วย 2 แหล่ง หลักคือ 1. แหล่งดินและน้ำธรรมชาติ และ 2. แหล่งดินที่ปนเปื้อนบริเวณปั้มน้ำมัน โดยมีผลการแยกเชื้อแบคทีเรีย ดังนี้

2.2 การคัดแยกเชื้อจากแหล่งดินธรรมชาติป่าบ้านโปง

2.2.1 การคัดแยกเชื้อจากดิน

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งดินธรรมชาติป่าบ้านโปง โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร nutrient agar (NA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 68 ชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ วรุณี (2528) กล่าวว่า ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่พบจำนวนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในหนึ่งกรัมของดินที่อุดมสมบูรณ์มีแบคทีเรียมากถึงหนึ่งแสนถึงพันล้านโคโลนีต่อกรัมดิน โดยการเทเพลดและทำให้เชื้อกระจาย (spread plate) โดยการใช้แท่งแก้วจุ่มรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปหมัก และทำการคัดแยกเชื้อทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ

2.2.2 การศึกษาพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแกรม

เมื่อคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 39 ชนิด คือ SA 1 - SA 39 ทำการศึกษาพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูรูปร่าง ลักษณะการเรียงตัวและติดสีย้อม ดังตารางที่ 2 ผลการย้อมแกรมนั้นพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 35 ชนิดและแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด มีรูปร่างท่อน 20 ชนิดและรูปร่างกลม 19 ชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huy et al. (2007) มีการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันปิโตรเลียมจากดิน พบว่า สายพันธุ์ DW2-1 ที่นำมาจำแนกการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและทางชีวเคมีพบว่า มีรูปร่างท่อน และอยู่ในแกรมลบ

เป็นส่วนใหญ่ ศุภยางค์ (2547) จุดประสงค์ของการย้อมสีเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียติดสีซึ่งทำให้เห็นได้ง่ายในการศึกษารูปร่าง (shape) ขนาด (size) การเรียงตัวของเซลล์ (cell arrangement) และโครงสร้างต่างๆของเซลล์

ตารางที่ 20 แสดงผลการย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งดินธรรมชาติบ้านโป่ง

เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์
SA 1	บวก	ท่อน	SA 21	บวก	ท่อน
SA 2	ลบ	กลม	SA 22	ลบ	กลม
SA 3	ลบ	กลม	SA 23	ลบ	ท่อน
SA 4	ลบ	กลม	SA 24	ลบ	ท่อน
SA 5	ลบ	กลม	SA 25	ลบ	ท่อน
SA 6	บวก	ท่อน	SA 26	ลบ	กลม
SA 7	ลบ	ท่อน	SA 27	ลบ	ท่อน
SA 8	ลบ	กลม	SA 28	ลบ	กลม
SA 9	ลบ	ท่อน	SA 29	ลบ	กลม
SA 10	ลบ	กลม	SA 30	ลบ	ท่อน
SA 11	ลบ	กลม	SA 31	ลบ	กลม
SA 12	ลบ	กลม	SA 32	ลบ	ท่อน
SA 13	ลบ	ท่อน	SA 33	ลบ	กลม
SA 14	ลบ	กลม	SA 34	ลบ	ท่อน
SA 15	บวก	ท่อน	SA 35	ลบ	ท่อน
SA 16	ลบ	ท่อน	SA 36	ลบ	ท่อน
SA 17	ลบ	กลม	SA 37	ลบ	กลม
SA 18	ลบ	กลม	SA 38	ลบ	กลม
SA 19	ลบ	กลม	SA 39	ลบ	ท่อน
SA 20	ลบ	ท่อน			

2.3 การคัดแยกเชื้อจากแหล่งดินธรรมชาติห้วยไจ้

2.3.1 การคัดแยกเชื้อจากดิน

จากการศึกษาการแยกและคัดเลือกบริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ที่นำมาศึกษาได้ 40 ชนิดคือ Pw1-Pw40 โดยวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ serial dilution และ spread plate agar เพื่อทำให้เชื้อกระจาย โดยการใส่แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่ม และทำการคัดแยกเชื้อ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ ซึ่ง ดวงพร (2545) ได้กล่าวว่าตามธรรมชาติจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่รวมกัน ถึงแม้ว่าจะแยกจากแหล่งที่มันอยู่ เชื้อที่ได้ปกติเป็นเชื้อผสม ดังนั้นการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อนำมาเทียบหาชนิดที่นิยมใช้ คือ วิธีการ streak plate agar และ liquid dilution method



ก) การ streak plate agar เชื้อแบคทีเรีย Pw38 ข) การ streak plate agar เชื้อแบคทีเรีย Pw27
ภาพ 15 ตัวอย่างการ streak plate agar ของเชื้อแบคทีเรีย Pw38 และ Pw27

จากภาพ 13 เป็นเชื้อแบคทีเรีย Pw38 และ Pw27 ซึ่งได้จากการ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ ซึ่ง นางลักษณ (2544) ได้กล่าวว่า การ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ สามารถนำมาศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย โดยศึกษาจาก รูปร่าง (form) ขอบหรือริม (margin) พื้นผิว (surface texture) ความสูง (elevation) ความหนืด (consistency) ความขุ่น (optical features) การสร้างสีหรือรงควัตถุ (pigmentation) ของแบคทีเรีย

2.2 การศึกษาพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยการใช้ย้อมสีแกรม

เมื่อ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำมาย้อมสีแบบแกรม ซึ่งการย้อมสีวิธีนี้มี ความสำคัญ และใช้กันแพร่หลาย นางลักษณ (2544) ได้กล่าวว่า การย้อมสีแบบแกรมเป็นการศึกษารูป

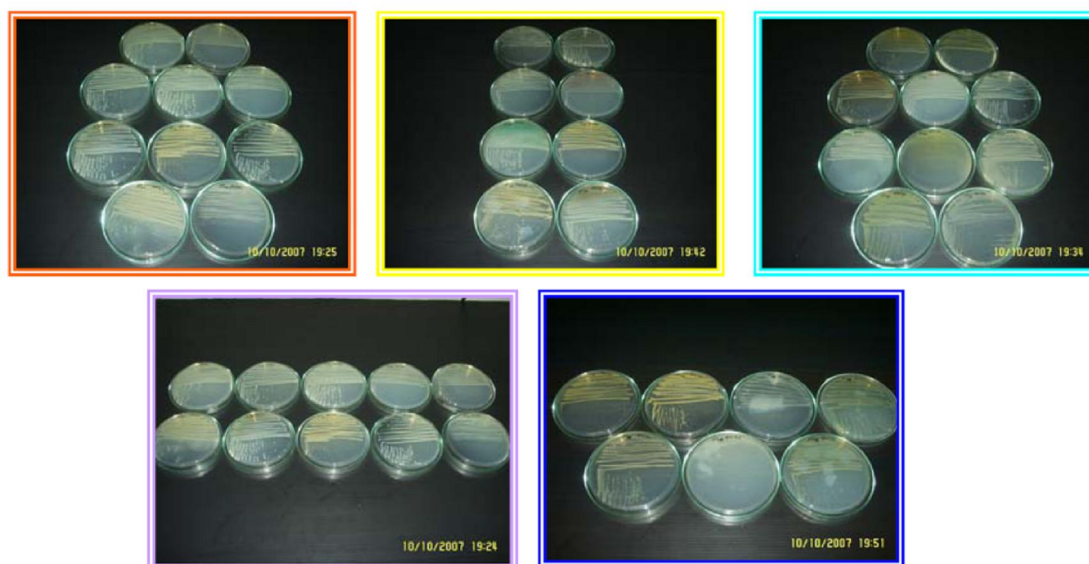
ร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จึงทำให้สามารถแยกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิดคือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ซึ่ง Gram-positive bacteria จะติดสีม่วงของ คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) และ Gram-negative bacteria จะติดสีแดงจากซาฟรานิน (safranin) เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะ โครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ ใน Gram-negative bacteria จะมีสารพวกไขมันที่ผนังเซลล์มากกว่า Gram-positive bacteria และยังมีชั้นของผนังเซลล์บางกว่าด้วย ในกระบวนการการย้อมสีเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์จะไปละลายไขมันทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้นจึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสี crystal violet และไอโอดีนคอมเพล็กซ์ (iodine complex) หลุดออกมา เมื่อย้อมสี safranin จึงติดสีแดงของ safranin แต่ใน Gram-positive bacteria ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยวเพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วงเมื่อย้อมทับด้วย safranin จึงไม่ติดสีแดง จากการทดสอบย้อมสีแกรมในแบคทีเรียที่คัดเลือกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 40 ชนิด พบว่ามีลักษณะการติดสีย้อมที่แตกต่างกันดังใน ตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงผลการย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติห้วยไฉ้

เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์
Pw1	แดง	ท่อน	Pw21	แดง	กลม
Pw2	แดง	กลม	Pw22	แดง	กลม
Pw3	แดง	กลม	Pw23	แดง	กลม
Pw 4	แดง	กลม	Pw 24	แดง	กลม
Pw5	แดง	กลม	Pw25	แดง	กลม
Pw6	แดง	กลม	Pw26	แดง	กลม
Pw7	แดง	กลม	Pw27	แดง	กลม
Pw 8	แดง	กลม	Pw28	แดง	กลม
Pw9	แดง	กลม	Pw29	แดง	กลม
Pw10	แดง	กลม	Pw30	แดง	กลม
Pw11	แดง	กลม	Pw31	แดง	กลม
Pw12	แดง	กลม	Pw32	แดง	กลม

เชื้อ	ลักษณะการย้อม ติดสีแกรม	รูปร่างของ เซลล์	เชื้อ	ลักษณะการย้อม ติดสีแกรม	รูปร่างของ เซลล์
Pw13	ม่วง	ท่อน	Pw33	แดง	กลม
Pw14	แดง	กลม	Pw34	แดง	กลม
Pw15	แดง	กลม	Pw35	แดง	กลม
Pw16	แดง	กลม	Pw36	แดง	กลม
Pw17	แดง	กลม	Pw37	แดง	กลม
Pw 18	แดง	กลม	Pw38	แดง	กลม
Pw19	แดง	กลม	Pw39	แดง	กลม
Pw20	แดง	กลม	Pw40	แดง	กลม

จากการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน สามารถแยกเชื้อได้ 45 ไอโซเลต คือ KS1 – KS45 โดยวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน ด้วย Dilution techniques (McCourt, 1988) ได้ผลการทดลองดังภาพ 16

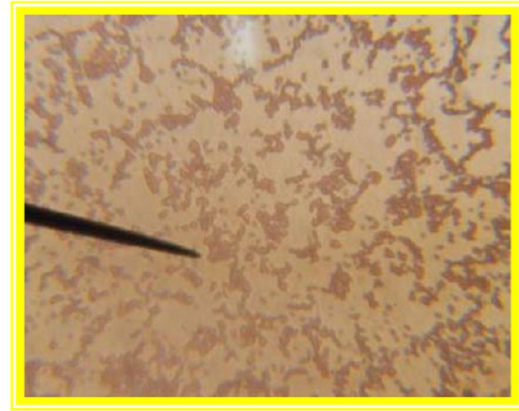
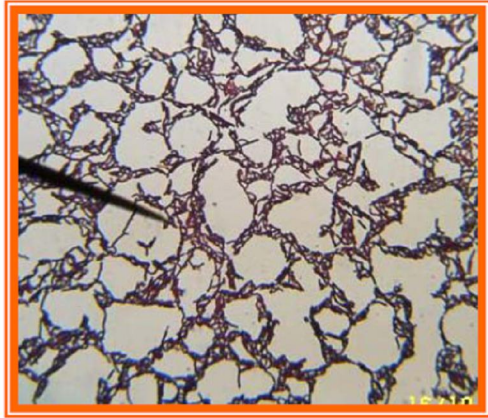


ภาพ 16 ตัวอย่างการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินของเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45

จากภาพ 16 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์ จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นนำมาทดสอบการย้อมสีแบบแกรมด้วยเทคนิค Gram's staining (McCourt, 1988) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45 มีผลการติดสีที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 การทดสอบการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) ในเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45

ไอโซเลต	ย้อมติดสี แกรม	ลักษณะ	เชื้อ แบคทีเรีย	ย้อมติดสี แกรม	ลักษณะ
KS1	+	ท่อน	KS24	-	กลม
KS2	+	ท่อน	KS25	-	ท่อน
KS3	-	ท่อน	KS26	-	ท่อน
KS4	-	ท่อน	KS27	-	ท่อน
KS5	-	กลม	KS28	-	ท่อน
KS6	-	ท่อน	KS29	-	ท่อน
KS7	-	ท่อน	KS30	-	ท่อน
KS8	-	กลม	KS31	-	ท่อน
KS9	-	ท่อน	KS32	-	ท่อน
KS10	-	ท่อน	KS33	-	ท่อน
KS11	-	ท่อน	KS34	-	ท่อน
KS12	-	ท่อน	KS35	-	ท่อน
KS13	-	ท่อน	KS36	-	ท่อน
KS14	-	ท่อน	KS37	-	ท่อน
KS15	-	ท่อน	KS38	-	ท่อน
KS16	-	ท่อน	KS39	-	กลม
KS17	-	ท่อน	KS40	-	ท่อน
KS18	-	ท่อน	KS41	+	ท่อน
KS19	-	ท่อน	KS42	-	ท่อน
KS20	-	ท่อน	KS43	-	ท่อน
KS21	-	ท่อน	KS44	+	ท่อน
KS22	-	ท่อน	KS45	-	ท่อน
KS23	-	ท่อน			



ก. KS44 แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน

ข. KS5 แบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลม

ภาพ 17 ตัวอย่างการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) โดยถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (compound microscope) กำลังขยาย 1000 เท่า

จากผลการทดสอบการย้อมแกรมในเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45 พบว่า เป็นแบคทีเรีย แกรมบวกติดสีม่วง (crystal violet) รูปร่างท่อน 4 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง(safranin) รูปร่างกลม 4 ชนิด และรูปร่างท่อน 37 ชนิด (ตารางที่ 22) ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง (safranin) ซึ่งสอดคล้องกับ นฤมล (2547) ที่คัดแยกเชื้อจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Huy *et al.* (1999) ที่มีการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันปิโตรเลียมจากดินพบว่า สายพันธุ์ DW2-1 ที่นำมาจำแนกการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและทางชีวเคมีพบว่า มีรูปร่างท่อน และติดสีแกรมลบ

การย้อมสีแบบแกรมเป็นการศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จึงทำให้สามารถแยกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงจากซาฟานิน (safranin) เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีสารพวกไขมันที่ผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และยังมีชั้นของผนังเซลล์บางกว่าด้วย ในกระบวนการย้อมสีเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์จะไปละลายไขมัน ทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้นจึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) และไอโอดีนคอมเพล็กซ์ (iodine complex) หลุดออกมา เมื่อย้อมสีซาฟานิน (safranin) จึงติดสีแดงของ safranin แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยวเพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีจะละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วงเมื่อย้อมทับด้วย safranin จึงไม่ติดสีแดง (นงลักษณ์, 2544)

2.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

ระยะที่ 1 นำตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณน้ำพุร้อน มาเลี้ยงในอาหาร LB broth สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ได้ 30 ชนิด เป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 22 ชนิด และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน 8 ชนิด การเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน นำมาเลี้ยงในอาหาร LB broth สามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ 11 ชนิด

ระยะที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์ที่พบเพิ่มเติมจากป่าบ้านโป่ง จำนวน 38 ไอโซเลต (SA1-SA38) จำนวนจุลินทรีย์ที่พบเพิ่มเติมจากห้วยใจ จำนวน 40 ไอโซเลต (PW1-PW40) และพบจำนวนจุลินทรีย์ในแหล่งที่ปนเปื้อนน้ำมัน จำนวน 13 ไอโซเลต

ตอนที่ 2 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่แยกได้

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตอน 1 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว เพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB โดยใช้ห้วงถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อบนอาหาร NA ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 hrs โดยมีขวดไม่ใส่เชื้อเป็นชุดควบคุม(control) วัดปริมาณเชื้อจากค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้แต่ละขวดมีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 หยดน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ลงในแต่ละขวด ขวดละ 2ml นำไปเขย่าต่ออีก 72 hrs ที่อุณหภูมิ 37°C สังเกตปริมาณของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อสีและความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตทุก ๆ 24 hrs และทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงกับชุดควบคุม (รัฐพร, 2541)

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วด้วยวิธีการทางกายภาพ โดยการสังเกตปริมาณน้ำมันที่ลอยอยู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ กำหนดระดับลักษณะของน้ำมันที่เปลี่ยนแปลงไปแบ่งเป็น 3 ระดับคือ 0, + และ ++ กล่าวคือ

ระดับ 0 : ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A)

ระดับ + : ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

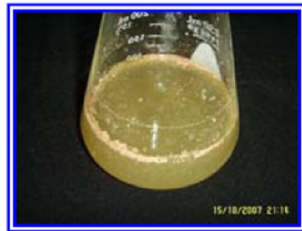
เปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันแตกตัวออกเป็นเม็ดน้ำมันขนาดใหญ่เล็กสลับกัน (B)

ระดับ ++ : ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

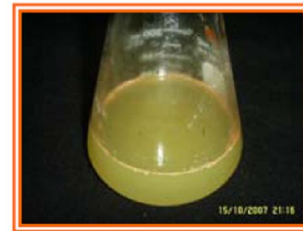
เปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันทั้งหมดแตกตัวเป็นเม็ดน้ำมันขนาดเล็ก (C)



(A) ชุดควบคุม



(B) ระดับ +



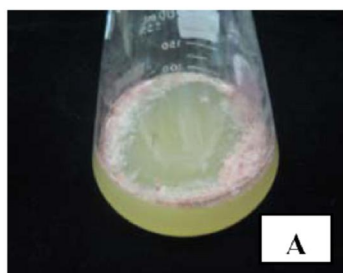
(C) ระดับ ++

ภาพ 18 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปแบบของน้ำมัน

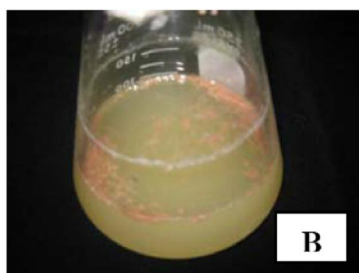
จากจุลินทรีย์ในระยะที่ 1 จากการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนสันกำแพง พบว่าเป็นแกรมบวก 21 ชนิด คือ W-1, W-2, W-3, W-4, W-5, W-8, W-9, W-10, W-11, W-13, W-14, W-17, W-18, W-20, S-23, S-24, S-25, S-26, S-27, S-28, S-30 แกรมลบ 9 ชนิด คือ W-6, W-7, W-12, W-15, W-16, W-19, W-21, W-22, S-29

จากการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าเป็นแกรมบวก 4 ชนิดคือ SO_2 , SO_3 , SO_6 , SO_9 แกรมลบ 7 ชนิดคือ SO_1 , SO_4 , SO_5 , SO_7 , SO_8 , SO_{10} , SO_{11}

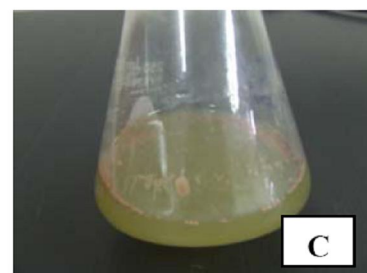
จากจุลินทรีย์ในระยะที่ 2 ได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการย่อยน้ำมัน ทั้งนี้ผลการย่อยสลายวัดด้วยระดับความสามารถที่กำหนดไว้ พบว่า



A



B



C

ภาพ 19 แสดงผลการย่อยสลายน้ำมันเครื่องใช้แล้ว

A คือ แบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันได้ระดับ 0 มีลักษณะของผิวหน้านั้นจะเป็นคราบน้ำมัน จับตัวกันเป็นกลุ่มและเป็นฝ้าบริเวณผิวหน้า มีทั้งหมด 11 ไอโซเลต คือ SA1, SA9, SA17, SA22, SA24, SA25, SA26, SA27, SA28, SA29, SA39

B คือ แบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันได้ระดับ + มีลักษณะผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีลักษณะเป็นฝ้า เมื่อน้ำมันแตกตัวเป็นก้อนเป็นก้อนขนาดใหญ่และจับตัวกันที่บริเวณผิวหน้าของอาหาร

มี ทั้งหมด 46 ไอโซเลต คือ SA3, SA4, SA5, SA10, SA14, SA18, SA19, SA23, SA30, SA32, SA33, SA34, SA35, SA36, SA37 และ PW2, PW3, PW4, PW6, PW7, PW8, PW9, PW11, PW12, PW13, PW14, PW15, PW16, PW18, PW19, PW20, PW21, PW23, PW34, PW25, PW26, PW28, PW29, PW30, PW31, PW33, PW34, PW37, PW39, PW40

C คือ แบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันได้ระดับ ++ มีลักษณะของน้ำมันแตกตัวเป็นเม็ดขนาดเล็กและจับตัวกันที่ข้าง ๆ ขวด มีทั้งหมด 21 ไอโซเลต ได้แก่ SA2, SA6, SA7, SA8, SA11, SA12, SA13, SA20, SA21, SA38, SA16 และ PW1, PW5, PW10, PW17, PW22, PW27, PW32, PW35, PW36, PW38

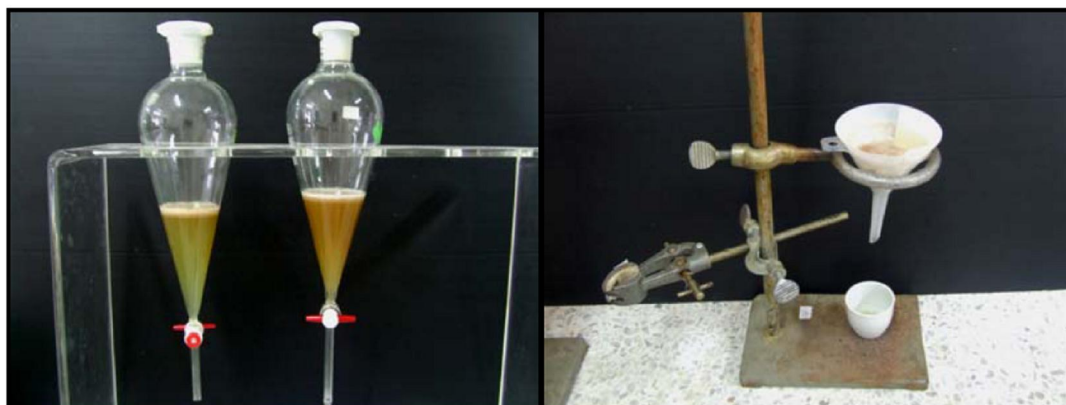
จากผลการเปรียบเทียบรูปแบบลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในตารางที่ 5 พบว่ามี 13 ไอโซเลต คือ KS21, KS23, KS25, KS27, KS28, KS29, KS30, KS34, KS35, KS37, KS38, KS41 และ KS44 มีลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในระดับ ++ (ภาพ 17, C) และ จำนวน 32 ไอโซเลต คือ KS1- KS20, KS22, KS24, KS26, KS29, KS31- KS33, KS36, KS39, KS40, KS42, KS43 มีลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในระดับ + (ภาพ 17, B)

จากการที่น้ำมันบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแรงตึงผิว คือ แรงดึงดูดและแรงยึดเหนี่ยวโมเลกุลบนพื้นผิวของของเหลวหรือผิวของของแข็ง ซึ่งปกติแล้วน้ำมันและน้ำจะแยกชั้นกัน โดยน้ำมันจะลอยอยู่ส่วนบนของน้ำ น้ำมันจะมีแรงตึงผิวและพันธะในตัวเอง และพันธะกับวัตถุอื่นที่แข็งแรงกว่าน้ำ ทำให้น้ำมันยึดเกาะติดกับวัตถุอื่นได้ดีกว่าน้ำ ลักษณะของน้ำมันมีการแตกตัวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bento *et al.* (2004) กล่าวว่าสาร biosurfactant ที่แบคทีเรียผลิตออกมาสามารถย่อยสลายน้ำมันได้บางส่วน แสดงว่าแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีการผลิตสาร biosurfactant จึงทำให้สามารถทำให้น้ำมันแตกตัวได้ดี ไม่รวมกันเป็นแพปกคลุมผิวหน้าอาหาร ซึ่งวิธีการศึกษาเช่นนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ รัฐพร (2541), นฤมล (2547), ไพจิตร (2547), ปิยะพรรณ (2550) และ อัญชลี (2550) ที่ได้ทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำมันเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 23 การทดสอบความสามารถการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	ผลการย่อยสลายน้ำมัน	ไอโซเลต	ผลการย่อยสลายน้ำมัน
Control	0	KS23	++
KS1	+	KS24	+
KS2	+	KS25	++
KS3	+	KS26	+
KS4	+	KS27	++
KS5	+	KS28	++
KS6	+	KS29	++
KS7	+	KS30	++
KS8	+	KS31	+
KS9	+	KS32	+
KS10	+	KS33	+
KS11	+	KS34	++
KS12	+	KS35	++
KS13	+	KS36	+
KS14	+	KS37	++
KS15	+	KS38	++
KS16	+	KS39	+
KS17	+	KS40	+
KS18	+	KS41	++
KS19	+	KS42	+
KS20	+	KS43	+
KS21	++	KS44	++
KS22	+	KS45	+

จากเชื้อที่สามารถย่อยน้ำมันได้ในระดับ ++ นั้นได้นำมาทดสอบโดยวิธี Partition gravimetric method และคำนวณค่าปริมาณไขมันได้ดังแสดงในตารางที่ 24



ก

ข

ภาพที่ 20 การทดสอบปริมาณน้ำมันที่เหลือด้วยวิธี partition gravimetric method

ก) แสดงการแยกชั้นระหว่างน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข) การกรองน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วกรองผ่าน Na_2SO_3 ใส่ลงในถ้วยคูลิเบด

ตารางที่ 24 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยน้ำมันได้ในระดับ 2

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การย่อยน้ำมัน
control	0%
SA 16	83.33%
SA 6	83.33%
SA 7	81.15%
SA 11	71.42%
SA 8	70.86%
SA 38	70.86%
SA 20	52.89%
SA 13	49.28%
SA 12	44.96%

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การย่อยน้ำมัน
SA 21	42.75%
SA 2	26.61%
Pw1	92.15%
Pw5	88.40%
Pw10	94.54%
Pw17	46.08%
Pw22	97.61%
Pw27	86%
Pw32	87.71%
Pw35	64.51%
Pw36	66.55%
Pw38	64.51%
KS21	77.27 %
KS23	90.90 %
KS25	0 %
KS27	95.45 %
KS28	72.72 %
KS29	45.45 %
KS30	95.45 %
KS34	31.82 %
KS35	31.82 %
KS37	95.45 %
KS38	81.82 %
KS41	36.36 %
KS44	68.18 %

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลต ด้วยวิธี Partition gravimetric (ตารางที่ 24 และภาพ 19) พบว่า แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วมากกว่า 50 % (ภาพ 19, C) จำนวน 8 ไอโซเลต คือ KS21, KS23, KS27, KS28, KS30, KS37, KS38 และ KS44



(A)



(B)



(C)

ชุดควบคุม เปอร์เซ็นต์การย่อยน้อยกว่า 50% เปอร์เซ็นต์การย่อยมากกว่า 50%

ภาพ 21 ลักษณะปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่หลังจากนำไปอบที่ 105 °C นาน 30 min

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ ภักดิ์ทิรา (2548) พบว่าเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุด คือ S27 ย่อยสลายน้ำมันได้ 79.39% ซึ่งได้จากบริเวณน้ำพุร้อน อ.สันกำแพง จ. เชียงใหม่ เช่นเดียวกับการศึกษาของ อัญชลี (2550) พบว่า SA 11/4 จากแหล่งดินธรรมชาติ สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วด้วยวิธี partition gravimetric method ได้สูงสุด 80.75% และ ปิยะพรพรรณ (2550) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 9 ชนิด จากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันได้มากกว่า 50 % คือ Pw22 Pw10 Pw1 Pw5 Pw32 Pw27 Pw36 Pw35 และ Pw38 สามารถย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ได้ดังนี้ 97.61 94.54 92.15 88.40 87.71 86.00 66.55 64.51 และ 64.51% ตามลำดับ และสอดคล้องกับ Huy *et al.* (1999) พบว่า มีแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากดินที่ปนเปื้อนในเวียดนาม เป็นแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* sp. และยังพบอีกว่า *Acinetobacter* sp. มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบได้ 95% เช่นเดียวกับมยุรี (2548) พบว่าการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. เชื้อแบคทีเรียที่มีผลการย่อยสลายไขมันที่ดีที่สุดคือ เชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่ถูกตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ที่มีการเขย่าอยู่ตลอดเวลา มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันดังนี้ 78.09 และ 64.5 % ตามลำดับ

ตอนที่ 3 ทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียด้วยวิธีชีวเคมี

ในงานวิจัยได้วิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันในกลุ่มไฮโดรคาร์บอนด้วยกระบวนการทางชีวเคมี คือ การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส โดยแสดงผลในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ไฮโซเลตต่าง ๆ

ไฮโซเลต	ค่าแอกติวิตีไลเปส (ยูนิต/ชม ³)
Pw1	1.88
Pw5	1.03
Pw10	2.90
Pw17	1.53
Pw22	2.22
Pw27	2.39
Pw32	2.39
Pw35	0.17
Pw36	2.05
Pw38	1.20
SA 38/2	3.44
SA 6/4	0.72
SA 11/4	4.32
SA 12/1	1.92
SA 7/1	4.00
SA 6/3	2.08
SA 38/4	4.23
SA 2/5	1.76
KS27	2.67
KS30	5.67
KS37	6.67
KS23	0.5
KS38	2.67
KS21	4.17
KS28	0.67
KS44	2.67



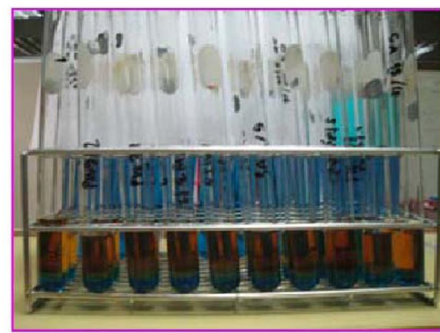
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพ 22 แสดงการทดสอบค่ากิจกรรมไลเปสโดยวิธี colorimetric method

(ก) แสดงสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิก

(ข) สารละลายเอนไซม์จากการทดสอบ colorimetric ในน้ำมันมะกอก

(ค) สารละลายเอนไซม์จากการทดสอบ colorimetric ในน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

(ง) แสดงความแตกต่างของสารละลายเอนไซม์ในน้ำมันมะกอกและน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

จากการทดสอบโดยวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วย Colorimetric method พบว่าเชื้อที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันเครื่องสูงสุด 3 อันดับแรก คือ KS37, KS30, และ KS21 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันเครื่อง เท่ากับ 1.01, 0.53, และ 0.48 U/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาของ อัญชลี (2550) และปิยะพรรณ (2550) พบว่าเชื้อรหัส SA และ PW จำต้องจำแนกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อทดสอบความคล้ายคลึงได้ชัดเจนขึ้น และนำมาทดสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส พบว่า SA 11/4 เป็นเชื้อที่แยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยวิธีไตเตรท 4.32 U/ml และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี colorimetric 0.74 U/ml และ ปิยะพรรณ (2550) พบว่าเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ด้วยการไตเตรทในน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว พบว่า Pw27/1 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ 3.60 U/ml และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี colorimetric 1.47 U/ml

จากการศึกษาของ Yoshiki *et al.*, 2007 พบว่า แร่ตังผิวดิน DW2-1 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในน้ำเสียระดับปานกลางที่สังเคราะห์ขึ้น ($>1 \times 10^{10}$ [CFU]/ml) ระหว่างอุณหภูมิที่ 20°C และ 38°C และอัตราการย่อยสลายของน้ำมันสลัดอยู่ที่ 90% หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs ไลเปสและกระบวนการแร่ตังผิวดินแบบชีวภาพ (BSF) ของแร่ตังผิวดิน DW2-1 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs อยู่ที่ 1720 U/l และ 480 U/ml ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไปเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน DW2-1 จะเป็นตัวหลักที่ทำให้เกิดการย่อยสลายถึง 90% ของน้ำมันสลัด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นระยะเวลา 7 วัน

จะเห็นว่า วิธีไตเตรทจะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าวิธี colorimetric ดังนั้น วิธี colorimetric จึงเป็นการตรวจสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ละเอียดกว่าการไตเตรท เนื่องจากการไตเตรทนั้น จุดยุติของสารสังเกตได้ยาก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลองนั้นอาจจะไม่เป็นไปตามมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากทั้ง 2 วิธีข้างต้น มีค่าที่แปรผันตามกัน ดังนั้นการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี colorimetric จึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและสะดวกกว่าวิธีไตเตรท สอดคล้องกับการทดลองของ Saisuburamaniyan *et al.* (2004) กล่าวว่าวิธี colorimetric เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในดิน กรดไขมันอิสระจะควบคุมด้วย cupric acetate pyridine reagent และวัดที่ความยาวคลื่น 715 nM การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้รวดเร็ว และใช้ในการคัดเลือกผลิตภัณฑ์จากไลเปสจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และนำเชื้อที่มีค่ากิจกรรมไลเปสสูงสุด 3 อันดับแรก ไปทำการทดลองขั้นต่อไป

Ghanem *et al.* (2000) รายงานว่า กลุ่มของ *Bacillus alcalophilus* สามารถผลิตไลเปสและจากการศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยอุณหภูมิสูงที่สุด คือ 6 °C ความเป็นกรด-ด่าง 10.6 ซึ่งอยู่ในช่วงเบส

ตอนที่ 4 การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรีย

สกัด DNA เพิ่มปริมาณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และหาลำดับเบสของ 16S rRNA นำข้อมูลลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตมาเปรียบเทียบข้อมูลของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมเปรียบเทียบที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ซึ่งได้ว่า SA 38/2 SA 6/4 SA 6/3 SA 11/4 SA 2/5 และ SA 38/4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp. SA 7/1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในสกุล *Ralstonia mannitolilytica* และ SA 12/1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในจำพวก Uncultured

bacterium ในขณะที่ Pw5/1 Pw5/2 และ Pw35/3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในจำพวก Uncultured bacterium ซึ่งเป็นเชื้อที่ยังไม่มีการค้นพบเพราะไม่มีความเหมือนกับ Gen Bank Pw27/1 และ Pw35/2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp. Pw3/2 และ Pw35/1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในสกุล *Enterobacter* sp. Pw10/2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในจำพวก *Ralstonia mannitolilytica* และ Pw32/1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในจำพวก *Bacillus cereus* และพบวาร์หัส KS ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 3 อันดับแรก ได้แก่ เชื้อ KS21 และ KS30 คือเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และ KS37 คือเชื้อแบคทีเรีย *Lysinibacillus boronitolerans* มี % ความเหมือน 100 % เชื้อที่แยกได้อยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* พบว่าสอดคล้องกับงานของ F.L. Toledo, (2005) ที่คัดเลือกเชื้อจากน้ำมัน ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีสารไฮโดรคาร์บอน และเมื่อจำแนกโดย 16S rDNA ส่วนใหญ่คือเชื้อ *Bacillus* เช่นกัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Bento *et al.* (2004) กล่าวว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้นั้น แยกมาจากดินในแคลิฟอร์เนียและดินจากฮ่องกงที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซล เมื่อนำจุลินทรีย์เหล่านั้นมาจำแนกโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่าเป็น *Bacillus cereus*, *bacillus sphaericus*, *B. fusiformis*, *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas* sp. และ *B. pumilus* การวิเคราะห์กลุ่มการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ในแบคทีเรียที่แยกได้ปรากฏว่า 70 % คล้ายกับกลุ่มพวกที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน และที่นำไปประยุกต์ในการบำบัดน้ำเสียและฟื้นฟูสภาพดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียม สอดคล้องกับ Ghazali *et al.*, (2004) ที่กล่าวว่า แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วได้ดี และในส่วนของ การทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียที่มีค่าแตกต่างกัน เพราะเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่างกัน

จากการศึกษาของ Savaporn *et al.*, 2006 พบว่าการจับกลุ่มของรูปแบบการสังเคราะห์ ด้วยการใช้เครื่องแสดงผลทางคณิตศาสตร์ที่ละขั้นตอน (SDA) แสดงให้เห็นถึงอัตราของหมู่ที่จำเป็นต้องควบคุมความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง และสามารถลดลงจาก 11 กลุ่มเบื้องต้นสำหรับ 16S rDNA คัดเลือกให้เหลือ 3 กลุ่ม ความต่อเนื่องกันเริ่มกำเนิดขึ้นจาก rDNA (16S rDNA transcripts) ถูกนำกลับใช้ได้ใหม่ในเครือข่ายเดียวกัน ประกอบด้วย การแยกเพาะเชื้อจุลินทรีย์ของ *Bacillus marisflavi*, *Microbacterium oxydans* และ *Pseudomonas oleovorans* การศึกษาการแยกตัวของดินเหล่านี้ด้วยการใช้น้ำมันหล่อลื่นให้เหมือนกับเป็นแหล่งกำเนิดคาร์บอน สามารถแยกแบคทีเรีย 317 ชนิด มี 3 ชนิดที่แสดงถึงความคล้ายคลึงกันอย่างต่อเนื่อง (N96%) ด้วยแบบ 16S rDNA ซึ่งจำแนกโดยใช้ SDA ทำให้เกิดความแตกต่างเป็นอย่างมาก ระหว่างกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งถูกตรวจสอบที่ละอย่าง และการผสมผสานกันของความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น การศึกษาวิเคราะห์นี้ถูกสาธิตให้เห็นว่าการคัดเลือกโดยใช้การรวมกลุ่มกันของสิ่งที่คล้ายคลึงกับโมเลกุล SDA จะทำให้การ

ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งในสารอาหารเหลวและทรายที่ปนเปื้อนมากกว่าการใช้แบคทีเรียชนิดเดียว

จากการทดลองของ S. Khodijah *et al.*, 2004 พบว่า การใช้ 16S rDNA ค้นพบว่าแบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตรอดอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น ประกอบไปด้วยแบคทีเรียหลากหลายรูปร่าง เช่น รูปทรงกลม (*Streptococcus* และ *Staphylococcus*) and รูปท่อนยาว (*Streptobacillus*) จากการศึกษาด้วยกระบวนการบำบัดด้วยชีวภาพด้วยการวัดแบบการทดลองทางวิทยาศาสตร์ การทดลองโครโมโซมในห้องปฏิบัติการ(ประกอบด้วย สำหรับทะเล ทรายจากชายหาด และน้ำมันเข้มข้น) ภายใต้เงื่อนไขการใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตด้วยการบำบัด 2 วิธี ที่แตกต่างกัน (วางไว้ในและนอกอาคาร) ถูกสร้างขึ้นในการบำบัดพื้นพูน้ำมันที่รั่วไหล เพื่อศึกษาค้นคว้าบทบาทที่สำคัญของแบคทีเรียในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน ไม่มีความแตกต่างอย่างเด่นชัดของกระบวนการของแบคทีเรีย ในการรักษาทั้ง 2 แบบ และการขจัดน้ำมันจำนวนมากด้วยการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียภายนอกอาคารมีผลมากกว่าภายในอาคารเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ค่าของ pH, Eh, EC และ ออกซิเจนละลาย (DO) ในการรักษาทั้ง 2 แบบ แสดงให้เห็นว่า กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้นภายใต้เงื่อนไขของการต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (DO: 1–6 mg/l; Eh:12–300 mV) และเงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8) ด้วย NaCl ความเข้มข้นที่ 3–15% (ECs of 45–200 mS/cm)

จากการใช้เทคนิค 16S rDNA ทำให้ได้สาย DNA ของ 16S rDNA gene ที่มีความแตกต่างในแบคทีเรียแต่ละชนิด สามารถนำมาใช้เพื่อตรวจสอบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใดหรือกลุ่มใดในฐานข้อมูล (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> หรือ <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการทำวิจัยต่อไป (ศรีสุตา, 2552)

ตอนที่ 5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่คัดเลือกได้

นำเชื้อ KS21, KS30, KS37 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงสุด 3 อันดับแรก และอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* ซึ่งคัดแยกจากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และ Pw3/2, Pw27/1 อยู่ในกลุ่มของ *Acinetobacter* sp. (ปิยะพรรณ, 2550) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงสุด 2 อันดับแรก ซึ่งคัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และ SA 11/4, SA 6/3 อยู่ในกลุ่มของ *Acinetobacter* sp. (อัญชลี, 2550) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงสุด 2 อันดับแรก ซึ่งคัดแยกจากแหล่งดินธรรมชาติ เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) อุณหภูมิ ปริมาณการให้อากาศ และ% NaCl เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยแบคทีเรีย (ภักทิรา, 2548)

5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

ใช้ห้วงถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของแต่ละเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อจากค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้แต่ละขวดมีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 แล้วปรับ pH ในอาหาร NB เป็น 8.5, 9.0, 9.5 แต่ละขวดอย่างน้อย 2 ข้าง นำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 hrs หลังจากนั้นนำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ขณะเดียวกันนำเชื้อที่วัดค่า $OD = 0.5$ ไปเกลี่ย (spread plate) บนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ได้ผลดังตาราง 8

ตารางที่ 26 การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างแตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลต	ค่า OD_{600}		
		pH 8.5	pH 9.0	pH 9.5
1	KS21	1.139	0.989	1.068
2	KS30	1.126	1.095	1.144
3	KS37	1.391	1.250	1.267
4	Pw3/2	0.988	1.019	1.036
5	Pw27/1	1.099	1.118	1.135
6	SA 11/4	1.214	1.205	1.187
7	SA 6/3	1.498	1.180	1.211

จากตารางที่ 26 เชื้อ KS21, KS30, KS37 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* และ SA 11/4, SA 6/3 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 8.5 และ Pw3/2, Pw27/1 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 9.5 ซึ่งใกล้เคียงกับ Ghanem *et al.* (2000) รายงานว่ากลุ่มของ *Bacillus alcalophilus* สามารถผลิตไลเปส และจากการศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยอุณหภูมิสูงที่สุด คือ 6 °C ความเป็นกรด-ด่าง 10.6 ซึ่งอยู่ในช่วงเบส และสอดคล้องกับ ภันทิรา, (2548) ที่ทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 9.0

แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบจำนวนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในหนึ่งกรัมของดินที่อุดมสมบูรณ์ มีแบคทีเรียมากถึงหนึ่งแสนถึงพันล้านโคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียที่พบในดินโดยทั่วไป มีรูปร่าง 3 แบบคือ แบบกลม แบบแท่ง และแบบเกลียว แบคทีเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในดินที่มีอินทรีย์วัตถุ มีความชื้นพอสมควร และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ระหว่าง 5.5 – 9.0 กิจกรรมของแบคทีเรียในดินมีมากมาย แต่ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์ คือ การเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน ทำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และทำให้เกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนในดินเป็นต้น แบคทีเรียที่พบและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ เช่น *Pseudomonas sp*, *Rhizobium sp*, *Bacillus sp*, *Clostridium sp* เป็นต้น (สมศักดิ์, 2528)

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ pH ของดิน พบว่า *Actinomycetes sp.* มี pH เหมาะสมระหว่าง 7.0 -7.5 ถ้าเป็นดินที่เป็นกรดมากๆ จะชะงักการเจริญเติบโตหรือตาย ส่วน *Azotobacter chroococum* เจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกลางหรือค่อนข้างเป็นเบส แต่ไม่เจริญในดินที่ pH ต่ำกว่า 4.0 (บัญญัติ, 2532)

pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แตกต่างกันไป ส่วนมากเจริญได้ที่ pH 6-8 ยีสต์และราส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะเป็นกรด (acidophile) แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะเบส (alkaliphile) และจากงานวิจัยของ Hao et al., 2004 พบว่า thermophile bacteria สายพันธุ์ TH-2 ที่มีชีวิตอยู่ในบริเวณ Shengli ที่มีน้ำมัน ในภาคตะวันออกของประเทศจีน สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 85 °C และเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง

เช่นเดียวกับ การศึกษาของนงลักษณ์ (2544) ; Rahman et al., (2002) ; ปิยะพรหม (2550) พบว่า ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และจากการศึกษาของ S. Khodijah et al., 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8)

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่เป็นด่าง เชื้อที่คัดแยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติและแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมทั้งกลุ่ม *Bacillus* และ *Acinetobacter sp.* สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนกว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

ใช้หัวง่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของแต่ละเชื้อจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อ OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 แต่ละขวดอย่างน้อย 2 ซ้ำโดยกำหนดการเลี้ยงเชื้อ KS21, KS30, KS37, SA

11/4, SA 6/3 มี pH 8.5 และ Pw27/1, Pw3/2 มี pH 9.5 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 °C นาน 48 hrs หลังจากนั้นนำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ขณะเดียวกันก็นำเชื้อที่วัดค่า OD = 0.5 ไปเกลี่ย (spread plate) บนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ได้ผลดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลต	ค่า OD ₆₀₀		
		อุณหภูมิ 37 °C	อุณหภูมิ 40 °C	อุณหภูมิ 45 °C
1	KS21	1.139	1.126	0.692
2	KS30	1.126	1.138	0.576
3	KS37	1.391	0.556	0.558
4	Pw3/2	1.036	0.920	0.906
5	Pw27/1	1.146	1.135	0.471
6	SA 11/4	1.170	0.927	0.616
7	SA 6/3	1.723	1.069	1.066

จากตารางที่ 27 เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C และเชื้อ KS30, KS21, Pw27/1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C ถึง 40 °C ซึ่งการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถเกิดได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง โดยเกิดจากจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ (Psychrophile) อุณหภูมิปานกลาง (Mesophile) และในอุณหภูมิสูง (Thermophile) พบว่าการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน สามารถเกิดขึ้นได้ในอุณหภูมิต่ำประมาณ 0 °C และอุณหภูมิสูงประมาณ 70 °C ส่วนประกอบของน้ำมันมีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันที่อุณหภูมิต่างๆ โดยที่อุณหภูมิต่ำจะชะลอการระเหยของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ต่างๆ ทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 20 °C น้ำมันที่มีความเข้มข้นต่ำจะถูกย่อยสลายได้ดีกว่าน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง และส่วนประกอบที่เป็นพิษจะระเหยได้อย่างรวดเร็ว แต่ที่อุณหภูมิ 10 °C ส่วนประกอบที่เป็นพิษที่สามารถระเหยได้จะมีอัตราการระเหยต่ำลงมาก ซึ่งสารพิษนี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันลดต่ำลง (Antai, 2003) ใกล้เคียงกับ Susan, 2003 ที่พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันไป เช่น Psychrophilic microbe, Mesophilic microbe, Thermophilic microbe

และ extreme thermophiles microbe จุลินทรีย์ที่อาศัยในบริเวณแอนตาร์กติก สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20-30 °C และอุณหภูมิสูงที่สุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโต คือ อุณหภูมิน้อยกว่า 37 °C ซึ่งที่อุณหภูมินี้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนได้ดี เช่นเดียวกับงานวิจัยของ (Hao R. *et al.*, 2004; ภัณฑิรา, 2548) และพบว่า *Bacillus* sp. สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ที่อุณหภูมิ 20 °C – 44 °C (Antai S.P., 1990) เช่นเดียวกับ KS21 และ KS30 ซึ่งย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนได้ดีที่อุณหภูมินี้ (Gilber and Higgins., 1978)

จากการศึกษาของ Yoshiki *et al.*, 2007 พบว่า แร่ตังผิว DW2-1 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในน้ำเสียระดับปานกลางที่สังเคราะห์ขึ้น ($>1 \times 10^{10}$ [CFU]/ml) ระหว่างอุณหภูมิที่ 20 °C และ 38 °C และอัตราการย่อยสลายของน้ำมันสลัดอยู่ที่ 90% หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs ไลเปสและกระบวนการแร่ตังผิวแบบชีวภาพ (BSF) ของแร่ตังผิว DW2-1 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs อยู่ที่ 1720 U/l และ 480 U/ml ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไปเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน DW2-1 จะเป็นตัวหลักที่ทำให้เกิดการย่อยสลายถึง 90% ของน้ำมันสลัด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทั่วไปแล้วอาจสรุปได้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ สามารถใช้เป็นดัชนีในการบ่งบอกว่าสิ่งแวดล้อมบริเวณต่างๆ มีการปนเปื้อนจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือไม่ ซึ่งพบว่าในบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้เพียง 0.1% จากจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมด แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะพบว่ามีจุลินทรีย์กลุ่มนี้เท่านั้นที่เจริญเติบโตได้หรือคิดเป็น 99.67 % ของจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมด

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติ แหล่งน้ำธรรมชาติและแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วทั้งกลุ่ม *Bacillus* และ *Acinetobacter* sp. ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C และบางเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิมะหว่าง 37 ถึง 40 °C เพราะเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

5.3 การให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

ใช้หัวง่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของแต่ละเชื้อ มาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อจากค่า OD₆₀₀ เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.5 แต่ละขวดอย่างน้อย 2 ขวด เลี้ยงเชื้อ KS21, KS30, KS37, SA 11/4, SA 6/3 มี pH 8.5 และ Pw27/1, Pw3/2 มี pH 9.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทดสอบการเจริญเติบโตที่ความเร็วรอบ 100, 150 และ 180 rpm นาน 48 hrs หลังจากนั้นนำไปวัดอัตราการ

เจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ขณะเดียวกันก็นำเชื้อที่วัดค่า OD = 0.5 ไปเกลี่ย(spread plate)บนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ความเร็วรอบในการเขย่าแตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลต	ค่า OD ₆₀₀		
		100 rpm	150 rpm	200 rpm
1	KS21	1.110	1.159	1.198
2	KS30	0.931	1.149	1.034
3	KS37	0.558	1.391	1.290
4	Pw3/2	0.772	1.036	0.893
5	Pw27/1	1.063	1.181	1.051
6	SA 11/4	0.860	1.214	1.048
7	SA 6/3	0.936	1.498	0.936

จากตารางที่ 28 เชื้อ KS30, KS37, SA 11/4, SA 6/3, Pw3/2, Pw27/1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเร็วรอบของการให้อากาศ 150 rpm ยกเว้น KS21 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเร็วรอบของการให้อากาศ 200 rpm ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่ต้องการอากาศ และสอดคล้องกับ ภัณฑิรา (2548) ที่ทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดี ที่ความเร็วรอบของการให้อากาศ 150 rpm และเช่นเดียวกับ Grishchenkov (2000) ที่ทำการศึกษา *Seudomonas* sp. BS2201, BS2203 และ *Breibacillus* sp. BS2202 ซึ่งเป็น Nitrate-reducing bacterial ที่คัดแยกจากดินที่มีน้ำมันปิโตรเลียมปนเปื้อน สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนปิโตรเลียมได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งสภาวะที่มีออกซิเจนสามารถย่อยสลาย alkane (C10–C35) ได้ 90-95% ในเวลา 10 วัน ส่วนในสภาวะไม่มีออกซิเจน สามารถย่อยสลาย alkane ได้ 20-25% นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbons ได้ 15-18%

จุลินทรีย์ในดินส่วนมากประมาณ 90 - 95 % เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยใช้ ออกซิเจนเพื่อการหายใจและออกซิไดซ์สารต่างๆ ทำให้การย่อยสลายและการเปลี่ยนแปลงของอินทรีย์วัตถุเป็นไปอย่างรวดเร็ว ในดินที่มีการหมุนเวียนของอากาศได้ดี กิจกรรมของจุลินทรีย์จะเกิดได้

อย่างรวดเร็ว การหมุนเวียนของอากาศในดิน นอกจากจะมีผลต่อการย่อยอินทรีย์วัตถุของจุลินทรีย์แล้วยังเกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของจุลินทรีย์ในดินอีกด้วย เพราะอากาศเป็นของผสมที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ การย่อยสลายน้ำมันในแหล่งน้ำต่างๆ โดยจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะในปฏิกิริยาออกซิเดชันของจุลินทรีย์ ที่ต้องอาศัยเอนไซม์ออกซิจีเนส และสำหรับสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งน้ำนี้ ออกซิเจนจากอากาศสามารถที่จะละลายได้โดยตรง ทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการย่อยสลายน้ำมัน สภาพแวดล้อมบนบกนั้นพบว่า ปริมาณออกซิเจนในดินจะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ออกซิเจนจากอากาศได้ ชนิดของดินและปริมาณน้ำในดิน ทำให้สภาพบนบกนั้น ออกซิเจนจะเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับอัตราเร็วในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ (บัญญัติ, 2532)

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมและอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการย่อยสลาย alkane ได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการออกซิเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น aerobic type เจริญได้เฉพาะบริเวณที่มีออกซิเจนเท่านั้น microaerophile type เจริญได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ถ้ามีออกซิเจนมากจะเจริญช้าๆ anaerobic type เจริญได้ดีในที่ที่ไม่มีออกซิเจน และ Facultative anaerobic type เจริญได้ทั้งสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแปลงระบบเมตาบอลิซึมของตนเองได้ Farinazleen (2004) ได้คัดเลือก *Bacillus* และ *Pseudomonas* spp. จากดินที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อน พบว่าสามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 150 rpm

อย่างไรก็ตามพบว่าความเร็วรอบที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (ภณทิรา, 2548; Mukherji S. *et al.*, 2003)

5.4 เปอร์เซนต์ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

ใช้หว่านถ่ายเชื้อแต่ละโคโลนีของแต่ละเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อจากค่า OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 แต่ละขวดอย่างน้อย 2 ขวด เลี้ยงเชื้อ KS21, KS30, KS37, SA 11/4, SA 6/3 ที่ pH 8.5 และ Pw27/1, Pw3/2 ที่ pH 9.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ยกเว้น KS21 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm และเติม NaCl 0.5, 1.0, 2.0 % บ่มเป็นเวลา 48 hrs วัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ขณะเดียวกันก็นำเชื้อที่วัดค่า OD=0.5 ไปเกลี่ย(spread plate) บนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ % NaCl แตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลต	ค่า OD ₆₀₀		
		0.5 % NaCl	1.0 % NaCl	2.0% NaCl
1	KS21	1.094	1.133	1.160
2	KS30	1.137	1.125	1.055
3	KS37	0.659	0.697	0.614
4	Pw3/2	0.745	0.785	0.825
5	Pw27/1	1.199	1.082	1.019
6	SA 11/4	1.235	0.898	0.954
7	SA 6/3	0.885	0.894	0.981

จากตารางที่ 29 เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ 0.5 ถึง 2.0 % NaCl ทั้งเชื้อที่มาจากแหล่งน้ำและดินธรรมชาติ และจากแหล่งดินปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเค็มแตกต่างกัน บางชนิดอาจเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเค็มมาก แต่บางชนิดอาจเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเค็มเพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mukherji (2003) ที่ได้คัดแยก ES1 จากบริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อน ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มี NaCl 0.5% และสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้สูงสุด 61% เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน

การย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสภาพที่มีความเค็มสูง เมื่อเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนลงไปในตัวอยางจากน้ำทะเลสาบ Great salt and Great salt lake ที่มลรัฐ Utah ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ระดับความเค็มต่างๆ (ตั้งแต่ 3.3 -28.4 %) พบว่าอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะลดลง เมื่อระดับความเค็มของน้ำสูงขึ้น โดยที่อัตราการย่อยสลายจะไม่สัมพันธ์กับปริมาณของออกซิเจนที่มีอยู่ต่ำ และปริมาณของสารอินทรีย์ต่างๆ และยังพบว่าในสภาพที่มีจุลินทรีย์ปริมาณสูงจะสามารถใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนได้พอสมควร โดยความเค็มของน้ำทะเลต้องไม่เกิน 20 % (Ward and Brock, 1978)

จากการศึกษา ของ Hitoshi *et al.*, 2008 พบว่า ความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมัน turbine (TuO) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมหลักคือ cycloalkanes และ isoalkanes ซึ่งได้รับมาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแหล่งน้ำมันที่นำกลับมาปรับปรุงให้ดีขึ้น เมื่อกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชื่อ Atsuta A ถูกเพาะเลี้ยงในสารละลายเกลือเจือจางที่ 0.5% (w/v) TuO จะเกิดการย่อยสลาย 90%

S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของการต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (DO: 1–6 mg/l; Eh:12–300 mV) และเงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8) ด้วย NaCl ความเข้มข้นที่ 3–15% (ECs of 45–200 mS/cm)

อย่างไรก็ตามพบว่า % NaCl ที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (ภักดีทิรา, 2548; Mukherji S. *et al.*, 2003)

3. การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม

3.1 การออกแบบฐานข้อมูลจุลินทรีย์

ได้ทำการค้นคว้ารวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์ (microbial database) จากสถาบันเก็บจุลินทรีย์ทั้งในประเทศและต่างประเทศที่ได้มาตรฐาน เช่น ศูนย์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย หรือ TISTR Microbiological Resources Center (<http://www.tistr.or.th/mircen>), American Type Culture Collection หรือ ATCC (<http://www.atcc.org>), Japan Collection of Microorganisms หรือ JCM (<http://www.jcm.riken.go.jp>) โดยได้ปรึกษาร่วมกับผู้ออกแบบและจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อทำการออกแบบฐานข้อมูลให้ได้ตามที่ต้องการ และได้มาตรฐานเทียบเท่าระดับสากล และได้ทำการทดสอบจุดบกพร่องของฐานข้อมูล เพื่อรองรับการใช้งานร่วมกับระบบเครือข่ายในอนาคต

โดยข้อมูลที่สามารถบรรจุลงในฐานข้อมูลนั้นเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญ ทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกเพื่อนำประยุกต์ใช้ได้ง่าย โดยฐานข้อมูลถูกออกแบบเพื่อให้สามารถใช้คำสำคัญในการค้นหาข้อมูลในระบบได้ ข้อมูลที่สำคัญที่สามารถบรรจุลงในฐานข้อมูลมีทั้งชื่อทางวิทยาศาสตร์และชนิดของจุลินทรีย์ ระดับความปลอดภัย (biosafety level) สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสม การนำไปประยุกต์ใช้ และลำดับเบสของดีเอ็นเอ

โดยทางผู้ออกแบบระบบฐานข้อมูลจุลินทรีย์ ได้ทำการเขียนคู่มือการใช้งานฐานข้อมูลจุลินทรีย์ เพื่อง่ายต่อผู้ใช้งานและดูแลฐานข้อมูล โดยได้แสดงไว้ในภาคผนวก ง

3.2 การจัดเก็บรักษาจุลินทรีย์

ได้มีการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารอินทรีย์และน้ำเสีย (โครงการย่อยที่ 1) ซึ่งสามารถรวบรวมได้ทั้งสิ้น 120 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน ที่ได้จากโครงการการแยกและคัดเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน (โครงการย่อยที่ 2) ซึ่งสามารถรวบรวมได้ทั้งสิ้น 110 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ถูกจัดเก็บไว้ใน 3 รูปแบบด้วยกันคือ

การเก็บรักษาบนอาหารผิวหน้าวุ้นเอียง การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาโดยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) เพื่อร่อนนำไปจำแนกด้วยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในลำดับต่อไป

3.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม

จากสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่รวบรวมได้ทั้งสิ้น 330 ไอโซเลท ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และน้ำมัน เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์รวมทั้งสิ้น 92 ไอโซเลท โดยนำมาทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป จากนั้นนำ genomic DNA ความเข้มข้นประมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ที่ลำดับเบสในตำแหน่ง V_1-V_3 โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ 27F และ 520R ทำการตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท พบว่า DNA ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส แสดงดังภาพ 23 ทำ PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้ TaKaRa SUPREC™-PCR แล้วนำ PCR product ที่บริสุทธิ์นี้ไปทำการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ซึ่งได้ลำดับเบส ดังภาพภาคผนวก จ แล้วนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F นำไปเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST โดยแสดงผลการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในตารางที่ 30

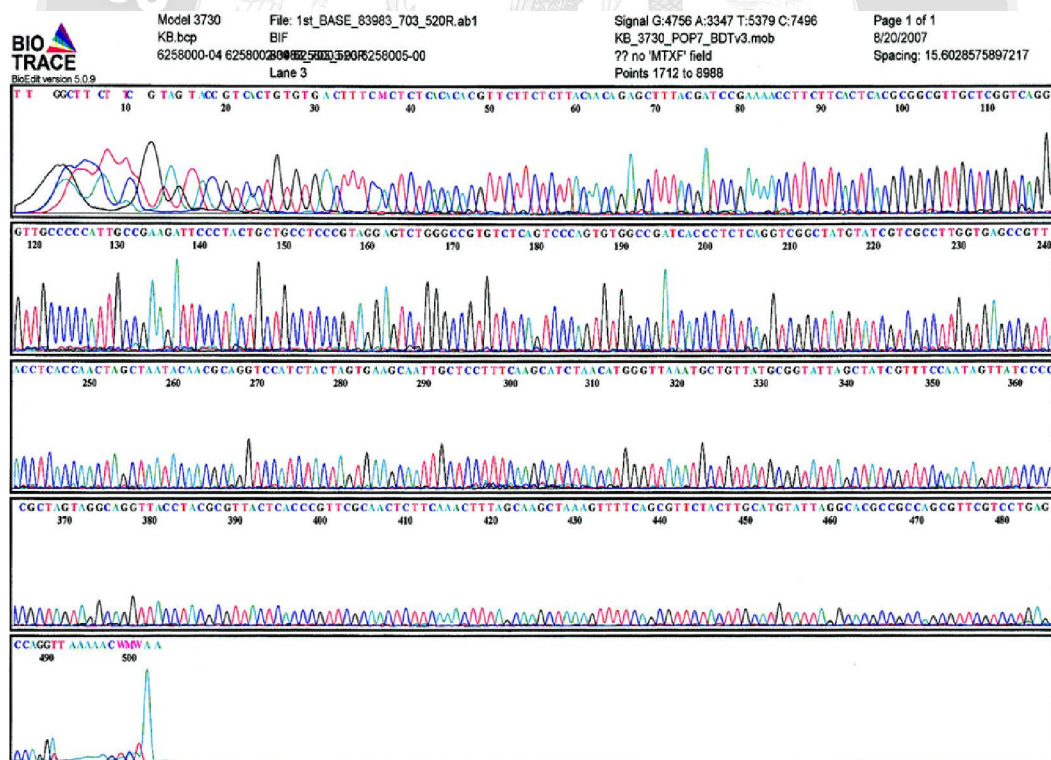
จากตารางที่ 30 พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย คือแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียคล้ายราในกลุ่มของแอคติโนมัยซีต *Streptomyces* มีความสามารถในการย่อยสลายสารในน้ำเสียอีกด้วย ส่วนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันนั้น พบว่าส่วนใหญ่สามารถจำแนกได้เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* และ *Bacillus*



ภาพที่ 23 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่งลำดับเบส บริเวณ V_1 - V_3

Lane 1 คือ DNA marker

Lane 2 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรีย



ภาพที่ 24 ภาพตัวอย่างลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย

```

>gb|EF040535.1| Bacillus sp. JS-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1472

Score = 866 bits (960), Expect = 0.0
Identities = 480/480 (100%), Gaps = 0/480 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GGCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG 60
      |||
Sbjct 4 GGCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG 63

Query 61 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA 120
      |||
Sbjct 64 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA 123

Query 121 GCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGT 180
      |||
Sbjct 124 GCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGT 183

Query 181 CACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGGCTACCAAGGCG 240
      |||
Sbjct 184 CACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGGCTACCAAGGCG 243

Query 241 ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA 300
      |||
Sbjct 244 ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA 303

Query 301 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC 360
      |||
Sbjct 304 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC 363

Query 361 GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG 420
      |||
Sbjct 364 GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG 423

Query 421 CGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC 480
      |||
Sbjct 424 CGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC 483

```

ภาพที่ 25 ตัวอย่างชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรีย PB014 ที่นำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสของ primer 27F ไปเทียบกับใน โปรแกรม BioEdit



ตารางที่ 30 แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และ น้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing

No.	ไอโซเลท	ชนิดจุลินทรีย์	Accession No.	bp/bp	% Homology
1	MJUT011	<i>Bacillus pumilus</i>	EU311209	491/495	99.2
2	MJUT019	<i>Bacillus megaterium</i>	DQ833751	489/492	99.4
3	MJUT026	Uncultured Bacilli bacterium	EF698019	482/482	100
4	MJUT033	<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF523245	492/499	98.6
5	MJUT036	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AB301017	490/491	99.8
6	MJUT067	<i>Bacillus cereus</i>	EU283326	495/497	99.6
7	MJUT071	<i>Bacillus cereus</i>	EF633270	488/490	99.6
8	MJUT074	<i>Bacillus</i> sp.	EU584514	501/505	99.2
9	MJUT075	<i>Bacillus megaterium</i>	EU221388	465/467	99.6
10	MJUT076	<i>Bacillus cereus</i>	DQ517909	494/495	99.8
11	MJUT108	<i>Bacillus fusiformis</i>	EF472269	441/509	86.6
12	MJUT109	<i>Bacillus fusiformis</i>	EF472269	416/503	82.7
13	MJUT112	<i>Bacillus subtilis</i>	EU334510	491/493	99.6
14	MJUT113	<i>Bacillus</i> sp.	EF503532	479/482	99.4
15	MJUT118	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AB301017	490/493	99.4
16	MJUT119	<i>Bacillus cereus</i>	EF633205	489/495	98.8
17	MJUT120	<i>Bacillus subtilis</i>	EF472266	496/497	99.8
18	MJUT122	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	492/495	99.4
19	MJUT125	Uncultured <i>Bacillus</i> sp.	EU026426	747/799	93.5
20	MJUT130	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB364957	473/474	99.8
21	MJUT133	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF176772	491/493	99.6
22	MJUT136	<i>Bacillus</i> sp.	EU365432	492/496	99.2
23	MJUT137	<i>Bacillus</i> sp.	AJ809499	496/499	99.4
24	MJUT138	<i>Pseudoburkholderia malthae</i>	DQ490985	483/490	98.6
25	MJUT139	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	494/497	99.4
26	MJUT143	<i>Bacillus subtilis</i>	AY808064	496/497	99.8

ตารางที่ 30 แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และ น้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing (ต่อ)

No.	ไอโซเลท	ชนิดจุลินทรีย์	Accession No.	bp/bp	% Homology
27	MJUT151	<i>Bacillus pumilus</i>	AF260751	494/497	99.4
28	MJUT162	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF176772	491/492	99.8
29	MJUT164	<i>Bacillus subtilis</i>	EF472266	492/493	99.8
30	MJUT165	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	490/491	99.8
31	MJUT170	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	487/491	99.2
32	MJUT171	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	490/492	99.6
33	MJUT172	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	AB184676	463/471	98.3
34	MJUT178	<i>Streptomyces chartreusis</i>	AB184839	458/464	98.7
35	MJUT197	<i>Streptomyces chartreusis</i>	AB184839	452/455	99.3
36	PB001	<i>Bacillus sp.</i>	EF040535	480/480	100
37	PB002	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF176772	499/501	99.6
38	PB003	<i>Bacillus subtilis</i>	EU489517	494/497	99.4
39	PB004	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF176772	495/496	99.8
40	PB005	<i>Bacillus subtilis</i>	EU489517	493/495	99.6
41	PB006	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	494/495	99.8
42	PB007	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	491/494	99.4
43	PB008	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	480/480	100
44	PB009	<i>Bacillus sp.</i>	EU365432	497/501	99.2
45	PB010	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	491/493	99.6
46	PB011	<i>Bacillus subtilis</i>	EU294413	491/493	99.6
47	PB012	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	491/494	99.4
48	PB013	<i>Bacillus pumilus</i>	EU327994	494/498	99.2
49	PB014	<i>Bacillus sp.</i>	EF040535	493/495	99.6
50	HPB015	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	492/496	99.2
51	HPB016	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	492/496	99.2
52	HPB017	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	494/498	99.2

ตารางที่ 30 แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และ น้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing (ต่อ)

No.	ไอโซเลท	ชนิดจุลินทรีย์	Accession No.	bp/bp	% Homology
53	HPB018	<i>Bacillus subtilis</i>	EU334106	488/492	99.2
54	HPB019	<i>Bacillus subtilis</i>	EF530208	495/500	99.0
55	HPB020	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	495/497	99.6
56	HPB021	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	495/497	99.6
57	HPB022	<i>Bacillus subtilis</i>	EF530208	499/502	99.4
58	HPB023	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	494/498	99.2
59	HPB024	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	491/494	99.4
60	HPB025	<i>Bacillus subtilis</i>	EU489517	493/496	99.4
61	HPB026	<i>Bacillus</i> sp.	EU365432	493/494	99.8
62	HPB027	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	489/492	99.4
63	HPB028	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	496/497	99.8
64	PW32	<i>Bacillus cereus</i>	DQ517909	492/493	99.8
65	PW3/2	<i>Enterobacter</i> sp.	EU081851	475/486	97.7
66	PW35/2	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	487/491	99.2
67	SA12/1	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	473/477	99.2
68	SA38/2	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	483/489	98.8
69	PW5/2	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	472/478	98.7
70	SA6/3	Uncultured bacterium	EF613004	476/478	99.6
71	PW35/1	<i>Enterobacter</i> sp.	DQ988939	472/473	99.8
72	PW10/2	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	AY043378	480/485	98.9
73	SA7/1	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	AY043378	489/496	98.6
74	SA6/4	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	483/490	98.6
75	PW5/1	Uncultured bacterium	EF613004	471/475	99.2
76	PW27	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	479/488	98.2
77	SA11/4	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	483/491	98.4
78	SA38/4	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	486/490	99.2
79	SA2/5	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	482/490	98.4

ตารางที่ 30 แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และ น้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing (ต่อ)

No.	ไอโซเลต	ชนิดจุลินทรีย์	Accession No.	bp/bp	% Homology
80	PW35/3	<i>Pantoea agglomerans</i>	DQ536506	486/489	99.4
81	KS21	<i>Bacillus thuringiensis</i>	FJ358616	500/500	100
82	KS23	<i>Bacillus sphaericus</i>	DQ833758	500/500	100
83	KS27	<i>Bacillus cereus</i>	EU244736	496/498	99.6
84	KS28	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ234439	500/500	100
85	KS30	<i>Bacillus thuringiensis</i>	FJ236808	498/500	99.6
86	KS37	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	FJ237498	500/500	100
87	KS38	<i>Bacillus sphaericus</i>	DQ833758	499/499	100
88	KS44	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ234439	500/500	100
89	S27	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FJ222551	500/500	100
90	SO5	Uncultured bacterium clone	EU769179	500/500	100
91	SO7	Uncultured bacterium clone	EU769179	500/500	100
92	W17	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FJ222551	500/500	100

4. การผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียเชิงพาณิชย์

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในถังหมักจุลินทรีย์ที่ผลิตในระดับ

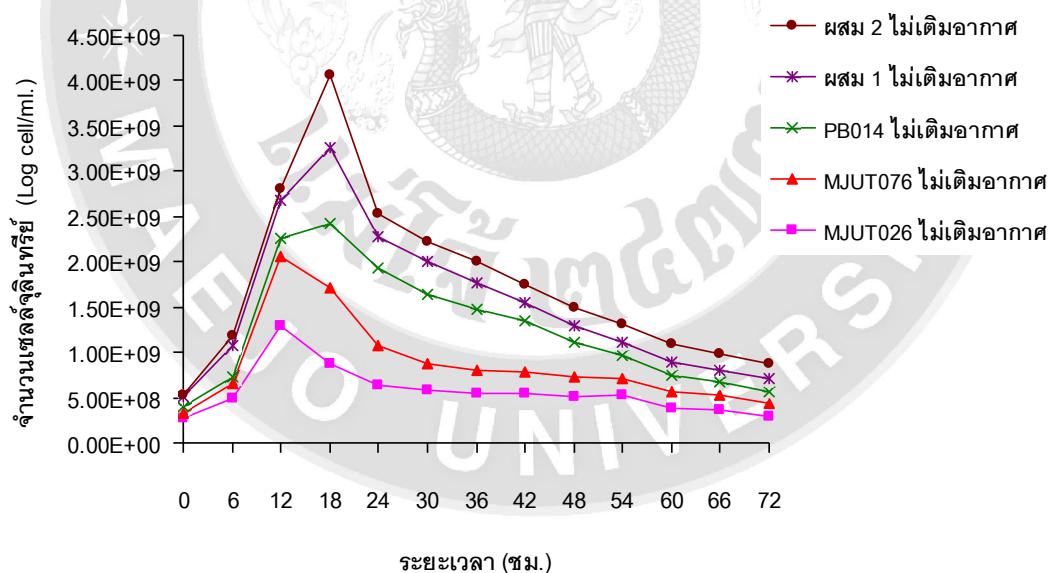
อุตสาหกรรม

การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดภายหลังการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้นในระดับอุตสาหกรรม ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในถังหมักที่ออกแบบ การหมักให้มีการเติมอากาศและไม่เติมอากาศจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาจนมีจำนวนสูงสุดอยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การหมักจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม 1 แบบไม่เติมอากาศจะให้จำนวนเซลล์ในระดับสูงสุดมากกว่าแบบเติมอากาศ การหมักเชื้อผสม 2 พบว่า การหมักแบบเติมอากาศให้จำนวนจุลินทรีย์ในระดับสูงสุดมากกว่าการหมักแบบไม่เติมอากาศ ในการใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ พบว่าการหมักแบบไม่เติมอากาศทำให้จุลินทรีย์มีการใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์จนมีจำนวนสูงสุดเร็วกว่าการหมักแบบเติมอากาศ ใช้เวลาตั้งแต่ 6 ถึง 24

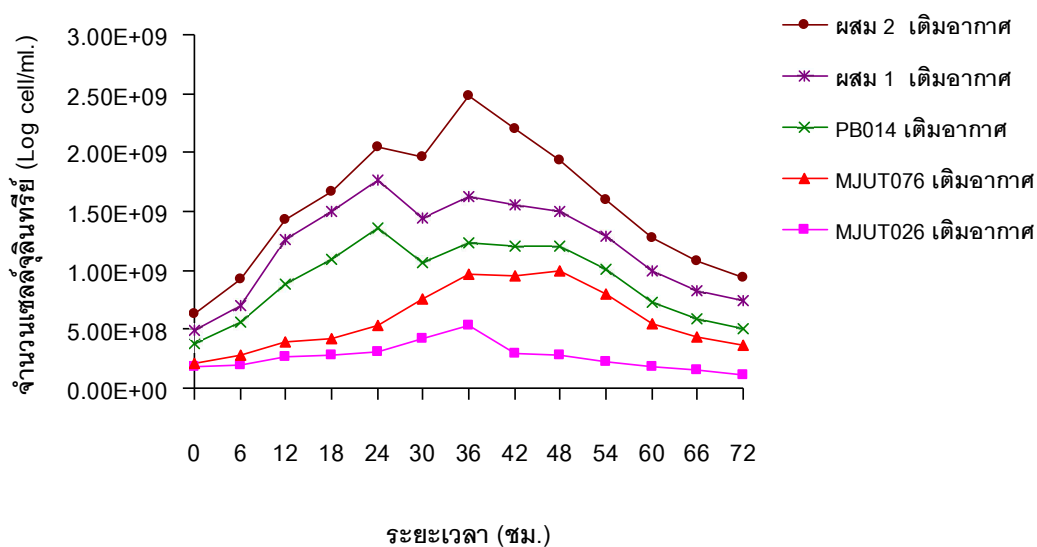
ชั่วโมง (ภาพที่ 5) ส่วนการหมักแบบเติมอากาศจะใช้เวลา 12 ถึง 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 6) หลังจากนั้น จุลินทรีย์ในถังหมักจะมีจำนวนเซลล์ลดลงตามระยะเวลา อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้พบว่าจำนวน เซลล์ของจุลินทรีย์ในชั่วโมงที่ 72 จะมีจำนวนมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นหรือในชั่วโมงที่ 0 และ ยังคงมีจำนวนเซลล์อยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.2 ค่าความหวานและความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ของสารละลายในถังหมัก

ผลการวัดค่าความหวานและความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ของสารละลายในถังหมักที่เติม อากาศและไม่เติมอากาศ พบว่าสารละลายในถังหมักมีค่าความหวานเริ่มต้นอยู่ในช่วง 8-13 °Brix และเมื่อเวลาผ่านไป ค่าความหวานของสารละลายจะมีระดับลดลง เช่นเดียวกับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลาย ซึ่งมีค่าเริ่มต้นอยู่ในช่วงพีเอช 5-7 หลังจากนั้นสารละลายจะมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น โดยมีค่าพีเอชลดลง ในชั่วโมงที่ 72 พบว่า สารละลายในถังหมักทั้งเติมอากาศและไม่เติมอากาศมีค่าพี เอชอยู่ในช่วง 3-4 (ตารางที่ 31 และ 32)



ภาพที่ 26 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในถังหมักที่ไม่เติมอากาศ



ภาพที่ 27 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในถังหมักที่เติมอากาศ

ตารางที่ 31 ค่าพีเอชและค่าความหวานของสารละลายในถังหมักที่ไม่เติมอากาศ

ระยะเวลา (ชม.)	พีเอชและความหวานของสารละลายในถังหมักไม่เติมอากาศ				
	เชื้อรหัส MJUT026	เชื้อรหัส MJUT076	เชื้อรหัส PB014	เชื้อผสม 1	เชื้อผสม 2
0	7.14 / 13.2	5.14 / 8.4	5.32 / 10.8	5.99 / 9.6	5.05 / 13.0
6	4.93 / 12.8	4.53 / 8.4	4.24 / 10.8	5.64 / 9.4	4.81 / 12.8
12	4.72 / 12.0	4.30 / 8.4	3.72 / 10.8	3.69 / 9.0	3.76 / 12.4
18	3.72 / 11.8	3.93 / 8.4	3.69 / 10.4	3.59 / 9.0	3.26 / 12.0
24	3.78 / 11.6	3.98 / 8.4	3.66 / 10.6	3.63 / 8.8	3.12 / 11.6
30	3.26 / 11.6	3.90 / 8.2	3.65 / 10.6	3.55 / 8.8	3.06 / 11.6
36	3.27 / 11.6	3.79 / 8.2	3.56 / 10.6	3.61 / 8.8	3.01 / 11.4
42	3.31 / 11.6	3.83 / 8.2	3.52 / 10.4	3.49 / 8.8	2.99 / 11.2
48	3.21 / 11.6	4.00 / 8.2	3.51 / 10.4	3.54 / 8.8	2.94 / 11.2
54	3.17 / 11.6	3.94 / 8.2	3.52 / 10.4	3.45 / 8.8	2.88 / 11.2
60	3.06 / 11.6	3.88 / 8.2	3.50 / 10.4	3.44 / 8.8	2.82 / 11.2
66	3.08 / 11.6	3.86 / 8.2	3.49 / 10.4	3.38 / 8.8	2.85 / 11.2
72	3.10 / 11.6	3.76 / 8.2	3.37 / 10.4	3.30 / 8.8	2.82 / 11.2
หมายเหตุ	เชื้อผสม 1 หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT076, MJUT122 และ PB014				
	เชื้อผสม 2 หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014				

ตารางที่ 32 ค่าพีเอชและค่าความหวานของสารละลายในถังหมักที่เติมอากาศ

ระยะเวลา (ชม.)	พีเอชและความหวานของสารละลายในถังหมักที่เติมอากาศ				
	เชื้อรหัส MJUT026	เชื้อรหัส MJUT076	เชื้อรหัส PB014	เชื้อผสม 1	เชื้อผสม 2
0	6.28 / 11.6	5.41 / 12.2	6.63 / 8.4	6.63 / 8.6	5.64 / 10.6
6	6.17 / 11.4	4.53 / 12.0	6.27 / 8.4	6.27 / 8.6	4.95 / 10.6
12	5.55 / 11.4	4.30 / 11.4	5.99 / 8.6	5.99 / 8.6	4.76 / 10.4
18	4.24 / 11.4	3.93 / 11.2	4.60 / 8.4	4.60 / 8.4	4.13 / 10.4
24	3.99 / 11.0	3.98 / 10.4	4.41 / 8.4	4.41 / 8.4	4.21 / 10.4
30	3.88 / 10.0	3.94 / 10.2	4.12 / 8.4	4.12 / 8.4	4.91 / 10.4
36	3.82 / 10.0	3.94 / 10.2	3.97 / 8.6	3.97 / 8.4	4.91 / 10.4
42	3.69 / 10.0	3.89 / 10.0	3.75 / 8.4	3.75 / 8.4	4.90 / 10.2
48	3.61 / 9.8	3.91 / 10.0	3.64 / 8.4	3.64 / 8.4	2.80 / 10.2
54	3.69 / 9.6	3.88 / 10.0	3.61 / 8.4	3.61 / 8.4	4.76 / 10.2
60	3.52 / 9.6	3.86 / 9.8	3.56 / 8.0	3.56 / 8.0	4.74 / 10.2
66	3.45 / 9.4	3.83 / 9.8	3.47 / 8.0	3.47 / 8.0	4.70 / 10.2
72	3.49 / 9.4	3.76 / 9.8	3.40 / 8.0	3.40 / 8.0	4.69 / 10.2
หมายเหตุ	เชื้อผสม 1 หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT076, MJUT122 และ PB014				
	เชื้อผสม 2 หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014				

3. การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการบำบัดขยะ

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายสารในขยะมาผลิตในระดับ

อุตสาหกรรมแล้วนำมาทดสอบบำบัดขยะ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 แบบ คือการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในรูปของเหลวราดโดยตรง (แบบเปียก) และ การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ทำเป็นปุ๋ยหมักโรย (แบบแห้ง) พบว่า ลักษณะของขยะในการทดลองทั้ง 2 แบบ จากวันแรกถึงวันสุดท้ายของการบำบัด สีของขยะโดยเฉพาะหญ้าซึ่งมีสีเขียวอ่อนจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวย้ำและเป็นสีน้ำตาลในที่สุด ในวันที่ 2-3 ของการบำบัดจะปรากฏเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญบริเวณผิวหน้าของขยะ ปริมาตรและน้ำหนักของขยะเริ่มลดลง ลักษณะของเมล็ดข้าว และเศษอาหารอื่นในขยะเปลี่ยนไปไม่คงรูป จนกระทั่งไม่ปรากฏลักษณะเดิมของเศษอาหารนั้นให้เห็น พบว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะดังกล่าว

ในขณะที่ยอดน้ำจะเกิดขึ้นเร็วกว่าขณะที่ไม่ได้เติมเชื้อ การใช้จุลินทรีย์แบบแห้งทำให้ขยะมีการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าการใช้จุลินทรีย์แบบเปียก การใช้จุลินทรีย์บำบัดขยะทั้งแบบเปียกและแบบแห้งพบว่า ขยะที่เติมเชื้อ MJU076 จะมีการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าขยะที่เติมเชื้อ MJUT138 และขยะที่เติมเชื้อผสม ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าขยะที่ไม่ได้เติมเชื้อ (ชุดควบคุม)

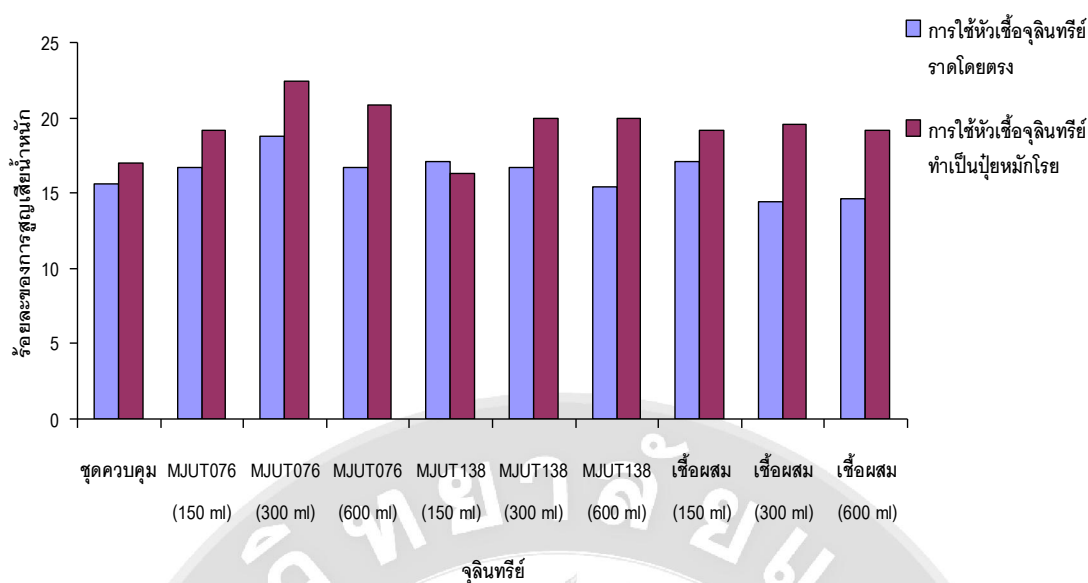
จากการวัดอุณหภูมิของขยะ ในวันแรกของการบำบัด พบว่า อุณหภูมิของขยะในการทดลองทั้ง 2 แบบ มีอุณหภูมิใกล้เคียงและเท่ากับอุณหภูมิห้อง ในวันที่ 2-10 ของการบำบัด อุณหภูมิของขยะทั้งหมดจะสูงขึ้นมากกว่าอุณหภูมิห้อง ขยะที่เติมเชื้อแบบเปียกจะมีอุณหภูมิสูงกว่าขยะที่เติมเชื้อแบบแห้ง และขยะที่เติมเชื้อทั้งแบบเปียกและแห้งจะมีอุณหภูมิสูงกว่าขยะที่ไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์ (ชุดควบคุม) ในวันที่ 11-12 ของการบำบัด ขยะทั้งหมดมีอุณหภูมิลดลงจนใกล้เคียงและเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 33)

ผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ในขยะ พบว่าพีเอชของขยะวันแรกถึงวันที่ 2 ของการทดลองใช้หัวเชื้อแบบเปียก มีค่าเท่ากับ 4 และแบบแห้งมีค่าเท่ากับ 5 ซึ่งเท่ากับขยะที่ไม่ได้เติมเชื้อจุลินทรีย์ (ชุดควบคุม) โดยพบว่าขยะที่เติมเชื้อ MJUT076 (300 มิลลิลิตร) และ MJUT138 (150 มิลลิลิตร) จะมีค่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชใกล้เคียงกับชุดควบคุม โดยค่าพีเอชของขยะจะสูงขึ้นในวันที่ 4-8 และจะสูงขึ้นอีกในวันที่ 10-12 ในวันสุดท้ายของการบำบัด ขยะที่เติมเชื้อแบบเปียกจะมีค่าพีเอชเท่ากับขยะชุดควบคุมคือ 8 และขยะที่เติมเชื้อแบบแห้งจะมีค่าพีเอชเท่ากับขยะชุดควบคุมคือ 9 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของขยะที่เติมเชื้อผสมจะมีการเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกับขยะที่เติมเชื้อเดี่ยว แต่ต่ำกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 7)

ผลการวัดการสูญเสียน้ำหนัก พบว่าการบำบัดขยะโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แบบแห้งทำให้ขยะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักมากกว่าการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แบบเปียก ซึ่งการบำบัดขยะด้วยเชื้อจุลินทรีย์จะทำให้ขยะมีน้ำหนักลดลงมากกว่าขยะในชุดควบคุม

การบำบัดขยะแบบเปียก พบว่าการใช้เชื้อเดี่ยว MJUT076 (300 มิลลิลิตร) ทำให้ขยะมีน้ำหนักลดลงมากที่สุดเท่ากับ 18.82 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ MJUT138 (150 มิลลิลิตร) ทำให้ขยะมีน้ำหนักลดลง 17.07 และ 21.74 เปอร์เซ็นต์ การบำบัดขยะด้วยเชื้อจุลินทรีย์แบบเปียกทำให้ขยะมีน้ำหนักลดลงมากกว่าขยะที่ไม่ได้เติมเชื้อ(ชุดควบคุม) ลดลงเท่ากับ 15.66 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการบำบัดขยะแบบแห้ง พบว่าการใช้เชื้อเดี่ยว MJUT076 (300 มิลลิลิตร) และ MJUT076 (600 มิลลิลิตร) ทำให้ขยะมีน้ำหนักลดลงมากที่สุดเท่ากับ 22.45 และ 20.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าขยะที่เติมเชื้อ MJUT138 และขยะที่ไม่ได้เติมเชื้อ (ภาพที่ 28)

จุลินทรีย์	อุณหภูมิและค่าพีเอชของขยะ							
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 13
ขยะหลังใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แบบเปียกบำบัด								
อุณหภูมิห้อง	31.0	32.0	29.0	31.0	29.0	28.5	27.0	28.0
ชุดควบคุม	32.0 / 4	42.0 / 4	38.0 / 5	35.0 / 7	32.0 / 7	30.5 / 8	28.0 / 8	28.0 / 8
076(150ml)	32.0 / 4	48.0 / 4	43.0 / 5	36.0 / 7	33.0 / 7	33.0 / 8	30.0 / 8	28.5 / 8
076(300ml)	32.0 / 4	47.0 / 4	43.5 / 5	38.0 / 7	33.5 / 7	32.5 / 8	31.0 / 8	28.0 / 8
076(600ml)	31.5 / 4	47.5 / 4	43.0 / 5	36.0 / 7	32.0 / 7	31.0 / 8	28.5 / 8	28.0 / 8
138(150ml)	32.0 / 4	47.5 / 4	42.0 / 5	39.5 / 7	33.5 / 7	31.0 / 8	30.5 / 8	28.0 / 8
138(300ml)	31.5 / 4	48.0 / 4	42.0 / 5	38.5 / 7	32.5 / 7	32.0 / 8	30.5 / 8	28.0 / 8
138(600ml)	31.5 / 4	48.0 / 4	40.0 / 5	38.5 / 7	32.5 / 7	30.5 / 7	30.0 / 8	28.0 / 8
ผสม(150ml)	31.0 / 4	45.5 / 4	41.0 / 5	36.0 / 7	32.0 / 7	30.5 / 7	27.5 / 8	28.0 / 8
ผสม(300ml)	31.0 / 4	46.0 / 4	42.0 / 5	35.5 / 7	32.0 / 7	31.0 / 8	30.0 / 8	28.0 / 8
ผสม(600ml)	32.0 / 4	46.0 / 4	42.5 / 5	36.5 / 7	32.0 / 7	31.0 / 7	29.5 / 8	28.0 / 8
ขยะหลังใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แบบแห้งบำบัด								
อุณหภูมิห้อง	31.0	29.0	28.0	26.0	26.0	27.0	27.0	27.0
ชุดควบคุม	31.5 / 5	34.0 / 5	32.0 / 7	30.0 / 8	30.5 / 8	29.0 / 9	29.0 / 9	28.0 / 9
076(150ml)	31.0 / 5	36.0 / 5	33.0 / 7	31.0 / 7	29.0 / 8	29.0 / 8	29.0 / 9	27.5 / 9
076(300ml)	31.5 / 5	36.5 / 5	33.0 / 7	31.0 / 8	29.0 / 8	29.0 / 9	28.5 / 9	27.5 / 9
076(600ml)	31.0 / 5	35.5 / 5	33.0 / 7	31.5 / 7	29.0 / 8	29.0 / 8	29.0 / 9	27.5 / 9
138(150ml)	31.0 / 5	35.5 / 5	33.0 / 7	30.5 / 8	29.0 / 8	29.5 / 9	28.0 / 9	27.5 / 9
138(300ml)	31.0 / 5	35.0 / 5	32.0 / 7	31.0 / 7	29.0 / 8	29.5 / 8	28.0 / 9	27.5 / 9
138(600ml)	31.0 / 5	35.0 / 5	32.0 / 7	31.0 / 7	29.5 / 8	29.5 / 8	28.5 / 9	27.5 / 9
ผสม(150ml)	31.0 / 5	35.0 / 5	32.5 / 7	30.0 / 7	28.5 / 8	29.5 / 8	28.5 / 9	27.5 / 9
ผสม(300ml)	31.0 / 5	36.0 / 5	32.0 / 7	30.0 / 8	28.5 / 8	29.0 / 8	27.5 / 9	27.0 / 9
ผสม(600ml)	31.0 / 5	35.5 / 5	32.5 / 7	30.0 / 8	29.0 / 8	29.0 / 8	27.5 / 9	27.0 / 9
หมายเหตุ	เชื้อผสม หมายถึง เชื้อผสม MJUT033, MJUT076, MJUT138, MJUT122 และ PB004							



ภาพที่ 28 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารในขยะโดยการบำบัดด้วยเชื้อจุลินทรีย์แบบเปียกและแบบแห้ง

4. การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารในน้ำเสีย

การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายสารในน้ำเสียทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม มาทดลองผลิตในระดับอุตสาหกรรมแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ ไปทดสอบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปสุกรแม่โจ้ บริษัทเบทาโกรภาคเหนือ เกษตรอุตสาหกรรม จำกัด และโรงแรมเชียงใหม่รัตนโกสินทร์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ให้ผลดังนี้

4.1 ผลการบำบัดน้ำเสียของโรงแรมเชียงใหม่รัตนโกสินทร์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ เชื้อเดี่ยว

จากการนำเชื้อเดี่ยวรหัส MJUT026, MJUT076 และ PB014 ที่ให้ผลดีในระดับห้องปฏิบัติการ มาผลิตในระดับอุตสาหกรรมทั้งแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศไปเติมในบ่อน้ำเสียของโรงแรม ปริมาณเชื้อละ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของน้ำเสียในบ่อ ทั้งให้ตามระยะเวลาเก็บกักน้ำเสียแล้วเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากระบบบำบัดมาทำการวิเคราะห์ค่าบีโอดี พบว่า การทดลองบำบัดน้ำเสียด้วยเชื้อจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยว MJUT026 ที่ผลิตได้แบบเติมอากาศ สามารถลดค่าบีโอดีได้ดีที่สุดเท่ากับ 54.28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อเดี่ยว MJUT076 และ PB014 พบว่า ให้ค่าการบำบัดบีโอดีได้ไม่ดี สำหรับเชื้อเดี่ยว PB014 และ MJUT026 ที่ผลิตได้แบบไม่เติมอากาศพบว่า สามารถลดค่าบีโอดีได้ดีที่สุดเท่ากับ 65.21 เปอร์เซ็นต์และ 56.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบ

ความสามารถในการบำบัดค่าบีโอดีของเชื้อเดี่ยวที่ผลิตได้แบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศพบว่าเชื้อเดี่ยว PB014 แบบไม่เติมอากาศมีประสิทธิภาพในการบำบัดค่าบีโอดีได้สูงที่สุด บำบัดได้ 65.21 เปอร์เซ็นต์ เชื้อเดี่ยว MJUT026 ที่ผลิตได้แบบไม่เติมและเติมอากาศให้ประสิทธิภาพการบำบัดได้รองลงมามีค่าเท่ากับ 56.40 และ 54.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 34)

ตารางที่ 34 ค่าบีโอดีของน้ำทิ้งโรงแรมเชียงใหม่รัตนโกสินทร์ ก่อนและหลังการเติมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	ค่า BOD (mg/L)	
	น้ำทิ้งก่อนบำบัด	น้ำทิ้งหลังการบำบัด
ผลิตแบบเติมอากาศ		
รหัส PB014	222	306
รหัส MJUT026	420	192
รหัส MJUT076	288	384
เชื้อผสม 1	108	81
เชื้อผสม 2	330	522
ผลิตแบบไม่เติมอากาศ		
รหัส PB014	276	96
รหัส MJUT026	468	204
รหัส MJUT076	228	243
เชื้อผสม 1	141	114
เชื้อผสม 2	108	165

หมายเหตุ เชื้อผสม 1 หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT076, MJUT122 และ PB014
เชื้อผสม 2 หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014

เชื้อผสม

จากการนำเชื้อเดี่ยวที่ให้ผลดีในการย่อยสลายน้ำเสียในระดับห้องปฏิบัติการมาทำการผสมเป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อผสม 1 (เชื้อผสม MJUT026, MJUT076, MJUT122 และ PB014) และเชื้อผสม 2 (เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014) มาผลิตในระดับอุตสาหกรรม ทั้งแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ ไปเติมในบ่อน้ำเสียปริมาณเชื้อละ 3 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำเสียในบ่อ ทิ้งไว้ตามระยะเวลาเก็บกักน้ำเสียแล้วเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากระบบบำบัดมาทำการวิเคราะห์

ค่าบีไอดี พบว่าเชื้อผสม 1 แบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศให้ผลการบำบัดค่าบีไอดีได้ดีกว่าเชื้อผสม 2 เท่ากับ 25.00 และ 19.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเชื้อผสม 2 พบว่ามีค่าบีไอดีหลังการบำบัดสูงกว่าก่อนบำบัด (ตารางที่ 34)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อทั้งหมด พบว่าเชื้อเดี่ยว PB 014 แบบไม่เติมอากาศให้ค่าการบำบัดดีที่สุดคือ 65.21 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเชื้อเดี่ยว MJUT026 แบบไม่เติมอากาศและแบบเติมอากาศ บำบัดได้ 53.22 และ 49.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.2 ผลการบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปสุกรแม่โจ้

เชื้อเดี่ยว

จากการนำเชื้อเดี่ยวรหัส MJUT026, MJUT076 และ PB014 ที่ให้ผลดีในระดับห้องปฏิบัติการ มาผลิตในระดับอุตสาหกรรมทั้งแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ ไปเติมในบ่อน้ำเสียของโรงงานแปรรูปสุกรแม่โจ้ ปริมาณเชื้อละ 3 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำเสียในบ่อ ทิ้งไว้ตามระยะเวลาเก็บกักน้ำเสียแล้วเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากระบบบำบัดมาทำการวิเคราะห์ค่าบีไอดี พบว่าเชื้อเดี่ยว PB014 แบบไม่เติมอากาศให้ผลการบำบัดสูงสุดที่ 64.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อเดี่ยว MJUT076 แบบไม่เติมอากาศและเชื้อเดี่ยว MJUT026 แบบไม่เติมอากาศให้ผลการบำบัดรองลงมาคือ 39.16 เปอร์เซ็นต์และ 35.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการบำบัดค่าบีไอดีได้ดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวแบบเติมอากาศ

เชื้อผสม

จากการนำเชื้อเดี่ยวที่ให้ผลดีในการย่อยสลายน้ำเสียในระดับห้องปฏิบัติการมาทำการผสมเป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อผสม 1 (เชื้อผสม MJUT026, MJUT076, MJUT122 และ PB014) และเชื้อผสม 2 (เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014 มาผลิตในระดับอุตสาหกรรมทั้งแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ ไปเติมในบ่อน้ำเสียปริมาณเชื้อละ 3 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำเสียในบ่อ ทิ้งไว้ตามระยะเวลาเก็บกักน้ำเสียแล้วเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากระบบบำบัดมาทำการวิเคราะห์ค่าบีไอดี พบว่าเชื้อผสม 1 แบบเติมอากาศให้ผลการบำบัดค่าบีไอดีได้ดีกว่าแบบไม่เติมอากาศและเชื้อผสม 2 แบบเติมอากาศ มีค่าบีไอดีลดลง 62.35, 53.22 และ 49.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อทั้งหมด พบว่าเชื้อเดี่ยว PB014 แบบไม่เติมอากาศให้ค่าการบำบัดบีไอดีได้ดีที่สุดคือ 64.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเชื้อผสม 1 แบบเติมอากาศและเชื้อผสม 1 แบบไม่เติมอากาศมีค่าการบำบัดที่ 53.22 เปอร์เซ็นต์และ 49.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 35)

ตารางที่ 35 ค่าบีโอดีของน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปสุกรแม่ไจ้ ก่อนและหลังการเติมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	ค่า BOD (mg/L)	
	น้ำทิ้งก่อนบำบัด	น้ำทิ้งหลังการบำบัด
ผลิตแบบเติมอากาศ		
รหัส PB014	750	1050
รหัส MJU026	306	330
รหัส MJU076	216	252
เชื้อผสม 1	510	192
เชื้อผสม 2	930	468
ผลิตแบบไม่เติมอากาศ		
รหัส PB014	750	270
รหัส MJU026	1260	810
รหัส MJU076	720	438
เชื้อผสม 1	372	174
เชื้อผสม 2	213	492
หมายเหตุ	เชื้อผสม 1 หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT076, MJUT122 และ PB014	
	เชื้อผสม 2 หมายถึง เชื้อผสม MJUT026, MJUT120, MJUT122, MJUT173 และ PB014	

5. ผลจากการขยายผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมายและการถ่ายทอดเทคโนโลยี

หลังจากทำการวิจัย เรื่อง การผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียเชิงพาณิชย์เสร็จสิ้น ได้ทำการจัดฝึกอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม เรื่อง การใช้เชื้อจุลินทรีย์แทนสารเคมีเพื่อบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติให้กับเกษตรกรในชุมชนแม่ไจ้และชุมชนใกล้เคียง จำนวน 2 รุ่นๆ ละ 50 คน โดยรุ่น 1 จัดขึ้นในวันที่ 7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 รุ่นที่ 2 จัดขึ้นในวันที่ 14 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 ผลจากการจัดฝึกอบรม พบว่า รุ่นที่ 1 มีผู้สนใจเข้าร่วมฝึกอบรมทั้งหมดจำนวน 48 คน รุ่นที่ 2 มีผู้สนใจเข้าร่วมฝึกอบรมทั้งหมดจำนวน 44 คน รวม 2 รุ่นมีจำนวนผู้เข้าร่วมฝึกอบรมทั้งสิ้น 92 คน โดยเนื้อหาในการจัดฝึกอบรมหลักสูตรดังกล่าวแบ่งออกเป็นภาคบรรยายและภาคปฏิบัติ ภาคบรรยายมีรายละเอียดและเนื้อหาเกี่ยวกับปัญหาและแนวทางในการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมจากขยะมูลฝอยและน้ำเสีย สำหรับภาคปฏิบัติมีรายละเอียดและเนื้อหา

เกี่ยวกับการทำปุ๋ยหมักจากขยะอินทรีย์และเศษอาหารในครัวเรือนและการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในครัวเรือน ผลจากการประเมินความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม ในรุ่นที่ 1 พบว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ มีความพึงพอใจอยู่ในระดับมาก สำหรับความเหมาะสมของเนื้อหาการฝึกอบรม การได้รับความรู้จากการฝึกอบรม การนำความรู้ที่ได้รับไปประยุกต์ใช้ได้จริงและความเหมาะสมของระยะเวลาในการจัดฝึกอบรม คิดเป็นร้อยละ 45.5, 50.0, 54.5 และ 40.9 ตามลำดับ สำหรับผลจากการประเมินความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรมในรุ่นที่ 2 พบว่าผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ มีความพึงพอใจอยู่ในระดับมากที่สุด สำหรับเนื้อหาในการบรรยาย ความเหมาะสมของระยะเวลา วิทยากรมีความรู้ในเนื้อหาที่บรรยาย วิทยากรมีความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ความเข้าใจ วิทยากรมีความสามารถในการตอบคำถามได้อย่างชัดเจน ความสามารถของวิทยากรในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วม ความเหมาะสมของเอกสารประกอบการบรรยาย และการนำความรู้ที่ได้รับไปใช้งานได้จริง คิดเป็นร้อยละ 45.8, 35.4, 56.5, 50.0, 47.9, 47.9, 47.9 และ 43.8 ตามลำดับ (ภาคผนวก ข)



สรุปผลการทดลอง (Summary)

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างแหล่งต่างๆ เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ skim milk, starch, tributyrin, CMC และ xylan ได้จำนวน 373 ไอโซเลต และได้คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบต่าง ๆ ไว้จำนวน 9 ไอโซเลต เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียและขยะในการทดลองครั้งนี้ พบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้ได้จริงในภาคสนาม เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีจากการที่มีการสร้างเอนโดสปอร์

ผลการบำบัดขยะด้วยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่าการบำบัดขยะด้วยเชื้อเดี่ยวให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อผสม เชื้อไอโซเลต MJUT076 และ MJUT 138 ทำให้เกิดการย่อยสลายสารประกอบในขยะได้เร็วกว่าชุดควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักขยะเท่ากับ 13.06 และ 12.97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย จากเชื้อเดี่ยว 9 ไอโซเลต และเชื้อผสม 3 กลุ่ม ที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในสภาวะให้อากาศจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีกว่าในสภาวะไม่ให้อากาศ โดยกรณีเชื้อเดี่ยว MJUT026 และ PB014 สามารถลดปริมาณบีโอดีได้สูงสุด 95.71 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรณีเชื้อผสมทั้ง 3 กลุ่ม ในอัตราส่วน 1:1 สามารถลดปริมาณบีโอดีได้ใกล้เคียงกันทั้งในสภาวะให้อากาศและไม่ให้อากาศ แต่ค่าบีโอดีที่ลดลงมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม

2. การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน

จากผลการเก็บตัวอย่าง พบตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถจากตัวอย่างดินและน้ำ ในบริเวณน้ำพุร้อนจำนวน 30 ไอโซเลต เป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 22 ไอโซเลต และจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน 8 ไอโซเลต และพบจำนวนจุลินทรีย์จากป่าบ้านโป่ง จำนวน 39 ไอโซเลต (SA1-SA39) จากห้วยใจ จำนวน 40 ไอโซเลต (PW1-PW40) และแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว สามารถแยกเชื้อได้ 45 ไอโซเลต (KS1 – KS45) โดยวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน ด้วย Dilution techniques (McCourt, 1988) จากนั้น นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์

จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ มาทดสอบการย้อมสีแบบแกรมด้วยเทคนิค Gram's staining (McCourt, 1988) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย SA1-SA39 ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 35 ชนิดและแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด มีรูปร่างท่อน 20 ชนิดและรูปร่างกลม 19 ชนิด และ พบว่า Pw1 ติดสีแดงของ safranin มีรูปร่างแบบท่อน Pw13 ติดสีม่วงของ crystal violet มีรูปร่างท่อน ส่วน Pw27 และเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออีก 37 ชนิด ติดสีแดงของ safranin มีรูปร่างกลม ในขณะที่ KS1 – KS45 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกติดสีม่วง(crystal violet) รูปร่างท่อน 4 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง(safranin) รูปร่างกลม 4 ชนิด และรูปร่างท่อน 37 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง(safranin) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huy *et al.* (2007) มีการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันปิโตรเลียมจากดิน พบว่า สายพันธุ์ DW2-1 ที่นำมาจำแนกการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและทางชีวเคมีพบว่า มีรูปร่างท่อน และอยู่ในแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ ศุภยางค์ (2547) จุดประสงค์ของการย้อมสีเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียติดสีซึ่งทำให้เห็นได้ง่ายในการศึกษารูปร่าง (shape) ขนาด (size) การเรียงตัวของเซลล์ (cell arrangement) และโครงสร้างต่างๆของเซลล์

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำมันได้โดยวิธี Partition gravimetric method และ วิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันในกลุ่ม ไฮโดรคาร์บอนด้วยกระบวนการทางชีวเคมี คือ การทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส ในเบื้องต้นพบจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายน้ำมัน จำนวน 7 ไอโซเลต

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต ของ SA11/4, SA6/3 จากแหล่งดินธรรมชาติ และ Pw3/2, Pw27/1 จากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีค่าดังนี้ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 8.5 - 9.5, อุณหภูมิ 37 - 40°C, ความเร็วรอบของการให้อากาศ 150 rpm, และ% NaCl 0.5 ถึง 2.0% ตามลำดับ พบว่าเชื้อทั้งหมดคือ *Acinetobacter* sp.

จากการเปรียบเทียบ % การย่อยน้ำมัน จะเห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนมี % การย่อยน้ำมัน มากกว่าแบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งน้ำและแหล่งดินธรรมชาติ แต่ในการทดสอบการย่อยน้ำมันโดยวิธีการหาคิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี Colorimetric แบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งน้ำและแหล่งดินธรรมชาติมีค่ามากกว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพเริ่มต้นของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยแบคทีเรียจากแหล่งดินที่ปนเปื้อน และประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มาจากแหล่งธรรมชาติในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยระดับโมเลกุลต่อไป ดังข้อมูลตารางที่ 36

ตาราง 36 สรุปคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ปัจจัยต่างๆ

ไอโซเลต	สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย				% การย่อยน้ำมัน	การทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรีย	
	ค่ากรด – ต่าง	อุณหภูมิ (°C)	ความเร็วรอบ	% NaCl		ไตเตรท (U/ml.)	Colorimetric method (U/ml.)
KS21 <i>Bacillus thuringiensis</i>	8.5	37 - 40	200	2.0 %	95.45	4.17	0.48
KS30 <i>Bacillus thuringiensis</i>	8.5	37 - 40	150	0.5 %	95.45	5.67	0.53
KS37 <i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	8.5	37	150	1.0 %	77.27	6.67	1.01
Pw3/2 <i>Acinetobacter</i> sp.	9.5	37	150	2.0 %	-	3.21	1.31
Pw27/1 <i>Acinetobacter</i> sp.	9.5	37 - 40	150	0.5 %	-	3.60	1.47
SA 11/4 <i>Acinetobacter</i> sp.	8.5	37	150	0.5 %	80.75	3.29	0.72
SA 6/3 <i>Acinetobacter</i> sp.	8.5	37	150	2.0 %	51.42	2.66	1.30

3. การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ในงานทางสิ่งแวดล้อม เพื่อให้มีการเก็บข้อมูลของจุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างเป็นระบบและง่ายต่อการใช้งาน รวมทั้งสามารถเผยแพร่ต่อบุคคลทั่วไปให้เข้าถึงข้อมูลดังกล่าวได้ โดยการเชื่อมต่อฐานข้อมูลจุลินทรีย์ไว้ทางระบบเครือข่ายทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยในงานวิจัยนี้ได้มีการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารต่าง ๆ ทางสิ่งแวดล้อม คือ สามารถย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย รวบรวมได้ทั้งสิ้น 120 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน รวบรวมได้ทั้งสิ้น 110 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ 3 รูปแบบด้วยกัน คือ การเก็บบนอาหารวุ้นผิวหน้าเอียง การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80°C และการเก็บรักษาโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)

ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และน้ำมัน เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยวิธี 16S rDNA sequencing รวมทั้งสิ้น 92 ไอโซเลท พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายขยะและน้ำเสียส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียคล้ายราในกลุ่มของแอคติโนมัยซีต *Streptomyces* มีความสามารถในการย่อยสลายสารในน้ำเสียอีกด้วย ส่วนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันนั้น พบว่าส่วนใหญ่สามารถจำแนกได้เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* และ *Bacillus*

4. การผลิตเชื้อจุลินทรีย์สำหรับย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียเชิงพาณิชย์

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรมแบบเดิมอากาศและไม่เติมอากาศ พบว่าจุลินทรีย์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาจนมีระดับสูงสุด หลังจากนั้น จุลินทรีย์จะมีจำนวนลดลงแต่ยังคงมีจำนวนอยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่ผลิตแบบไม่เติมอากาศจะมีจำนวนเซลล์มากกว่าการผลิตแบบเติมอากาศ

การศึกษานำเชื้อเดี่ยว MJUT076, MJUT138 และเชื้อผสม ที่มีประสิทธิภาพดีในการบำบัดขยะในระดับห้องปฏิบัติการมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้วนำไปทดสอบบำบัดขยะพบว่าการใช้เชื้อเดี่ยว MJUT076 (300 มิลลิลิตร) จะให้ผลในการบำบัดขยะได้ดีที่สุด และการใช้เชื้อจุลินทรีย์แบบแห้งหรือในรูปปุ๋ยหมักจะสามารถบำบัดขยะได้เร็วกว่าการใช้จุลินทรีย์ในรูปของเหลวราดโดยตรง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียโดยจุลินทรีย์ในระดับการปฏิบัติจริงกับระบบบำบัดน้ำเสียของสถานประกอบการ 2 แห่ง โดยเติมปริมาณหัวเชื้อที่ผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำเสียในบ่อ พบว่า การใช้เชื้อเดี่ยวจะมี

ประสิทธิภาพในการบำบัดได้ดีกว่าการใช้เชื้อผสม และเชื้อเดี่ยว PB014 ที่ผลิตแบบไม่เติมอากาศจะสามารถลดปริมาณบีโอดีได้สูงสุดเท่ากับ 65.21 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อผสมทั้งแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศสามารถลดปริมาณบีโอดีได้แต่มีค่าต่ำกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว



เอกสารอ้างอิง

- กรรมนิภา วิจิตรโพนุลย์สุข. 2541. **การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กำจร แซ่เจียง. 2541. การใช้เอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมในการตกแต่งผ้าใยเซลลูโลส. **อุตสาหกรรมเกษตร**. 9: 54-64.
- เกรียงไกร พัทธการ. 2545. **การใช้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการบำบัดน้ำเสียจากครัวเรือนที่ปนเปื้อนไขมัน**. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กัลยา ประไพพน. 2544. **การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดอกไม้**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.geocities.com/yayajang/background.htm> (18 พฤศจิกายน 2551)
- โครงการเพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับสารเคมีและสิ่งแวดล้อมสำหรับเยาวชน. 2552. **น้ำมันเครื่อง**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.chemtrack.org/EnvForKids/chem-24.htm> (23 มีนาคม 2552)
- งามชื่น คงเสรี. 2537. **ศักยภาพพันธุ์ข้าวไทยสู่การแปรรูป**, น. 8-15. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. ศักยภาพข้าวไทยทิศทางใหม่สู่อุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- จิรศักดิ์ หงส์เลิศพิภพ. 2537. **การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของแบคทีเรียที่เลือก 5 ชนิดที่สภาพปัจจัยต่าง ๆ**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ชลธิชา อุไรโรจน์. 2542. **การศึกษาเบื้องต้นถึงแหล่งคาร์บอนบางชนิดที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ *Bacillus subtilis* 5H**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ชลิต โนระดี. 2535. **ผลของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อซีเมนต์ที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีพื้นเป็นดินเหนียว**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชัยวิจิต ชูบ้านเก็ก และ วัชรพล พลเมือง. 2549. **ออกแบบและสร้างถังหมักก๊าซชีวภาพจากเศษ**

อาหารสำหรับครัวเรือน. โครงการหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชา วิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ณัฏฐภัทร จินดา และ ทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. 2549. **เอนไซม์ไลเปส : การผลิต และคุณสมบัติ**

ทางเคมีกายภาพ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://utcc2.utcc.ac.th/www/divisions/academicaffairs/journals/26th/May_Aug/theme7th.htm
(18 พฤศจิกายน 2550)

ดวงพร คันทโชติ. 2530. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์.** กรุงเทพฯ:

สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ทะนงพันธ์ สัจจะปาละ และ ขจรศักดิ์ จัยวัฒน์. 2531. **แบคทีเรียเฮเทอโรโทรปจากป่าชายเลน.**

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธงชัย คัมภีร์, น้อย เกษมสุขสกุล และ พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์. 2532. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลส เพื่อเป็นตัวเร่งในการทำปุ๋ยหมัก. **วารสารดินและปุ๋ย.** 11: 111-118.

ธีระ เกรอต. 2539. **วิศวกรรมน้ำเสีย: การบำบัดทางชีวภาพ.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

ธารารัตน์ ชื่อดอพอ. 2551. **เอกสารประกอบการเรียนจุลชีววิทยาทางอาหาร ทอ 310.** ภาควิชา เทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นลิน วงศ์ขัตติยะ และ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง. 2549. **คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 5.

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 76 น.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. **จุลชีววิทยาทั่วไป. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.** 558-560.

นฤมล ยอดวงศ์. 2547. **การคัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วจากดินที่**

มีการปนเปื้อนน้ำมัน. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นภา ศิวรังสรรค์ อุษาส แสงวัฒนาโรจน์ หรรษา ปุณณะพยัคฆ์. 2544. **การใช้เอนไซม์ใน**

กระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นวลจันทร์ พารักษา. 2534. การใช้เอนไซม์ในสุกรรุ่น-ขุน. **สุกรสารสน.** 17: 17-20.

นิตยา พัฒนรัชต์. 2539. **เอนไซม์จากการกลั่นไวน์เพื่อใช้ในการทำความสะอาดสิ่งแวดล้อม. วารสาร เทคโนโลยี.** 17: 8-11.

น้อย เกษมสุขสกุล. 2530. **การผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูงบนวัสดุที่เป็น ของแข็ง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2532. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. โอเดียนสไตร. 173-181.

ประพันธ์ ปิ่นศิริโรดม. 2534. การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร. **อาหาร**. 21: 245-252.

ปราณี อานเปื้อง. 2535. **เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี อานเปื้อง. 2534. **เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 2**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะพรรณ สัมยก. 2550. **การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ผลิต**

เอนไซม์ไลเปสและย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ไพจิตร กระจ่างเงิน. 2547. **การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อนที่สามารถย่อย**

สลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

พรเทพ ถนอมแก้ว. 2537. **ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลล์จากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณ**

ปลูกป่าศรนารายณ์ *Agave sisalana* Perrine. รวมบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2537

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรทิพพา อังคนุรักษ์พันธุ์. 2539. **การทำไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ TLS 63 ให้บริสุทธิ์ และ**

การหาลักษณะเฉพาะ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เพิ่มศักดิ์ กาญจนบุตร. 2550. **สารประกอบไฮโดรคาร์บอน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา

http://www.e-learning.sg.or.th/ac2_5/content1.3.html (12 ธันวาคม 2551)

ภักดิ์ทิรา มาตยานุญ. 2548. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียต่อการบำบัด**

น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ภัทรา ศรีสุทธีวรกุล. **การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันดิบในถังหมัก**. สถาบันส่งเสริมการสอน

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.).

มณฑิรา นพรัตน์ อนันต์ ทองทา จินดาร์ตน์ พิมพ์สมาน อาลักษณ์ ทิพย์รัตน์. **การหมักแบบอาหาร**

แข็ง (Solid State Fermentation). [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา

<http://www.clinictech.most.go.th>. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

- มยุรี แก้วพิจิตร. 2548. การเปรียบเทียบเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงโดยใช้ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.bsru.ac.th/~sci/dept/biot/rubrong.doc> (25 พฤศจิกายน 2551)
- มหิดลวิทยานุสรณ์. 2550. สารประกอบไฮโดรคาร์บอน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.mwit.ac.th/~supawade/link/CH40124_2.2549/text/HC.t.do (25 พฤศจิกายน 2551)
- มันสิน ตันจุลเวศน์. 2543. คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มันสิน ตันจุลเวศน์ และ ไพพรรณ พรประภา. 2536. การจัดการคุณภาพน้ำและบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มาลินี อัครดิษฐเลิศ. การหมัก...เทคโนโลยีแห่งการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์. [ระบบออนไลน์] หน่วยบริหารจัดการความรู้ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.
- ยุพกนิษฐ์ พวงวีระกุล. ไม่ทราบปีที่วิจัย. การผลิตแอลกอฮอล์แบบเร็วจากกากน้ำตาล. คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต.
- รัฐพร จันทรเดช. 2541. การแยกและเตรียมดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- รัฐพล พรประสิทธิ์. 2542. การแยกแบคทีเรียทนร้อนจากดินที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เรืองลักษณ์ จามิกรณ์. 2539. ชีวเคมีเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- วินัย แสงแก้ว. 2551. บทที่ 4 คุณสมบัติทางกายภาพของดิน (Soil Physic Properties) [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://krudaeng.wikispaces.com/%E0%B8%9A%E0%B8%97%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%88+4+%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B8%A0%E0%B8%B2%E0%B8%9E%E0%B8%82%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%94%E0%B8%B4%E0%B8%99?f=print> (25 มีนาคม 2552)
- วิไลวรรณ โชติเกียรติ และ อมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2533. การสู่มหาเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลส. วารสารสงขลานครินทร์. 12: 203-211.
- วีระพงศ์ ลุติตานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2552. พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain

- reaction.[ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Basic_PCR_June_08.pdf (23 มีนาคม 2552)
- วรวิมล จุฬาลักษณ์นกุล. 2550. **จุลินทรีย์ในดิน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rspg.org/microbiology/micro_01.htm(3 ธันวาคม 2551)
- ศรีสุดา ธรรมวิฑูกร. 2552. **เทคนิค PCR-DGGE การวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม โดยใช้ 16S rRNA gene**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.thaiscience.com>
- ศานิต แก้วเย็น. 2540. **เศรษฐกิจการผลิตและการตลาดมันสำปะหลัง**, น. 1-7. ใน โครงการเผยแพร่และขยายผลงานวิจัยเพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคม ครั้งที่ 1. นิทรรศการมันสำปะหลังและการแปรรูปผลิตภัณฑ์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมบุญ ธนาสุวัฒน์. 2539. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลง-กรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมศักดิ์ วังโน. 2528. **จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- สุดธิดา เกรียงเกษม. 2545. **การทำปุ๋ยหมักแบบไม่ใช้อากาศของขยะในถังหมักแบบกะ**. นครราชสีมา : วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล. 2535. **คุณภาพกากน้ำตาลที่ผลิตได้ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2534-2535**. กรุงเทพฯ: กระทรวงอุตสาหกรรม.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล. 2536. **คุณภาพกากน้ำตาลที่ผลิตได้ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2535-2536**. กรุงเทพฯ: กระทรวงอุตสาหกรรม.
- อติภัทร ยาศิริ สมพงษ์ ดุลยจินดาชาบพร วิชัย ลีลาวัชรมาศ และ เสาวนิต ทองพิมพ์. 2547. **การผลิตเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก: แลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยใช้ถั่วงอก**. รายงานโครงการวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อนันต์ ท้าวเพชร และ สุรพัฒน์ เลาหวนิช. ไม่ทราบปีที่แต่ง. **ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Brucella abortus* strain 1119-3 แบบกึ่งต่อเนื่อง**. สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา.

- อุดมลักษณ์ ธิติรักษพานิชย์. 2534. การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อัจฉรา ตันติโชค อิศเรศ เทียนทัด เพ็ญลักษณ์ ชูดี อุทัย เกตุนุติ. 2546. โรงงานต้นแบบผลิตเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่.
- อัญชลี สะอาดเอี่ยม. 2550. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งดินธรรมชาติที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้น้ำมันแล้ว. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- อรรถวุฒิ อิมพุลทรัพย์. 2541. การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 45 น.
- อำพล มั่นเสกวิทย์. 2546. การศึกษาการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Aleksieva, Z., D. Ivanova., T. Godjevargova and B. Atanasor. 2002. *process Biochem* 37: 1215-9.
- Alexander, M. (1961). *Introduction to soil microbiology*, p 27. New York: Wiley and Sons Inc.
- Akidumila, F. and B.A. Glatz. 1998. Growth and production of *Apiotrichum curvatum* in tomato juice. *J. Food Protect.* 61: 1515-1517.
- Antai S.P., 1990. Biodegradation of Bonny light crude oil by *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. *Waste management*. 10:61-64.
- Antai, S.P. 2003. Biodegradation of bonny light crude oil by *Bacillus* sp. and *Speudomonas* sp. *Microbiol.* 37 : 352-366.
- APHA, AWWA, WEF (1998) "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" 20th Edition, American Pubilc Health Assoc., Wash. D.C, USA
- Bednarski, W., J.K. Piontas, Z. Zegarska and M. Adamezak. 1993. Growth of three fungi on poultry fat or beef tallow. *World K. Microbiol. Biotechnol.* 9: 656-659.
- Bellamy, W.D. 1977. Cellulose and lignocellulose digestion by thermophilie actinomycetes for SPC production. *Dev. Microbiol.* 18: 249-254.
- Benjamin, S. and A. Pandey. 1998. *Candida rugosa* and Its lipase-a retrospect. *J. Sci. Ind. Res.* 57:1-9.

- Bento, F.M., F.A. de O. Camargo, B.C. Okeke and W.T. Frankenberger Jr. 2004. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research** 160:249—255.
- Bernfeld, P. 1951. **Enzymes of starch degradation and synthesis in the enzyme**. Boston: Interscience Publishers, Inc.
- Bhat, K.M. and R. Maheshwari. 1987. *Sporotrichum thermophile* Growth, cellulose degradation, and cellulose activity. **Appl. Environ. Microbiol.** 53 (9): 2175-2182.
- Boze, H., G. Moulin and P. Galzy. 1995. **Production of microbial biomass**, pp. 170-220. In H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler and P. Stadler (eds.). **Biotechnology: Enzyme, Biomass, Food and Feed**. 2nd ed. Germany: VCH. Verlagsgesellschaft.
- Brown, D.W., Ramos, L.S., Fieldman, A.J. and Macleod, W.D. 1969. The formation and Stability of emulsion of water in crude petroleum and similar stocks, p. 35-39. In P. Hepplesea Scientific aspects of pollution of sea by oil, **Institute of Petroleum**. London.
- Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons (Eds.); 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8th ed. Williams and Wilkins Baltimore, MD, pp. 1–1246
- Castro-Ocha L.D., C. Rodriguez-Gomez., G. Valerio-Alfaro and R.O. ROS. 2005. Screening purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus Thermoleovorans* CCR11. **Enzyme Microbiology** 37: 648-654.
- Chen L., T. Coolbear and R.M. Daniel. 2004. Characteristics of proteases and lipase produced by seven *Bacillus spp.* isolated from milk powder production lines. **Dairy** 14: 495-504.
- Chigusa, K., T. Hasegawa, N. Yamamoto and Y. Watanabe. 1996. Treatment of wastewater from oil manufacturing and plant by yeasts. **Wat. Sci. Technol.** 34: 51-58.
- Chin, K.K., S.L. Ong, L.H. Poh and H.L. Kway. 1996. Wastewater treatment with bacterial augmentation. **Wat. Sci. Technol.** 33: 17-22.
- Daniel, I.C.W., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humphrey and M.D. Lilly. 1979. **Aeration and agitation**, pp. 157-193. In C.G. Heden (ed.). **Fermentation and Enzyme Technology**. New York: John Wiley & Sons.
- D'Annibale A., G. Sermanni., F. Federici and M. Petruccioli. 2006. Olive – mill wastewaters a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource technology** 97:

1828 -1833.

- Davies, J.A. and Hughes, D.E. 1968. The biochemistry and microbiology of crude oil degradation, p.139-144. In J.D. Carthy and D.E. Arthur (eds.), **The biological effect of oil pollution on littoral communities** (supplement of Field Stud., vol.2.). E.W. Classey, Ltd., Hampton, Middlesex, England.
- Del Rio, J.L., P. Serra, F. Velero, M. Poch and C. Sola. 1990. Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. **Biotechnol. Lett.** 12(11): 835-838.
- De Renzo, D.J. Solvent Safety Handbook, Noyes Publications, **Park Ridge, NJ**, 1986. Dyer, J.C., A.S. Vernick, and H.D. Feiler, Handbook of Industrial Wastes. 145
- Diaz M.P., K.G. Boyd., S.J. Grigson and J.G. Burgess. 2000. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacteria consortium MP- M immobilized onto polypropylene fibers. **Biotechnology** 79:45-53.
- Drauz, K. and H. Waldmann. 1995. **Enzyme catalysis in organic synthesis Volume II**. Germany: VCH.
- Enokibara, S., N. Mori and Y. Kitamoto. 1991. Purification and some properties of a carboxymethylcellulase from *Favolus arcularius*. **J. Ferment. Bioeng.** 73: 230-233.
- Ertugrul, S., G. Donmez and S. Takac. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its. **Enzyme activity** 149: 720-724.
- Fadil K., A. A. Chahlaoui, A. A. Ouahbi, A. Zaid and R. Boria. 2003. Aerobic biodegradation and detoxification of wastewater from the olive oil industry. **Biodeterior Biodegrad** 51:37-41.
- Farinazleen Mohamad Ghazali, Raja Noor Zaliha Abdul Rahman, Abu Bakar Salleh and Mahiran Basri. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **Int. Biodeter. Biodegrad.** 54 : 61-67.
- Flint, J.F., Angert, E.R. 2005. Development of a strain-specific assay for detection of viable *Lactobacillus* sp. HOFG1 after application to cattle feed. **J. Microbiol. Methods.** 61: 235-243.
- Frédéric Chaillan, Anne Le Flèche, Edith Bury, Y-hui Phantavong, Patrick Grimont, Alain Saliot, and Jean Oudot. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical

- aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**. 155: 587–595
- Ghanem E.M., H.A.Al – Sayed and K.M.Saleh. 2000. An alkalophilic thermostable lipase Produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. **World Journal Microbiology Biotechnol** 16:459-464.
- Grbic-Galic, D. and Vogel, T.M. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. **Appl. Environ. Microbiol.** 53: 254-260.
- Grega, M.D. La, P.L. Buckingham and J.C. Evans. 1994. **Hazardous waste management**. New York: McGraw Hill Inc.
- Grishchenkov V.G., Townsend R.T., McDonald T.J. , Autenrieth R.L., Bonner J.S. and Boronin A.M. 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. **Process Biochemistry**. 35 : 889–896
- Gupta S., Yogesh, S.Javiya, M. Bhambi, C.S. Pundir, K.Sigh and A.Bhattachaya. 2008. Comparative study of performances of lipase immobilized asymmetric polysulfone and polyether sulfone membranes in olive oil hydrolysis. **International of Biological Macromolecules** 42:145-151.
- Hao Ruixia., Lu Anhuai. and Zeng Yishan., 2004. **Effect on crude oil by thermophilic bacterium**, Journal of Petroleum Science and Engineering. 43 : 247 – 258.
- Harayama s., Kok M., and E.L.Neidle. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. **Annu. Rrv. Microbiol.** 46:565-601.
- Hashimoto, S., T. Muramatsu and M. Funatsu. 1971. Studies on xylanase from *Trichoderma viride*. Part I. Isolation and some properties of crytalline xylanase. **Agr. Biol. Chem.** 35: 501-508.
- Hibernation nodate. 2009. **[online]** http://www.brookscole.com/chemistry_d/templates/student_resources/0030244269_campbell/HotTopics/Hibernation.html (10 มีนาคม 2552).
- Hitoshi Itoa, Reia Hosokawab, Masaaki Morikawaa and Hidetoshi Okuyama. 2008. A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics. **International Biodeterioration & Biodegradation** 61. 223–232

- Holme, D.J and Peck, H.1993. Separation Method, in : **Analytical Biochemistry**, 2 nd ed., Longman Scientific & Technical, England, pp. 141.
- Hollaway,S.L., Fax, G.M. and Sizemore, R.K.1980. The bacterial community composition of an active oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. **Pollut. Bull.**11:153-156.
- Horikoshi, H., M. Nakao, Y. Kurono. 1984. Cellulases of an alkalophilic *Bacillus* strain isolate from soil. **Can. J. Microbiol.** 30: 774-779.
- Ingle, M.B. and Erickson. 1978. Bacterial amylase. **Adv. Appl. Microbiol.** 24: 257-278.
- Iwai, M. and Y. Tsujisaka. 1974. Interconversion of two lipase from *Rhizopus delemar*. **Arg. Biol. chem.** 38 (6): 1249-1254.
- Jeganathan J., A. Bassi, G. Nakhla.2006. Pre-treatment of high oil and greasepet industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation.**J.Hazard.Mater.** 137:121-128. 49.
- Jensen, R. G. 1983. Detection and determination of lipase (acyl glycerolhydrolase) activity from various sources. **Libs.** 18 (9): 650-657.
- Kawaminami, T. and H. Iizuka. 1969. Studies on xylanase from microorganisms. Part III. Production of xylanase by *Streptomyces xylophagus* nov. sp. **Agr. Biol. Chem.** 33: 1787-1789.
- Keay, L. and N. Cirulis.1971. Preparation and purification of microbial proteases with special reference to the bacilli. **Prep. Biochem.** 1 (3): 177-96.
- Kim H.K., H.J.Choi, M.H.kim, C.B.sohn and T.K.Oh.2000 .Expression and characterization ²⁺Ca independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. **Biochim Biophys** 1583:205-212.
- Kirsop,B.E. and J.J.S Snell. 1984. **Maintenance of Microorganisms : A Manual of Laboratory Method.** Academic press, INC, London.
- Kitpaisarn, P. 1984. Cellulase production of fungi. Abstracts Master Thesis and Independent Study The Graduate School, Chiang Mai University Academic Year 1984. Chiang Mai. 5: 73.
- Kojima, Y., Y. Masaaki and M. Tamio, 1994. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58(9): 1564-1568.

- Kokusho, Y., H. Machida and S. Iwasaki. 1982. Study on alkaline lipase: isolation and identification of lipase producing microorganisms. **Agr. Biol. Chem.** 46 (5):1159-1164.
- Kristiina, V. and E.E. Staffeldt. 1976. Oxygen consumption, carbondioxide evolution and assimilation during microbial metabolism of starch, cellulose and xylan, pp. 270-382. *In*: J.M. Sharpley (ed.). **Proceeding of the Third International Biodegradation Symposium**. London: Applied Science Publisher.
- Lanciotti R., A.Gianotti, D.Baldi, R. Angrisani, G.Sozzi, D. mastrocala and M.E.Guerzoni. 2005. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. **Bioresour Technology** 96:317-322.
- Lewis, D. L., R. E. Hodson, and L. F. Freeman III. 1984. Effects of microbial community interactions on transformation rates of xenobiotic chemicals. **Appl. Environ. Microbiol.** 48: 561-565.
- Lewis, D. L., H. P. Kollig and R. E. Hodson. 1986. Nutrient limitation and adaptation of microbial populations to chemical transformations. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 589-603.
- Li, X. and P. Gao. 1996. Isolation and partial characterization of cellulose-degading strain of *Streptomyces* sp. LX. from soil. **Lett. Appl. Microbiol.** 22: 209-213.
- Lindsay D., V.S.Brozel, J.F.mostert and A.Von Holy. 2000.physiology of dairyassociated *Bacillus spp.* over a wide pH range. **Food microbiology** 54:49-62.
- Low, E. W. and H. A. Chase. 1999. The effect of maintenance energy requirements on Biomass production during wastewater treatment. **Wat. Res.** 33(3) : 847-853.
- Macrae, A.R. 1983. Lipase catalyzed interesterification of oils and fats. **J. Amer. Oil Chem. Soc.** 60 (2): 3A-246A.
- Mahmoud, M.B. and Alexander, S. 2000. Microbial Degradation of the Mutiply Branched Alkane 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosane(Squalane) by *Mycrobacterium fortuitum* and *Mycrobacterium ratisbonense*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 : 4462-4467.
- McCourt, R.M. 1988. Laboratory Manual to Accompany. **Biology Random House., Inc USA.** P 167.

- Mizube F., K. Takahashi and T. Ando. 1973. The structure and function of acid proteases. Specific inactivation of an acid protease from *Rhizopus chinensis* by diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester. **J. Biochem.** (Tokyo). 73 (1): 61-68.
- Moat, A.G. and J.W. Foster. 1995. **Microbial physiology**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American** April 56-65
- Murakami, Y., and Alexander, M. 1989. Destruction and formation of toxins by one bacteria species affect biodegradation by a second species. **Biotechnol. Bioeng.** 33: 832-838.
- Nadarajah N. and O.P.Award0. 2002. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. **Process biochem** 37:35-41.
- Niamsup, P., Sujaya, I.N., Tanaka, M., Sone, T., Hanada, S., Kamagata, Y., Lumyong, S., Assavanig, A., Asano, K., Tomita, F. and Yokota, A. 2003. *Lactobacillus thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 263-268.
- Omar, I. C., N. Nishio and S. Nagai. 1987. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola langinosa* No. 3. **Arg. Biol. Chem.** 51 (1) : 37-45.
- Ota, Y., K. Gomi, S. Kato, T. Sukiura and Y. Minoda. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. **Agr. Biol. Chem.** 46 (12):2885-2893.
- Pedro J., J. Alvarez and M.V.Timothy. 1991. Substrate interactions of benzene, toluene and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 (10): 2981-2985.
- Perekh, M., J. Formanek and H.D. Blascheck. 1999. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 51: 152-157.
- Perry, J.J. 1979. Microbial cooxidations involving hydrocarbons. **Microbiol. Rev.** 43: 59-72.
- Prasertsan, P. A.H.-Kittikul and B. Chitmanee. 1992. Isolation and selection of cellulolytic Fungi from palm oil mill effluent. **J. Microbiol. Biotechnol.** 8: 534-535.

- Rahman K.S.M. , Thahira-Rahman J. and Banat I.M., 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**. 85:257–261.
- Robert, D., W. Hooper, M. Greenwood. 1995. **Practical food microbiology**. Public Health Laboratory Service, London.
- Rosenberg E., and E.Z. Ron. 1997. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. **Curr.Opin. Biotechnol** 8: 313–316.
- PTT. 2008. **MATERIAL SAFETY DATA SHEET**. [online] http://pttweb2.pttplc.com/webclub/Files/Lube/attach/139_MTRDS.pdf (25 March 2009)
- Saisuburamaniyan N., L. Krithika, K.P. Dileena, S. Sivasubramanian, and R. Puvanakrishnan. 2004. Lipase assay in soils by copper soap colorimetry. **Analytical Biochemistry** [online] 330 (2004) 70–73.
- Savaporn Supaphol, Supamard Panichsakpatana, Savitr Trakulnaleamsai, Nipon Tungkananuruk, Pinnapar Roughjanajirapa, Anthony Gerard O'Donnell. 2006. The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils. **Journal of Microbiological Methods**. 65:432–441.
- Schaefer, M , F. Juliane. 2006. The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. **Applied Soil Ecology** 36 : 53 – 62.
- S. Khodijah Chaeruna,, Kazue Tazakib, Ryuji Asadab, Kazuhiro Kogure. 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. **Environment International**. 30:911 – 922.
- Shabtai, Y. and N. Daya-Mishne. 1992. Production, purification, and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. **Appl. Environ. Microbial**. 58: 174-180.
- Solomon, G.L. 1969. **Materials and methods in fermentation**. London: Academic Press Inc.
- Sorkhoh, N.A., A.S. Ibrahim, M.A. Ghannou, and S.S. Radwan. 1993. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert. **Appl. Microbiol. Biotech**. 39:123-126.

- Sow, N.M., Dobois-Dauphin, R., Roblain, D., Guiro, A.T. and Thonart, Ph. 2005. Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. **Afr. J. Biotechnol.** 4: 409-421.
- Stanbury, P. F. and Whitaker, A. 1984. **Principle of fermentation technology**. Oxford : New York. Pergamon Press.
- Stanbury, P.F., A. Whitaker and S.J. Hall. 1995. **Principles of fermentation technology**. 2nd ed., New York: Elsevier Science Ltd. Progamon.
- Steffensen, W.S. and M. Alexander. 1995. Role of competition for inorganic nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates. **Appl. Environ. Microbiol.** 61 (8): 2859-62.
- Sugihara, A., T. Tani and Y. Tominaga. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp.. **J. Biochem.** 109(2): 211-216.
- Suparna Mukherji, Sheeja Jagadevan, Gita Mohapatra, Avinash Vijay. 2004. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field. **Bioresource Technology** 95: 281–286.
- Swindoll, C. M., C. M. Aelion and F.K. Pfaender. 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 54 (1): 212-7.
- Takamatsu, S. 1998. PCR Applications in Fungal Phylogeny. Pp.125-152. In: **Applications of PCR in Mycology**. CAB International, New York.
- Tano-Debrah K., Fukuyama S., Otonari N., Taniguchi F., Ogura M., 2000. An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils, **Japan Aquatec Co. Ltd**, 339-41 Kojima, Kosaza-cho, Kitamatsuura-gun, Nagasaki-ken 857-0401, Japan.
- Tomus, J. 1989. **An assessment of the use of rice bran as a fish feed in four areas of Udonthani province in the Northeast Thailand**. M.S. Thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand.
- Tomohisa, K. and Misuru H. 2001. Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* for deep subterranean petroleum reservoirs. **Appl. Environ. Microbiol.**

- Ward, D.R. and Brock, T.D. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. **Appl. Environ. Microbiol.** 35:353-359.
- Wiggins, B. A. and M. Alexander. 1988. Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 2803-2807.
- Windish W.W., N. S. Mhatre. 1965. Microbial amylases. **Adv. Appl. Microbiol.** 7: 273-304.
- Yamaguchi, T., N. Muroya, M. Isobe and M. Sukiora. 1973. Production and properties of lipase from a newly isolated *Chomobacterium*. **Agr. Biol. Chem.** 37 (5): 999-1005.
- Yamamoto, T. 1988. **Bacterial alpha amylase (liquefying and saccharifying types)**. In: Handbook of amylases and related enzymes, their sources, isolation methods, properties and application. The Amylase Research Society of Japan, ed. England: Pergamon press.
- Yang Y., Z Wang. 2002. Oilfield produced water treatment with surface modified fiber ball Media filtration. **Science Technology** 46:165-170.
- Yeung, P.S.M., Sanders, M.E., Kitts, C.L., Cano, R. and Tong, P.S. 2002. Species-Specific identification of commercial probiotic strains. **J. Dairy Sci.** 85: 1039-1051.
- Yoshiki Matsumiya, Daisuke Wakita, Akishige Kimura, Sirilak Sanpa, and Motoki Kubo. 2007. Isolation and Characterization of a Lipid-Degrading Bacterium and Its Application to Lipid-Containing Wastewater Treatment. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** Vol. 103, No. 4, 325-330.
- Zaidi, B. A., Y. Murakami and M. Alexander. 1988. Factors limiting success of inoculation to enhance biodegradation of low concentrations of organic chemicals. **Environ. Sci. Technol.** 22: 1419-1425.

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งนุเทรียนต์ (Nutrient agar)

ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 7.0 ± 0.2		

ชั่งอาหารแข็งนุเทรียนต์ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวนุเทรียนต์ (Nutrient broth)

ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 7.0 ± 0.2		

ชั่งอาหารเหลวนุเทรียนต์ 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลาย ถ่ายใส่หลอดทดลองหรือขวดรูปชมพู่ (flask) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งแลกโตบาซิลลัส เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacillus MRS agar)

เปปโตนจากเคซีน (Peptone from Casein)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.0	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	8.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
ทวิน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 5.7 ± 0.2		

ชั่งอาหารแข็งแลกโตบาซิลลัส เอ็ม อาร์ เอส 66.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.7 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

4. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวแลกโตบาซิลลัส เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacillus MRS broth)

เปปโตนจากเคซีน (Peptone from Casein)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.0	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	8.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
ทวิน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 5.7 ± 0.2		

ชั่งอาหารเหลวแลกโตบาซิลลัส เอ็ม อาร์ เอส 66.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.7 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ต้มจนละลาย ถ่ายใส่หลอดทดลองหรือขวดรูปชมพู่ (flask) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย (Tryptic soy agar)

เปปโตนจากเคซีน (Peptone from Casein)	15.0	กรัม
เปปโตนจากถั่วเหลือง (Peptone from Soymeal)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

พีเอช 7.3 ± 0.2

ชั่งอาหารแข็งทริปติก ซอย 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

6. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติก ซอย (Tryptic soy broth)

เปปโตนจากเคซีน (Peptone from Casein)	15.0	กรัม
เปปโตนจากถั่วเหลือง (Peptone from Soymeal)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

พีเอช 7.3 ± 0.2

ชั่งอาหารเหลวทริปติก ซอย 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลาย ถ่ายใส่หลอดทดลองหรือขวดรูปชมพู่ (flask) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งยีสต์-มอลต์ (Yeast extract malt extract agar)

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	3.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

พีเอช 7.0 ± 0.2

ซังอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้อุ่นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อุ่นแห้งตัว

8. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์-มอลต์ (Yeast extract malt extract agar)

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 7.0 ± 0.2		

ซังอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลาย ถ่ายใส่หลอดทดลองหรือขวดรูปชมพู่ (flask) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอ่งโพเทโท เด็กซ์โตรส (Potato dextrose agar)

สารละลายมันฝรั่งชนิดผง (Infusion from potato)	6.5	กรัม
เด็กซ์โตรส (Dextrose)	20.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 5.6 ± 0.2		

ซังอาหารแอ่งโพเทโท เด็กซ์โตรส 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.6 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้อุ่นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อุ่นแห้งตัว

10. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวโพเทโท เด็กซ์โตรส (Potato dextrose broth)

สารละลายมันฝรั่งชนิดผง (Infusion from potato)	4.0	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

พีเอช 6.8 ± 0.2

ชั่งอาหารเหลวโพเทโท เด็กซ์โตรส 26.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.8 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลาย ถ่ายใส่หลอดทดลองหรือขวดรูปชมพู่ (flask) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch agar)

เปปโตเน (Peptone)	2.0	กรัม
สารละลายแป้ง (Soluble starch)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งเปปโตเน 2.0 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม วุ้น 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย ชั่งสารละลายแป้ง 10.0 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย ไม่ควรใช้น้ำร้อนในการละลายเนื่องจากแป้งอาจจะเกาะกันเป็นก้อนแข็งได้ จากนั้นเทน้ำแป้งลงไปในส่วนผสมทั้งหมดปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน จนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

12. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายโปรตีน (Skim milk agar)

เปปโตเน (Peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
นมพร่องมันเนย (Skim milk)	100.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ซังเปปโตน 5.0 กรัม ผงสกัดจากเนื้อ 3.0 กรัม และวุ้น 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย ซึ่งนมพ่องมันเนย 100.0 กรัม ใส่ในขวดเตรียมอาหารไบโใหม่ ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อละลายผงนมพ่องมันเนย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกกันที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมาวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนผสมของสารละลายนมพ่องมันเนยลงในส่วนผสมทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

13. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส (Xylan agar)

ไซแลน (Xylan)	10.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.2	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ซังอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

14. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลส (CMC agar)

คาร์บอกซี เมทิล เซลลูโลส	4.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ซังอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

15. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยสลายไขมัน (Tributyrin agar)

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
ไตรบูไทรีน (Tributyrin)	100.0	มิลลิลิตร
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งเปปโตน 5.0 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 3.0 กรัม และวุ้น 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย ปิดไตรบูไทรีน 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในส่วนผสมทั้งหมด นำไปให้ความร้อนเล็กน้อย ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว



ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ และสารเคมี

1. สารละลายไอโอดีน

ไอโอดีน	0.317	กรัม
โพแทสเซียม ไอโอไดด์	0.10	กรัม
กรดไฮโดรคลอริก 10 เปอร์เซ็นต์	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียม ไอโอไดด์ ใน 10 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2. สารละลายคองโก เรด 1 เปอร์เซ็นต์

คองโก เรด	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายคองโก เรด ในน้ำกลั่น จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง เก็บไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายเพปไตน์ 0.1 เปอร์เซ็นต์

เพปไตน์	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายเพปไตน์ในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปรับ pH เป็น 7.0 ± 2

4. การวิเคราะห์ BOD

การวิเคราะห์ BOD จะวิเคราะห์ตามวิธีของ Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 20th ed. (1998)

4.1 การเตรียมสารละลาย

4.1.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (A)

ละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8.5 กรัม โพแทสเซียมไฮโดรเจน (K_2HPO_4) 21.75 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 33.40 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.70 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

4.1.2 สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต (B)

ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.50 กรัม ในน้ำกลั่น
ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.1.3 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (C)

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 27.50 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

4.1.4 สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (D)

ละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

4.2 การเตรียมน้ำผสมเชื้อจาก

ผสมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กับสารละลาย A, B, C และ D อย่างละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เติมหากาซีให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว (ใช้เวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง)

4.3 การเชื้อจากตัวอย่างน้ำ

ทำการเชื้อจากตัวอย่างน้ำเสียด้วยน้ำผสมเชื้อจาก (ตารางภาคผนวกที่ 1) ในกระบอก
ตวงขนาด 1 ลิตร ขณะที่ผสมน้ำตัวอย่างระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ (บันทึกอัตราส่วนเชื้อจาก) ค่อยๆ
รินตัวอย่างน้ำที่ผสมดีแล้วลงในขวดบีโอดี 3 ขวด ปิดจุก นำขวดหนึ่งไปหาค่าออกซิเจนละลายในน้ำ
วันที่ 0 (DO_0) อีก 2 ขวด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปหา
ค่าออกซิเจนละลายวันที่ 5 (DO_5)

4.4 การคำนวณ

$$\text{บีโอดี (มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร)} = \frac{\text{DO}_0 - \text{DO}_5}{P}$$

กำหนดให้

DO_0 = ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำที่หาได้จากการเตรียมตัวอย่าง 15 นาที
(มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร)

DO_5 = ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำที่หาได้จากการบ่มตัวอย่าง 5 วัน
(มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร)

P = อัตราส่วนของตัวอย่างที่ใช้ต่อตัวอย่างที่เชื้อจากแล้ว

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเลือกขนาดตัวอย่างและอัตราเจือจางสำหรับช่วงปีโอดีต่าง ๆ

ปริมาณตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ช่วงปีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อัตราเจือจาง
0.02	30,000 - 105,000	15,000
0.05	12,000 - 42,000	6,000
0.10	6,000 - 21,000	3,000
0.20	3,000 - 10,500	1,500
0.50	1,200 - 4,200	600
1.0	600 - 2,100	300
2.0	300 - 1,050	150
5.0	120 - 420	60
10.0	60 - 120	30
20.0	30 - 105	15
50.0	12 - 42	6
100	6 - 21	3
300	0 - 7	1

หมายเหตุ : ถ้าปริมาณตัวอย่างที่ใช้น้อยกว่า 1.0 มิลลิลิตร ควรเจือจางตัวอย่างก่อนปิเปตใส่ขวดปีโอดี

ที่มา : มั่นสิน (2543)

4.5 วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายแอลคาไลน์-ไอโอไดด์-เฮไลต์ 2 มิลลิลิตร เติมลงในขวดปีโอดีที่ใส่ตัวอย่างน้ำแล้ว โดยให้ปลายปิเปตอยู่ใต้ผิวของน้ำตัวอย่าง ปิดจุกขวดระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน (ออกซิเจนจะทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลของ MnO_2 ถ้าตัวอย่างน้ำไม่มีออกซิเจนจะได้ตะกอนสีขาวของ $Mn(OH)_2$ แสดงว่าผลการทดลองใช้ไม่ได้ ต้องทำการเจือจางน้ำให้มากกว่าเดิม) จนได้ส่วนใสประมาณครึ่งหนึ่งของขวดปีโอดี เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อยๆ ไหลลงไปข้างๆ คอขวด ปิดจุก ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด แบ่งสารละลายที่ได้ 203 มิลลิลิตร นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไรโอซัลเฟต ทำการไทเทรตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีจากสีน้ำตาลเป็นสีเหลืองอ่อน จากนั้นเติมน้ำแบ่งลงไป 1-2

มิลลิลิตร จนเกิดสารละลายสีน้ำเงินจึงทำการไทเทรตต่อจนกระทั่งถึงจุดยุติ คือ สีน้ำเงินหายไป นำค่าปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตมาคำนวณหาออกซิเจนละลายในน้ำ

4.6 การคำนวณ

$$\text{ค่าออกซิเจนละลายน้ำ} = \frac{\text{สารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)} \times M}{0.025}$$

(มิลลิกรัมต่อลิตร)

กำหนดให้

M = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ได้จากการทดสอบ (โมลาร์)

5. การวิเคราะห์ซีโอดีด้วยวิธีฟลักซ์แบบปิด

การวิเคราะห์ BOD จะวิเคราะห์ตามวิธีของ Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 20th ed. (1998)

5.1 สารเคมี

5.1.1 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตสำหรับย่อยสลาย 0.25 นอร์มอล

ชั่งน้ำหนักโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มา 4.913 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 167 มิลลิลิตร และเติมเมอร์คิวรัสซัลเฟต ($HgSO_4$) 33.3 กรัม ทิ้งให้ละลายและปล่อยให้เย็น จึงเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

5.1.2 สารละลายกรดซัลฟิวริก

เติมซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 5.50 กรัม ลงในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 กิโลกรัม ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลาย

5.1.3 สารละลายเฟอร์โรอิน อินดิเคเตอร์

ละลาย 1, 10-ฟีแนโทลีนโมโนไฮเดรต ($1,10-C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) และเฟอร์รัสซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ในน้ำกลั่นและเจือจางจนเป็น 100 มิลลิลิตร

5.1.4 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต

นำโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ($HOOC_6H_4COOK$) มาบดแล้วอบแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส ชั่งมา 425 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นและเจือจางจนได้ปริมาตร 1 ลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต 1 กรัม มีซีโอดีเท่ากับ 1.176 กรัม ออกซิเจน และสารละลายนี้จะมีซีโอดีเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

5.1.5 สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.10 นอร์มอล

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 39.2 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอนกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตทุกครั้งที่ใช้

5.2 การหาความเข้มข้นของ FAS

เติมสารเคมีทุกชนิดตามตารางที่ ลงในหลอดแก้วขนาดที่ต้องการ โดยใช้ น้ำกลั่น แทนตัวอย่างน้ำทิ้งให้เย็นลง แล้วเติมเฟอร์โรอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลาย FAS

$$\text{นอร์มอลลิตีของสารละลาย FAS} = \frac{\text{ปริมาตรของ } 0.1 \text{ N } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \text{ (มิลลิลิตร)} \times 0.10}{\text{ปริมาตร FAS ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)}}$$

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณตัวอย่างน้ำและสารเคมีสำหรับขวดแก้วขนาดต่าง ๆ

หลอดย่อยสลาย (ขนาดของ หลอดแก้ว)	ปริมาตรน้ำ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย โพแทสเซียมไดโครเมต สำหรับย่อยสลาย (มิลลิลิตร)	สารละลาย กรดซัลฟิวริก (มิลลิลิตร)	ปริมาตรรวม (มิลลิลิตร)
16x100 มิลลิเมตร	2.5	1.5	3.5	7.5
20x150 มิลลิเมตร	5.0	3.0	7.0	15.0
25x150 มิลลิเมตร	10.0	6.0	14.0	30.0

5.3 วิธีวิเคราะห์

5.3.1 ใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่างและสารเคมีตามตารางที่ โดยเติมตัวอย่างน้ำลงในหลอดแก้ว แล้วเติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตสำหรับย่อยสลาย แล้วค่อย ๆ เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกให้เกิดขึ้นกรดอยู่ก้นหลอดแก้ว ปิดฝาให้แน่นพอดี แล้วแกว่งขวดวนไปมา เพื่อให้สารละลายผสมกันดี (ถ้าซีโอดีมากกว่า 500 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ลดปริมาตรน้ำตัวอย่างลงแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบตามตาราง)

5.3.2 นำหลอดแก้วใส่ลงในขวดใส่หลอดแก้ว แล้วเข้าตู้อบที่ 150 องศาเซลเซียส แล้วต้มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5.3.3 เปิดฝาหลอดแก้ว แล้วเติมเฟอร์โรอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด แล้วไทเทรตด้วย 0.10 นอร์มอล เอฟเอเอส จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง (B)

5.3.4 ทำแปลงค์ด้วยทุกครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างและทำการวิเคราะห์เหมือนตัวอย่างน้ำ

5.4 การคำนวณ

$$\text{ซีไอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ

A = มิลลิลิตรของเฟอเอเอส ที่ใช้ไทเทรตแปลงค์

B = มิลลิลิตรของเฟอเอเอส ที่ใช้ไทเทรตน้ำตัวอย่าง

C = นอร์มอลของเฟอเอเอส

6. ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen : DO)

การวิเคราะห์ค่าออกซิเจนละลายน้ำ จะวิเคราะห์ตามวิธีของ Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 20th ed. (1998)

ออกซิเจนจะออกซิไดส์ Mn^{2+} ไปเป็น Mn^{4+} ภายใต้สภาวะเป็นด่าง Mn^{4+} นี้สามารถจะออกซิไดส์ I^- ไปเป็น I_2 อีสารภายใต้สภาวะที่เป็นกรด นั่นคือปริมาณของ I_2 อีสารที่ถูกจับออกมาจะสมมูลย์กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำตอนเริ่มต้นและวัดได้โดยการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต (มันสิน, 2543)

6.1 สารเคมี

6.1.1 สารละลายแมงกานีสซัลเฟต

ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$) 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) 364 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

6.1.2 สารละลายแอลคาไลน์-ไฮโดรไดต์-ไอโซด์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม (หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 700 กรัม) และโซเดียมไฮโดรไดต์ (NaI) 135 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เสร็จแล้วเติมโซเดียมเอไซด์ (NaN₃) 10 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

6.1.3 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

6.1.4 น้ำแป้ง

ละลายแป้ง (Soluble starch) 5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทลงในน้ำกลั่นที่ต้มเดือด 800 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปล่อยให้เดือดประมาณ 5 นาที เติมหทูลอื่น 2-3 หยด เพื่อให้เก็บได้นานขึ้น

6.1.5 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์

ละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 6.205 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มจนเย็นแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.4 กรัม เพื่อเก็บรักษาให้คงสภาพอยู่ได้ สารละลายมาตรฐานนี้ต้องมีการเทียบหาความเข้มข้นมาตรฐานกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ทุกครั้ง

6.1.6 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ที่อบแห้งแล้ว 1.226 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

การหาค่ามาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต ทำโดยละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 2 กรัม ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่น 100-150 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.025 โมลาร์ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตไอโอดีนที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต คำนวณหาความเข้มข้นจาก

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟต (โมลาร์)} = \frac{20 \times M}{A}$$

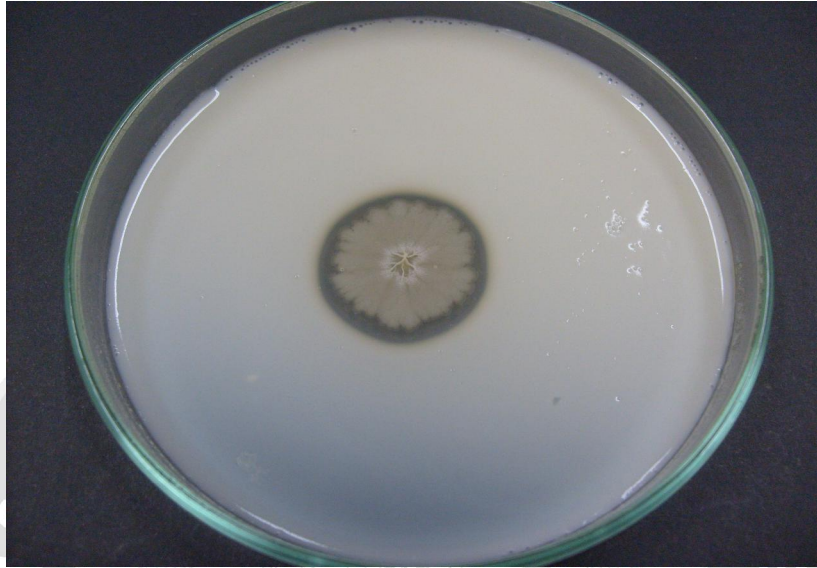
กำหนดให้

M = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต (0.025 โมลาร์)

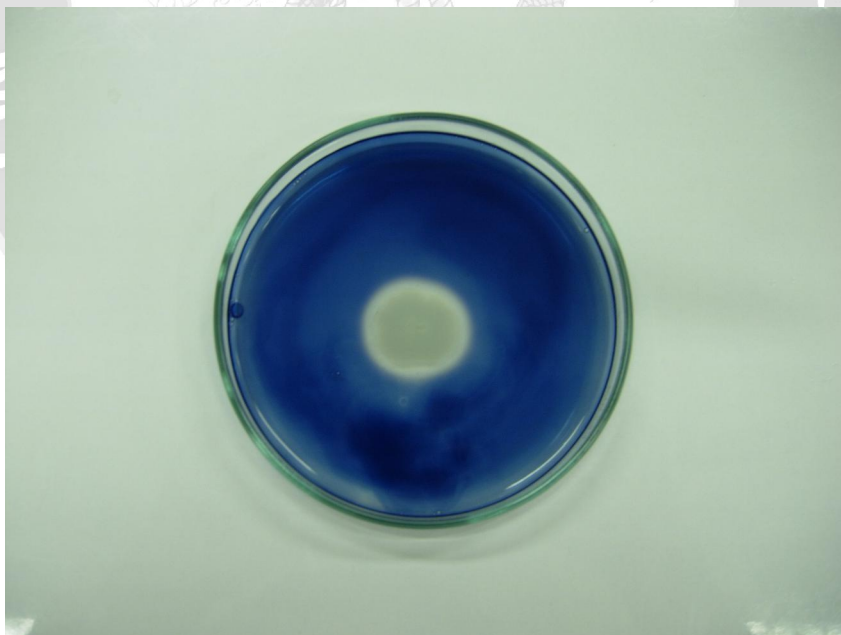
A = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ค

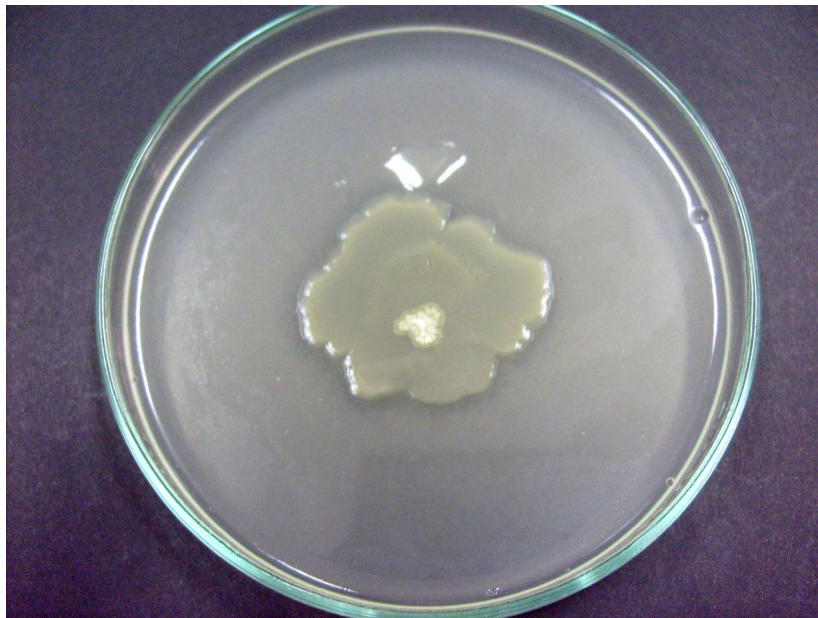
การย่อยสลายสารประกอบของจุลินทรีย์



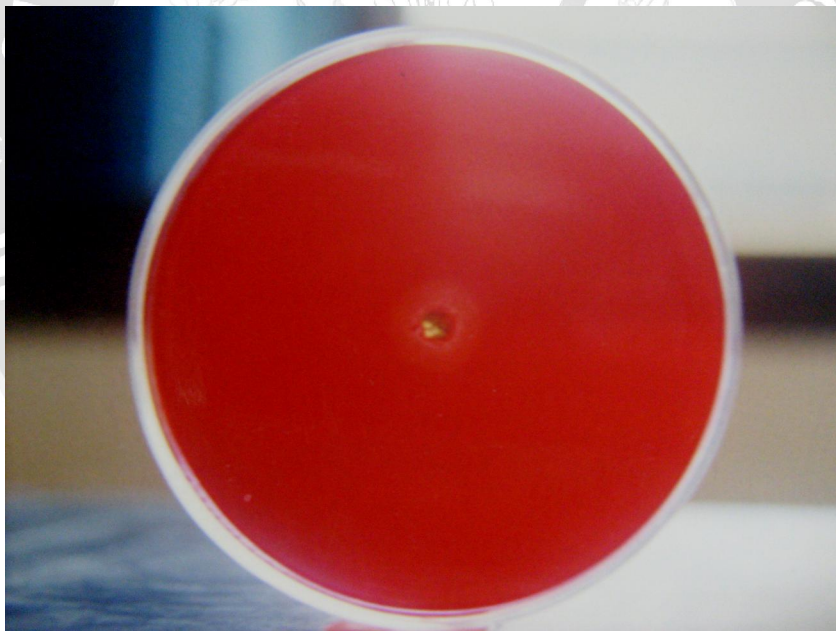
ภาพภาคผนวกที่ 1 แสดงการเกิดโซนที่มีการย่อยสลาย skim milk รอบโคโลนีของจุลินทรีย์



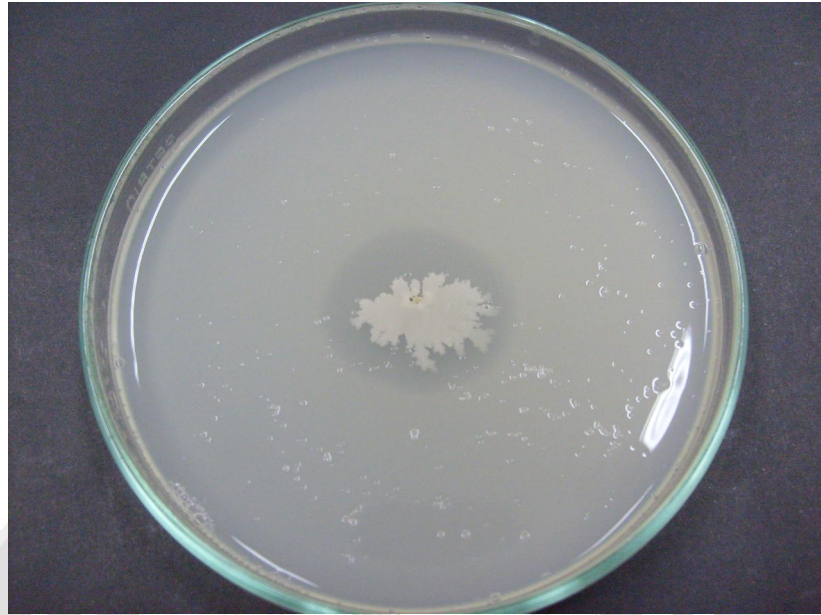
ภาพภาคผนวกที่ 2 แสดงการเกิดโซนที่มีการย่อยสลาย starch รอบโคโลนีของจุลินทรีย์



ภาพภาคผนวกที่ 3 แสดงการเกิดโซนที่มีการย่อยสลาย tributyrin รอบโคโลนีของจุลินทรีย์



ภาพภาคผนวกที่ 4 แสดงการเกิดโซนที่มีการย่อยสลาย carboxy methyl cellulose รอบโคโลนีของจุลินทรีย์



ภาพภาคผนวกที่ 5 แสดงการเกิดโซนที่มีการย่อยสลาย xylan รอบโคโลนีของจุลินทรีย์



ภาพภาคผนวกที่ 6 แสดงลักษณะของขยะที่ยังไม่ผ่านการบำบัด



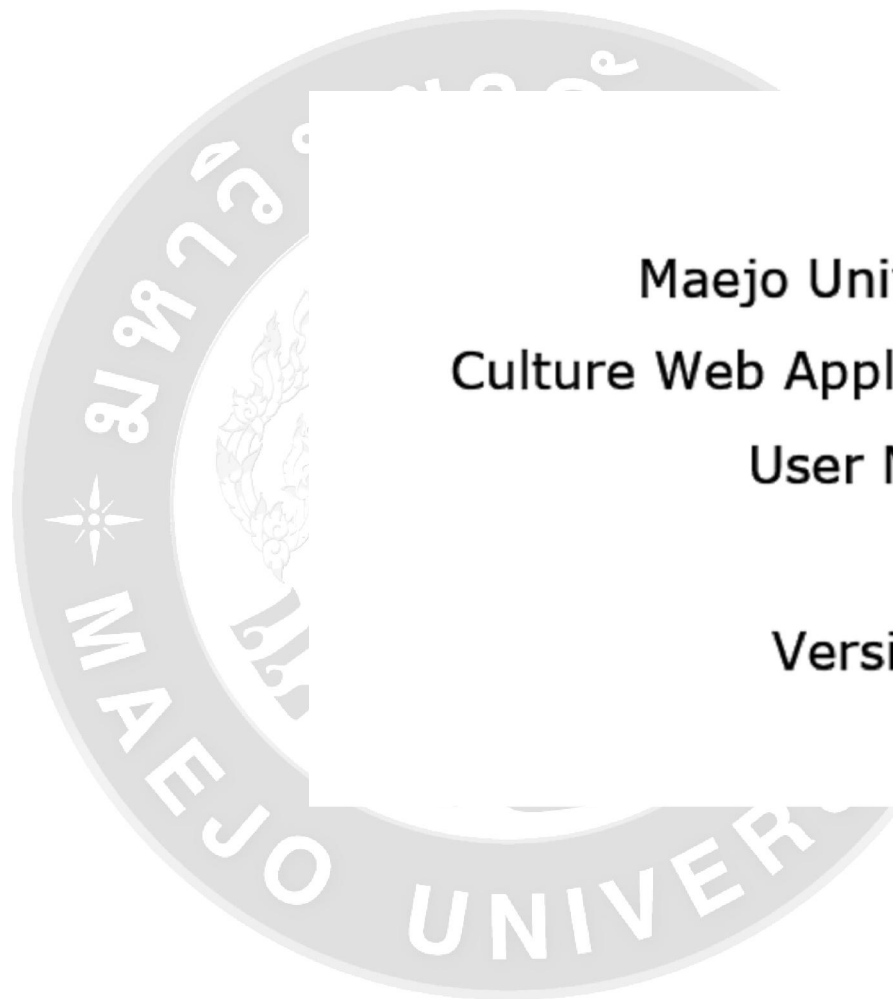
ภาพภาคผนวกที่ 7 แสดงลักษณะของขยะที่ผ่านการบำบัดแล้ว



ภาพภาคผนวกที่ 8 น้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแบบเติมอากาศและไม่เติมอากาศ

ภาคผนวก ง
คู่มือการใช้งานฐานข้อมูลจุลินทรีย์





**Maejo University
Culture Web Application
User Manual**

Version 1.1

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Revision History

Date	Version	Description	Author
9 August 2007	1.0	Create Document	Wasu Niumsup
13 August 2007	1.1	Update Document	Wasu Niumsup

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Table of Contents

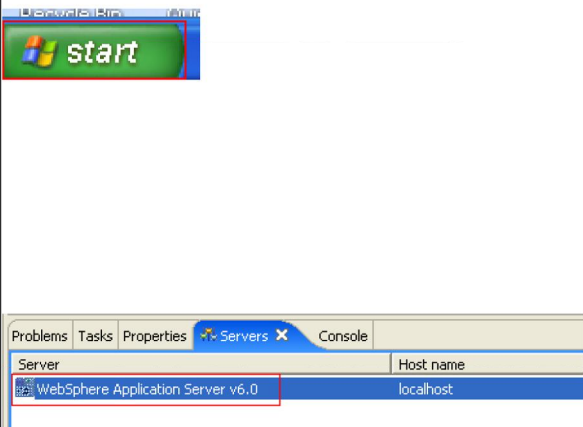
1. How to Start Server	Error! Bookmark not defined.
2. Culture Web Application User Manual	5

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

How to Start Server

1. Start Server

1.1 Start Web Server

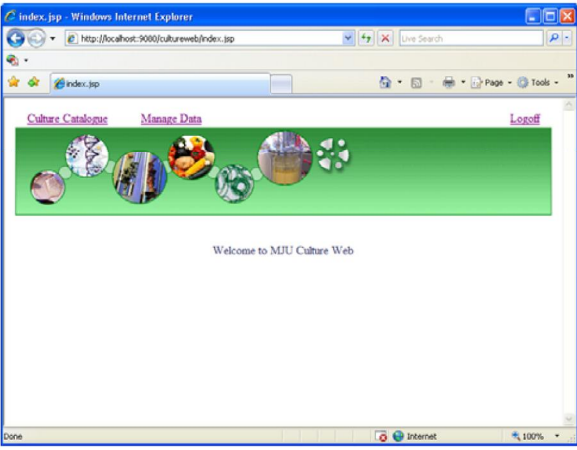
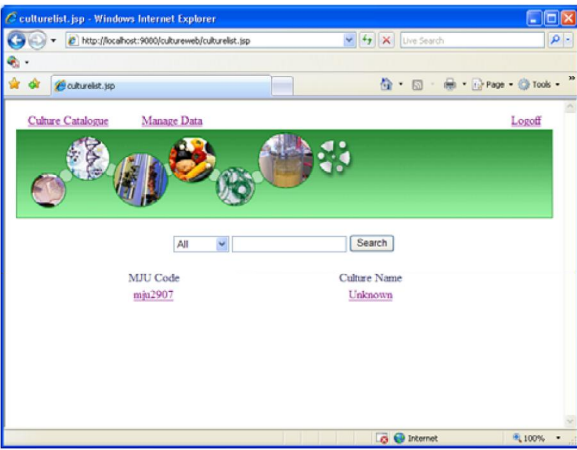
Screen	Description
1.1.1 Start Web Server	
	- Start Windows - Click "Start" on Task bar - Choose Programs > IBM Rational > IBM Rational Application Developer V6.0 > Rational Application Developer - Enter "D:\Workspace" as Workspace - Click "OK" - Click "Servers" Tab on the Bottom window - Select "WebSphere Application Server v6.0" - Click  to Start Server - Wait until process complete

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

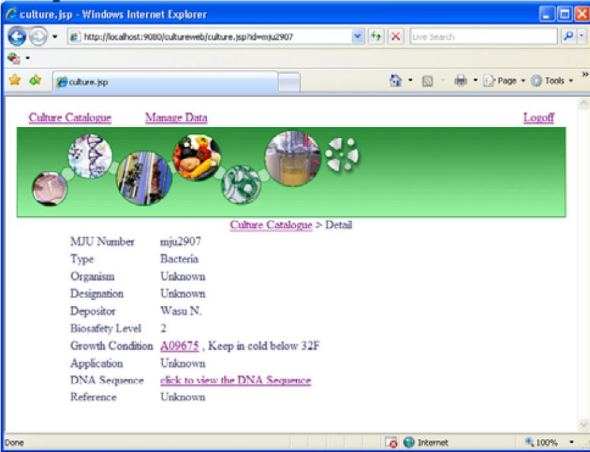
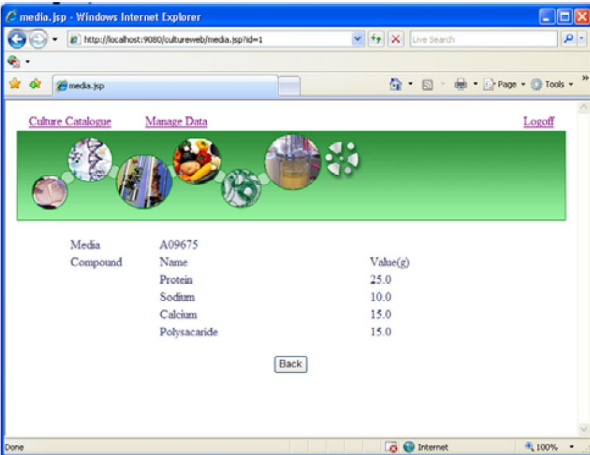
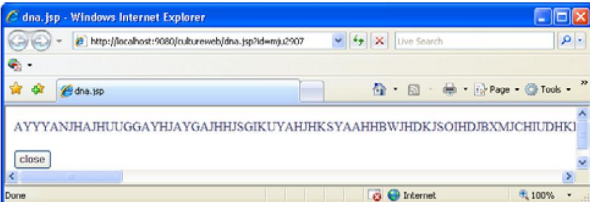
Culture Web Application User Manual

2. User Manual

2.1 View Culture

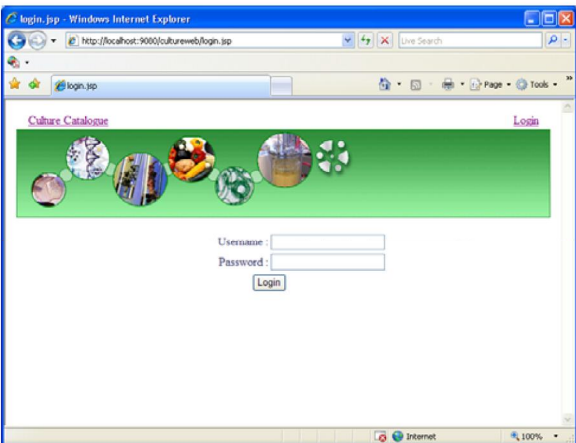
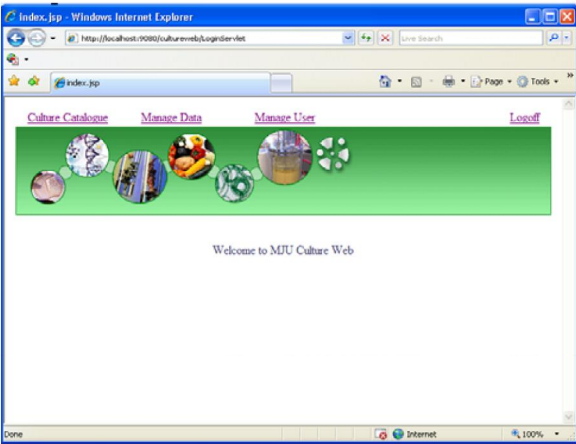
Screen	Description
2.1.1 View Culture	
	- Open IE Browser - Type "http://localhost:9080/cultureweb/" as URL - The Culture Web Application will displayed
	- Click "Culture Catalogue" to view Culture list - Select Dropdown to select type of culture - Enter criteria for advance search - Click "Search" - Search result will displayed - Click on the culture MJU Code or Culture Name to view that culture detail

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Screen	Description
	- Culture detail will displayed
	- Click on Growth Condition Name to view the culture Growth Condition - Growth Condition will displayed - Click "Back" to go to previous screen
	- To view the culture DNA Sequence click "click to view DNA Sequence" - New window will popup and show the culture DNA Sequence - Click "close" to close this window

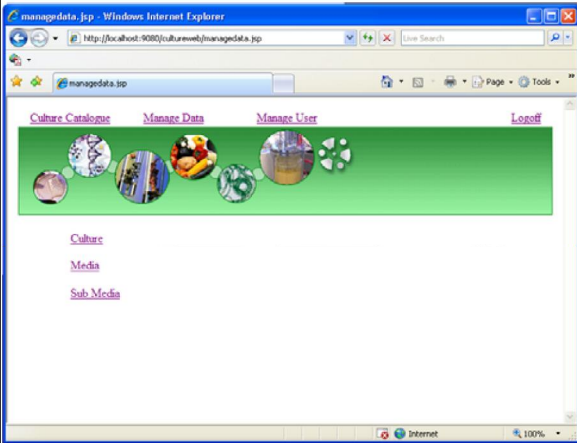
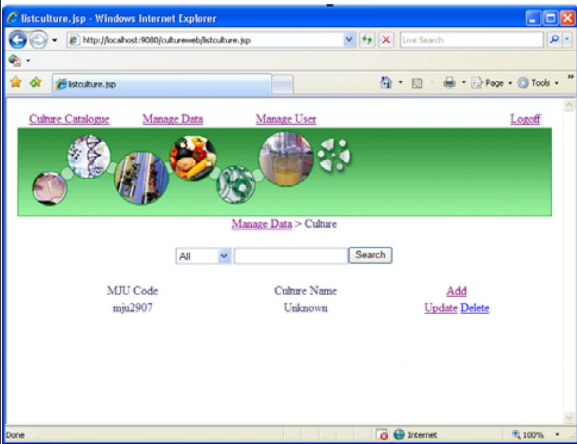
MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

2.2 Login

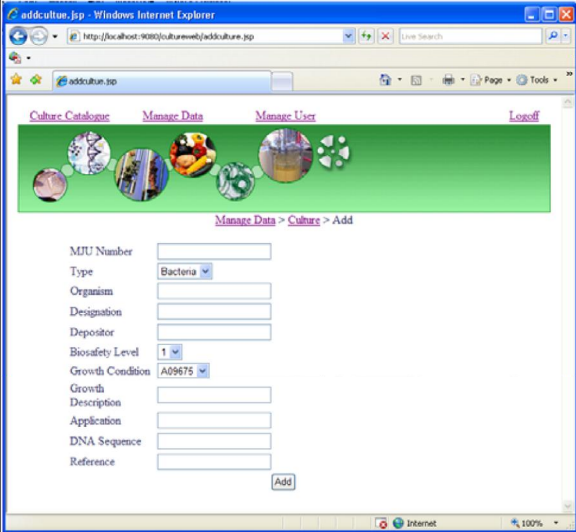
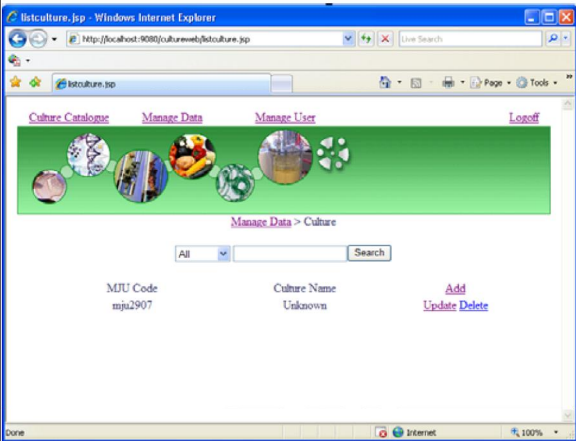
Screen	Description
2.2.1 Login	
	- Click "Login" on the top right - The Login Page will displayed
	- Enter Username and Password - Click "Login" - The menu on the top will display by the role of the user - Click "Logoff" if you want to Logoff

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

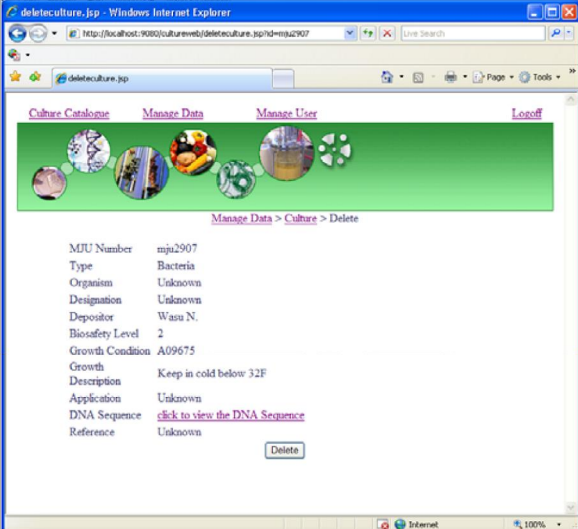
2.3 Manage Data

Screen	Description
2.2.1 Manage Culture	
	- Click "Login" on top of the screen - The Manage Data Page will displayed
	- Click "Culture" to manage culture - Culture list will displayed - You can use search to find culture

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Screen	Description
	- To add new culture click "Add" - The Add Culture page will displayed - Fill the Add Culture form - Click "Add" button to add new culture
	- To update culture detail click "Update" behind the culture you want to update - The Update Culture page will displayed

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Screen	Description
	- Click "Delete" button to delete the culture

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสารในขยะ น้ำเสีย
และน้ำมัน

1. MJUT011

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
AGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCT
GTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCACCGGGCCCGCGGTA3'

2. MJUT019

5'GCTATAATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGA
AGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTA
TCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTACAAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

3. MJUT026

5'GCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAG
 CTACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
 AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGG
 GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCACCCCCCGCGGT3'

4. MJUT033

5'GCCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGG
 CTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCACCCCCCGCGGTA3'

5. MJUT036

5'GCTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

6. MJUT067

5'TCCGCCTGCCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG
GCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGT
TGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCG3'

7. MJUT071

5'GGGGTGCTATAATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTC
GGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCACCGGCCGCGA3'

8. MJUT074

5'GGCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGT
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTC
GGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGAT
GGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGT
TGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCG3'

9. MJUT075

5'TCTGGCGGCTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGAC
 GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT
 TCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAG
 ATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
 CGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
 CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTC
 TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACC3'

10. MJUT076

5'AGCGGGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTA
 GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCG
 GGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG
 GCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
 CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
 AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGT
 TGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA
 AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC3'

11. MJUT108

5'GGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAA
 CCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTACTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTATCT
 GCTGGCCCTATTAGAAGGGCCCCCGCCCATTTACTAATTGGGGAAGGAACCGCTCAA
 CCAGGGCACCATGCCTAACCCAACTGGAAGGGTGGTCCGCCAACTGGGACTGGAAA
 CCCGCCCAAACCTCTACCGGAGGCAGCAGTAGGGAATCCTCCCAATGGGCGAAAGCCT
 GATGGAAGAACCGCGCCTGAATGAAGAAAGGTTTCGGATCGTAAATCTGGTGGAAGG
 GAAGAACAGTACAGTAGTACTGGCTGTCCTTGACCGTACTTATAGAAAGCCACGCTACTA
 CGTGACGCCGCCAGCGTAANACGTAG3'

12. MJUT109

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTACTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCTGCT
 GGCCCTATAAGAAGGGCCCCCGCCCTTAACCTAATTGGGGAAGGAACGGCTCCCCCA
 GGGCAACAAGCCTAACCCAACTGGAAAGGTGAACCGCCCCCTGGGAATGAAAACCC
 GCCCCAAATCCTACCGGAAGGCACCATAAGGAATCCTCCCCCATGGGCCAAAGCCTGG
 AGGAACCACCCCCCTGGATGAAAAAAGGTTTCCGAACCTAAACTCTGGTGGAAGGG
 AAAAACCAGTACCGTAATAACTGGGTGGACCTTTGCCGGACCTTAATTAAGCCCCGG
 GTAAATACCTGGCCACCGGCCGCGGTAA3'

13. MJUT112

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCGGCCGCGATAA3'

14. MJUT113

5'CCTAATAAGTAGCATGTGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCCTCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCGGCCGCGGT3'

15. MJUT118

5'TAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCCGGCCCGCGGTA3'

16. MJUT119

5'CTATACATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGT
CACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
AACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCACCCCGCCCCGCGGTAA3'

17. MJUT120

5'GCGCGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGC
TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCC3'

18. MJUT122

5'TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTACCGTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGT3'

19. MJUT125

5'GGGTGCCTATAATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
 CCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTC
 GGCTGTCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
 CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
 GGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCACAGGCCGCGGT3'

20. MJUT130

5'GGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGC
 GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAA
 ACGGGCGCTAATACCGCATACTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCAC
 GCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC
 GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA
 GCCATGCCGCGTGTTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA
 GGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAAAT
 TCGTGCCAGCAA3'

21. MJUT133

5'TGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGG3'

22. MJUT136

5'GCTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GCGGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

23. MJUT137

5'GCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

24. MJUT138

5'GCGCAGCCTTAACATGCAGTCGACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAACATATCGGAACGTGCCCTGGAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
ACTAGCTAATACCGCATACGCCCTGAGGGGGAAAGTGGGGGATCGCAAGACCTCATGC
TCGTGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA
CGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAG
CAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTCCGGGAAGAAA
TCCCATCCCTGAATACGGGGTGGGGATGACGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAAC
TACGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

25. MJUT 139

5'CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

26. MJUT143

5'CATGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

27. MJUT151

5'GGCGTGCCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGT
TTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
TTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCACCGCCCG3'

28. MJUT162

5'GCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCCGCGCGGTA3'

29. MJUT164

5'TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCCGCGCGGTA3'

30. MJUT165

5'GCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

31. MJUT170

5'CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
 GCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
 CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
 GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
 CTAATACTACGTGCCACGGCCCGCGGTA3'

32. MJUT171

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
 GGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
 ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGAGTAAA3'

33. MJUT172

5'GCGCGTGCTACACATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGG
 GGTCTAATACCGGATACAACCACTGACCGCATGGTCGGGTGGTGGAAGCTCCGGCGG
 TGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGA
 CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
 GCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA
 AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCCGGCCG
 CAGGTA3'

34. MJUT178

5'ATGGCGCTGCTTACCATGCAGTCGACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGA
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGG
 GGTCTAATACCGGATAACACTCCTGTCTCCTGGACGGGGGTAAAAGCTCCGGCGGT
 GAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGAC
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG
 CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA
 GCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GT3'

35. MJUT197

5'GCGCTGCTTACACATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGG
 GTCTAATACCGGATAACACTCCTGTCTCCTGGACGGGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGA
 AGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA
 CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCG
 ACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
 GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCCGG3'

36. PB001

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
 AGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCT
 GTCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
 CTAACCTACGTGCACC3'

37. PB002

5'CTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

38. PB003

5'TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCACCGGGCCGCG3'

39. PB004

5'CCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGT3'

40. PB005

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGT3'

41. PB006

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGGCCGCGGT3'

42. PB007

5'CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGAGGCCCGCGGTA3'

43. PB008

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCACCCCCCCCCCGGTAG3'

44. PB009

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

45. PB010

5'GTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCTCCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGAAG3'

46. PB011

5'GCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGATAA3'

47. PB012

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCACCGGGCCGCGGTA3'

48. PB013

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGC
TGTCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCACCGGCCGCGGTA3'

49. PB014

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGC
TGTCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGGCCGCGGTA3'

50. HPB015

5'GTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTACCGTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCACCGGGGCCGCGGT3'

51. HPB016

5'GTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGGTA3'

52. HPB017

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
 GGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
 CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
 GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
 CTAATACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

53. HPB018

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCACCGGGCCGCGGT3'

54. HPB019

5'CTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGGCTCACCA
 AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCACAGGCCGCGGTA3'

55. HPB020

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGGCTCACCAA
 GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCACCGGCCGCGGTA3'

56. HPB021

5'GGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGGCTCAC
 CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

57. HPB022

5'GGGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTC
GGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGG3'

58. HPB023

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGT3'

59. HPB024

5'CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGTA3'

60. HPB025

5'GTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGT3'

61. HPB026

5'GCGGGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG
 CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
 AAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGC
 TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
 CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
 AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
 TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
 GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCG3'

62. HPB027

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGT3'

63. HPB028

5'CGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

64. PW32

5'CCGGCTGCCTATACATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAG
 CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGG
 GAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGG
 CTTGCGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
 AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTT
 GTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
 AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGGC3'

65. PW3/2

5'GCGCAGGCTACACATGCAGTCGAGCGGCAGCACAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGC
 GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
 GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC
 TCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTA
 GGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAG
 GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA
 TGCACCCATGCCGCGTGATGAAAAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGA
 GGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGCAAAAGAAGCACCGGC
 TAACTCCGTGCCAGCCGGCCGCGATA3'

66. PW35/2

5'GCGGCAGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGGGGAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGC
 GGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAA
 GGGATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCG
 CTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA
 CGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
 CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAG
 GCTACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAAC
 TCTGTGCCAGCAGGCCGCGGTA3'

67. SA12/1

5'GGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGG
 GATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTA
 ATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
 ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
 TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTA
 CTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCAGAGCCCCGCGGTA3'

68. SA38/2

5'CGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGG
 GATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTA
 ATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
 ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
 TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTA
 CTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCAGAGGCCGCGGTA3'

69. PW5/2

5'GCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGA
 TGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAAT
 AGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGAT
 CTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACT
 TTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACACTGAA
 AACAGCAGCCGCGGTA3'

70. SA6/3

5'GCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAG
 GGATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGC
 TAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC
 GATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCC
 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCT
 ACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCT
 GTGCCAGCAGGCCGCGGTA3'

71. PW35/1

5'GCAGCTACACATGCAGTCGACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGG
 CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAAC
 GGATGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGC
 CATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGA
 CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
 CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAG
 GTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACT
 CCGTGCCAGCAG3'

72. PW10/2

5'CGCTGCTTACCATGCAGTCGAACGGCAGCGGGGAAGCTTGCTTTCCTGCCGGCGAG
 TGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGA
 AAGATTAGCTAATACCGCATAACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCA
 TGCTATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC
 GACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC
 AGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGA
 AATGGCTCTGGTTAATACCCGGAGTTGATGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGGCTAA
 CTACGTGCCAGCCGCCCGCGGTGTCATC3'

73. SA7/1

5'GCGGCTGCTTACCATGCAGTCGACGGCAGCGGGGAAGCTTGCTTTCCTGCCGGCG
 AGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTC
 GAAAGATTAGCTAATACCGCATAACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCT
 CATGCTATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
 GCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
 CCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAA
 GAAATGGCTCTGGTTAATACCCGGAGTTGATGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGGCT
 AACTACGTGCCAGCAGCCCGCGGTA3'

74. SA6/4

5'GGCAGCTTACACATGCAGTCGAGCGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGG
 GATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTA
 ATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
 ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
 TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTA
 CTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCACCGCCCCGCGGTA3'

75. PW5/1

5'GCGGCAGCTACCATGCAGTCGAGCGGGGGAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGG
 ATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAA
 TAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGAT
 CTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACT
 TTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG
 CCAGCCGCCCGCGGTA3'

76. PW27

5'GGCAGGCTTACCATGCAGTCCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAG
 GGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGC
 TAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC
 GATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCC
 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCT
 ACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCT
 GTGCCAGAGCCCGCGGTGAATTAAG3'

77. SA11/4

5'GCAGGCTACCATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGA
 TGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAAT
 AGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGAT
 CTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACT
 TTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG
 CCAGAGGCCCGCGGT3'

78. SA38/4

5'GGCGGCGGCTTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAA
AGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC
GCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCG
ACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAG
GCTACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAAC
TCTGTGCCAGCAGGCCGCGGATA3'

79. SA2/5

5'CTGCCGCGGCTTACCATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAA
AGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC
GCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCG
ACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAG
GCTACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAAC
TCTGTGCCAGCCGCCCGCGGTA3'

80. PW35/3

5'TTGGGCAGGCCTACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCCTCGGGT
GACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACT
ACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGG
GCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCAC
CTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
GATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGG
GAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC
GGCTAACTCCGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

81. KS21

5'CGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTT
CGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC3'

82. KS23

5'GTGCTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCG
GCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGC
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTAA
GGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT3'

83. KS27

5'GGCCGCGTGCCTTCTTCATGCAAGTCGAGCGAATGGATTCAGAGCTTGCTCTTATGA
AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAA
GGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA3'

84. KS28

5'GGGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTT
CGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG3'

85. KS30

5'CGGCGTGCCTTATTACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAAG
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTC
CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGG
CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCT
GTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG3'

86. KS37

5'CGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCG
GCTGTCGCTATAGGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGC
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTAA
GGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG3'

87. KS38

5'GCGTGCCTTCTACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTA
 GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGG
 GAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGT
 TTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGA
 AAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTT
 GTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAG
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC3'

88. KS44

5'TGGCGGCGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGT
 TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
 GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGAC
 GGTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
 GCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
 GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTG
 TTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAAGTGCCTTGACGGTACCTAACCAGA
 AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC3'

89. S27

5'GTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT3'

90. S05

5'GCAGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGGCCCTTCGGGGTCAGCGGCAGACGGGTGAG
TAACGCGTGGGAACGTACCATTGCTACGGAATAACTCAGGGAACTTGTGCTAATACC
GTATGAGCCCCCTTTAAATTTTCAGGAATCATAAAATGCCCTGGCATTATGGGGGGG
AAAGATTTATCGGCAAATGATCGGCCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC
CTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCA
AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTCA
CCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGAAGGGGGGCTAGCGT3'

91. S07

5'GCAGCTTACACATGCAGTCGAGCGGGCCCTTCGGGGTCAGCGGCAGACGGGTGAGT
AACGCGTGGGAACGTACCATTGCTACGGAATAACTCAGGGAACTTGTGCTAATACCG
TATGAGCCCCCTTTAAATTTTCAGGAATCATAAAATGCCCTGGCATTATGGGGGGGA
AAGATTTATCGGCAAATGATCGGCCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC
TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA
GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAC
CGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGAAGGGGGGCTAGCGTT3'

92. W17

5'GGTGCCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTT
CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTC
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG3'

ภาคผนวก จ

การเตรียมถังหมักจุลินทรีย์



ภาพภาคผนวกที่ 9 ถังหมักจุลินทรีย์

การเตรียมถังหมักจุลินทรีย์ (ภาพภาคผนวกที่ 9) ทำโดยนำถังพลาสติก มาประกอบเข้ากับอุปกรณ์ต่างๆ บนฐานวางถังหมักที่ติดตั้งระบบสะพานไฟและสวิตช์ไฟ รวมถึงติดตั้งเครื่องสูบน้ำกับตัวฐาน (ภาพภาคผนวกที่ 10) จากนั้นใช้ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว ประกอบเป็นท่อช่องทางรับของเหลวจากภายในและภายนอก ต่อกับเครื่องสูบน้ำเข้าสู่ตัวถัง (ภาพภาคผนวกที่ 11) หากเป็นระบบเติมอากาศให้ติดตั้งเครื่องผลิตออกซิเจนบนตัวถังและต่อท่อเข้าภายในถังจนเกือบถึงด้านล่างสุดถัง (ภาพภาคผนวกที่ 12) ข้อควรระวังคือต้องตัดท่อให้พอดีช่วงและทากาวให้แน่นเพื่อไม่ให้ข้อต่อทุกชนิดเกิดการรั่วซึม



ภาพภาคผนวกที่ 10 ส่วนวางถังหมักจุลินทรีย์



ภาพภาคผนวกที่ 11 ท่อช่องทางรับของเหลวจากภายในและภายนอก



ภาพภาคผนวกที่ 12 การติดตั้งเครื่องผลิตออกซิเจนแบบมีตัวกรองกับถังหมักแบบเติมอากาศ

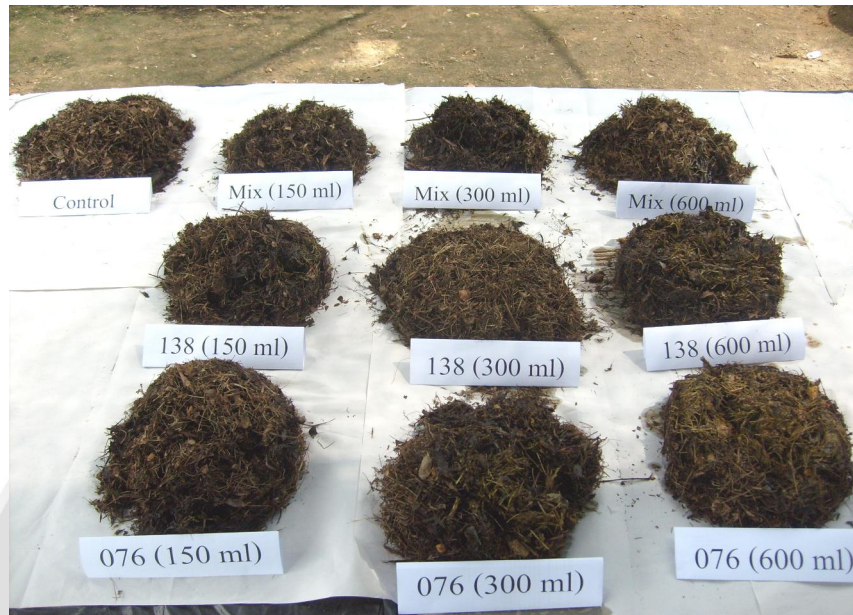
เมื่อประกอบถังหมักเรียบร้อยแล้ว ควรล้างทำความสะอาดสิ่งสกปรกในถังทุกครั้งเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ เมื่อเริ่มเข้าสู่กระบวนการผลิตจุลินทรีย์จะใช้ถังผสมเล็กเป็นภาชนะในการละลายสารอาหาร เช่น กากน้ำตาล, น้ำตาลทรายแดง กับน้ำสะอาดก่อน แล้วจึงใช้เครื่องสูบน้ำดูดเอาส่วนผสมต่างๆ เข้าไปในถังหมัก โดยการต่อสายยางเข้ากับช่องทางรับของเหลวภายนอกกับถังผสม (ภาพภาคผนวกที่ 13) จากนั้นปิดวาล์วช่องทางรับของเหลวภายในและเปิดวาล์วรับของเหลวภายนอก เมื่อละลายสารอาหารและผสมเชื้อจุลินทรีย์จนหมดแล้ว ให้เติมน้ำสะอาดเข้าไปอีก โดยให้เหลือพื้นที่ว่างประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของถัง (ถ้าใช้ถังขนาด 2,000 ลิตร เติมน้ำให้มีระดับ 1,800 ลิตร) เมื่อเติมน้ำจนถึงระดับดังกล่าวแล้วให้ปิดเครื่องสูบน้ำ ปิดวาล์วรับของเหลวจากภายนอก เปิดวาล์วรับของเหลวภายใน จากนั้นทำการกวนผสมโดยปิดวาล์วรับของเหลวภายนอก เปิดเครื่องสูบน้ำให้สูบสลับตรงในถังให้วนผสมกัน กรณีการหมักเป็นแบบเติมอากาศให้เติมอากาศวันละ 4 ชั่วโมงต่อวัน วันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 ชั่วโมงเช้าและเย็น และเป็นเวลา 3 วัน



ภาพภาคผนวกที่ 13 การต่อท่อจากช่องทางรับของเหลวภายนอกกับถังผสม



ภาคผนวก ช
ผลการทดลองบำบัดขยะและน้ำเสีย



ภาพภาคผนวกที่ 14 ผลการทดลองบำบัดขยะโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ราดโดยตรง (แบบเปียก)



ภาพภาคผนวกที่ 15 ผลการทดลองบำบัดขยะโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ทำเป็นปุ๋ยหมักจุลินทรีย์ก่อน
แล้วนำไปโรยให้ทั่ว (แบบแห้ง)



ภาพภาคผนวกที่ 16 ผลการทดลองบำบัดน้ำเสียของโรงแรมเชียงใหม่รัตนโกสินทร์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม



ภาพภาคผนวกที่ 17 ผลการทดลองบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปสุกรแม่โจ้ บริษัทเบทาโกร ภาคเหนือ เกษตรอุตสาหกรรม จำกัด โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ภาคผนวก ซ

เอกสารประกอบการฝึกอบรม
และผลการฝึกอบรม

สรุปผลแบบประเมิน

โครงการฝึกอบรมเรื่อง การใช้จุลินทรีย์แทนสารเคมีเพื่อบำบัดน้ำเสียก่อน

ปล่อยสู่ธรรมชาติ

รุ่นที่ 1 วันที่ 7 กุมภาพันธ์ 2552

ณ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

โครงการฝึกอบรมเรื่อง การใช้จุลินทรีย์แทนสารเคมีเพื่อบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติ จัดโดยสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ รุ่นที่ 1 จัดในวันที่ 7 กุมภาพันธ์ 2552 มีผู้เข้ารับการฝึกอบรมทั้งสิ้น 48 คน ผลการสรุปแบบประเมินโครงการฯ เป็นดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 อาชีพของผู้เข้ารับการฝึกอบรม

อาชีพของผู้เข้ารับการฝึกอบรม	จำนวน (คน)	ร้อยละ
เกษตรกร	8	16.7
ข้าราชการ เทศบาลเมืองแม่โจ้	1	2.1
ครูเอกชน	1	2.1
ค้าขาย	4	8.3
นักศึกษา	20	41.7
พนักงานบริษัท	1	2.1
แม่บ้าน	3	6.2
รับจ้าง	7	14.6
ลูกจ้าง	3	6.2
รวมทั้งสิ้น	48	100.0

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการอบรมส่วนใหญ่เป็นนักศึกษา คิดเป็นร้อยละ 41.7 รองลงมาเป็นเกษตรกร และทำอาชีพรับจ้าง คิดเป็นร้อยละ 16.7 และ 14.6 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผู้ที่เคยผ่านการฝึกอบรมหลักสูตรอื่นที่เกี่ยวข้องมาก่อน

การผ่านการฝึกอบรมหลักสูตรอื่นที่เกี่ยวข้อง	จำนวน (คน)	ร้อยละ
เคย	1	2.1
ไม่เคย	47	97.9
รวมทั้งสิ้น	48	100.0

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ ไม่เคยเข้ารับการฝึกอบรมหลักสูตรอื่นที่เกี่ยวข้องกับเกษตรอินทรีย์มาก่อน จำนวน 47 คน คิดเป็นร้อยละ 97.9 ที่เหลือเคยผ่านการฝึกอบรมเรื่องเกษตรอินทรีย์มาแล้ว จำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 2.1

ตารางที่ 3 ความต้องการให้จัดการอบรมหลักสูตรนี้อีกในโอกาสหน้า

ความต้องการให้จัดการอบรมหลักสูตรนี้อีกในโอกาสหน้า	จำนวน (คน)	ร้อยละ
ควรจัดอีก	39	81.2
- กุมภาพันธ์-มีนาคม	1	2.1
- ครึ่งวันเช้า	1	2.1
- ช่วงกลางเทอมระหว่างเปิดภาคการศึกษา	1	2.1
- ช่วงเวลาฤดูเกษตรนั้นๆ เพื่อให้เห็นภาพการใช้จุลินทรีย์/สารเคมี	1	2.1
- มีนาคม	2	4.2
- วันเสาร์-อาทิตย์	2	4.2
- วันหยุดในช่วงต่างๆ	1	2.1
ไม่ควรจัดอีก	0	0.0
รวมทั้งสิ้น	48	100.0

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมทั้งหมด ต้องการให้มีการจัดการฝึกอบรมหลักสูตรนี้อีกในโอกาสหน้า โดยช่วงเวลาที่ควรจัดการฝึกอบรมหลักสูตรนี้นั้น ได้แก่

ช่วงเดือนมีนาคม, วันเสาร์-อาทิตย์, วันหยุดในช่วงต่างๆ, ช่วงเวลาฤดูเกษตรนั้นๆ เพื่อให้เห็นภาพการใช้จุลินทรีย์/ สารเคมี, ช่วงกลางเทอมระหว่างเปิดภาคการศึกษา, จัดช่วงครึ่งวันเช้า และช่วงเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม

ตารางที่ 4 แหล่งที่ได้รับข้อมูลข่าวสารในการฝึกอบรม

แหล่งที่ได้รับข้อมูลข่าวสารในการฝึกอบรม	จำนวน (คน)	ร้อยละ
หนังสือจากทางสถาบัน IQS	3	2.1
คนรู้จัก	30	62.5
ป้ายประกาศ	15	31.2
รวมทั้งสิ้น	48	100.0

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ได้รับข้อมูลข่าวสารในการฝึกอบรมมาจากคนรู้จัก จำนวน 30 คน คิดเป็นร้อยละ 62.5 นอกนั้นได้รับข้อมูลข่าวสารในการฝึกอบรมมาจากป้ายประกาศและหนังสือจากทางสถาบัน IQS คิดเป็นร้อยละ 31.2 และ 2.1 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม ด้านความคิดเห็นทั่วไป

หัวข้อการประเมิน	ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม									
	มากที่สุด		มาก		ปานกลาง		น้อย		น้อยที่สุด	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
1.ความเหมาะสมของเนื้อหาการฝึกอบรม	26	54.2	19	39.6	3	6.2	0	0.0	0	0.0
2.การได้รับความรู้จากการฝึกอบรม	23	47.9	23	47.9	2	4.2	0	0.0	0	0.0
3.การนำความรู้ที่ได้รับจากการอบรมครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้จริง	20	41.7	23	47.9	5	10.4	0	0.0	0	0.0
4.ความเหมาะสมของระยะเวลาในการฝึกอบรม	24	50.0	13	27.1	10	20.8	1	2.1	0	0.0
5.ความเหมาะสมของสถานที่ในการฝึกอบรม	29	60.4	15	31.2	4	8.3	0	0.0	0	0.0
6.คุณภาพของอาหารกลางวัน อาหารว่าง และการบริการ	26	54.2	18	37.5	4	8.3	0	0.0	0	0.0
7. ภาพรวมของการฝึกอบรม	25	52.1	18	37.5	5	10.4	0	0.0	0	0.0

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ มีความพึงพอใจระดับมากที่สุด ในประเด็นความเหมาะสมของเนื้อหาการฝึกอบรม, การได้รับความรู้จากการฝึกอบรม, ความเหมาะสมของระยะเวลาในการฝึกอบรม, ความเหมาะสมของสถานที่ในการฝึกอบรม, คุณภาพของอาหารกลางวัน อาหารว่าง และการบริการ และ ภาพรวมของการฝึกอบรม คิดเป็นร้อยละ 54.5, 47.9, 50.0, 60.4, 54.2 และ 52.1 ตามลำดับ นอกจากนี้ ในประเด็นการนำความรู้ที่ได้รับจากการอบรมครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้จริง ผู้เข้ารับการฝึกอบรม มีความพึงพอใจในระดับมาก คิดเป็นร้อยละ 47.9

ตารางที่ 6 ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม ด้านการประเมินภาคบรรยาย

หัวข้อการประเมิน	ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม									
	มากที่สุด		มาก		ปานกลาง		น้อย		น้อยที่สุด	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
1.เนื้อหาของหัวข้อการบรรยาย	22	45.8	20	41.7	6	12.5	0	0.0	0	0.0
2.ระยะเวลาในการบรรยาย	17	35.4	15	31.2	16	33.3	0	0.0	0	0.0
3.วิทยากร										
- มีความรู้ในเนื้อหาที่บรรยาย	27	56.2	16	33.3	5	10.4	0	0.0	0	0.0
- มีความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ ความเข้าใจ	24	50.0	19	39.6	5	10.4	0	0.0	0	0.0
- ตอบคำถามและปัญหาต่างๆ ได้อย่างชัดเจน	23	47.9	19	39.6	6	12.5	0	0.0	0	0.0
- มีความสามารถในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วมในการฝึกอบรม	23	47.9	17	35.4	8	16.7	0	0.0	0	0.0
4.เอกสารประกอบการบรรยาย	23	47.9	17	35.4	8	16.7	0	0.0	0	0.0
5.อุปกรณ์การบรรยาย	21	43.8	20	41.7	6	12.5	1	2.1	0	0.0
6.การนำความรู้ไปใช้งานจริง	16	33.3	22	45.8	10	20.8	0	0.0	0	0.0

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ มีความพึงพอใจระดับมากที่สุด ในประเด็นเนื้อหาของหัวข้อการบรรยาย, ระยะเวลาในการบรรยาย, วิทยากรมีความรู้ในเนื้อหาที่บรรยาย, วิทยากรมีความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ ความเข้าใจ, วิทยากรตอบคำถามและปัญหาต่างๆ ได้อย่างชัดเจน, วิทยากรมีความสามารถในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วมในการฝึกอบรม, เอกสารประกอบการบรรยาย และการนำความรู้ไปใช้งานจริง

คิดเป็นร้อยละ 45.8, 35.4, 56.2, 50.0, 47.9, 47.9, 47.9 และ 43.8 ตามลำดับ นอกจากนี้
ในประเด็นการนำความรู้ไปใช้งานจริง มีความพึงพอใจในระดับมาก คิดเป็นร้อยละ 45.8

ตารางที่ 7 ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม ด้านการประเมินภาคปฏิบัติ

หัวข้อการประเมิน	ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม									
	มากที่สุด		มาก		ปานกลาง		น้อย		น้อยที่สุด	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
1.เนื้อหาของหัวข้อการปฏิบัติ	24	50.0	20	41.7	4	8.3	0	0.0	0	0.0
2.ระยะเวลาในการปฏิบัติ	20	41.7	19	39.6	9	18.8	0	0.0	0	0.0
3.วิทยากร										
- มีความรู้ในเนื้อหาที่ปฏิบัติ	28	58.3	17	35.4	3	6.2	0	0.0	0	0.0
- มีความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ ความเข้าใจ	26	54.2	18	37.5	4	8.3	0	0.0	0	0.0
- ตอบคำถามและปัญหาต่างๆ ได้อย่างชัดเจน	24	50.0	19	39.6	5	10.4	0	0.0	0	0.0
- มีความสามารถในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วมในการฝึกอบรม	23	47.9	20	41.7	5	10.4	0	0.0	0	0.0
4.เอกสารประกอบการปฏิบัติ	22	45.8	21	43.8	4	8.3	1	2.1	0	0.0
5.อุปกรณ์การปฏิบัติ	21	43.8	21	43.8	6	12.5	0	0.0	0	0.0
6.การนำความรู้ไปใช้งานจริง	22	45.8	22	45.8	4	8.3	0	0.0	0	0.0

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมทั้งหมด มีความพึงพอใจระดับมากที่สุดในทุกประเด็น โดยประเด็นที่มีความพึงพอใจมากที่สุด เรียงลำดับ 1 – 3 ได้แก่ ประเด็น วิทยากรมีความรู้ในเนื้อหาที่ปฏิบัติ, วิทยากรมีความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ ความเข้าใจ, วิทยากรตอบคำถามและปัญหาต่างๆ ได้อย่างชัดเจน และเนื้อหาของหัวข้อการปฏิบัติ คิดเป็นร้อยละ 58.3, 54.2 และ 50.0 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะจากผู้เข้าร่วมการอบรม

ข้อเสนอแนะของผู้เข้าร่วมการฝึกอบรมมีดังต่อไปนี้

- ควรมีใบประกาศรับรองเป็นหลักฐานในการฝึกอบรม และควรเพิ่มระยะเวลาในการฝึกอบรม
- เป็นโครงการฝึกอบรมที่ดี เหมาะในการนำไปประยุกต์ใช้ในการเกษตรของเมืองไทย
- อยากให้มีการจัดการอบรมในครั้งต่อไป เพื่อให้ทราบถึงปัญหาและวิธีการแก้ไขปัญหของเกษตรกร
- อยากให้มีประกาศนียบัตรให้ผู้เข้าร่วมอบรม ถึงแม้จะต้องจ่ายเงินเข้าร่วมอบรม ก็ถือเป็นสิ่งที่ดี แต่โดยภาพรวมถือว่าการอบรมที่ดีมาก อยากให้มีการจัดอีกแต่เป็นหัวข้ออื่นๆ ก็น่าสนใจ
- อยากให้มีอบรม 2 - 3 เดือนต่อครั้ง



สรุปผลแบบประเมิน

โครงการฝึกอบรมเรื่อง การใช้จุลินทรีย์แทนสารเคมีเพื่อบำบัดน้ำเสียก่อน

ปล่อยสู่ธรรมชาติ

รุ่นที่ 2 วันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2552

ณ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

โครงการฝึกอบรมเรื่อง การใช้จุลินทรีย์แทนสารเคมีเพื่อบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติ จัดโดยสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ รุ่นที่ 2 จัดในวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2552 มีผู้เข้ารับการฝึกอบรมทั้งสิ้น 44 คน ผลการสรุปแบบประเมินโครงการฯ เป็นดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 อาชีพของผู้เข้ารับการฝึกอบรม

อาชีพของผู้เข้ารับการฝึกอบรม	จำนวน (คน)	ร้อยละ
เกษตรกร	17	38.6
ค้าขาย	6	13.6
นักศึกษา	8	18.2
พนักงานบริษัท	1	2.3
แม่บ้าน	5	11.4
รับจ้าง	6	13.6
ลูกจ้าง	1	2.3
รวมทั้งสิ้น	44	100.0

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการอบรมส่วนใหญ่เป็นเกษตรกร คิดเป็นร้อยละ 38.6 รองลงมาเป็นนักศึกษา และค้าขายกับรับจ้างตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 18.2 และ 13.6 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผู้ที่เคยผ่านการฝึกอบรมหลักสูตรอื่นที่เกี่ยวข้องมาก่อน

การผ่านการฝึกอบรมหลักสูตรอื่นที่เกี่ยวข้อง	จำนวน (คน)	ร้อยละ
เคย	4	9.1
ไม่เคย	40	90.9
รวมทั้งสิ้น	44	100.0

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ ไม่เคยเข้ารับการฝึกอบรมหลักสูตรอื่นที่เกี่ยวข้องกับเกษตรอินทรีย์มาก่อน จำนวน 40 คน คิดเป็นร้อยละ 90.9 ที่เหลือเคยผ่านการฝึกอบรมเรื่องเกษตรอินทรีย์มาแล้ว จำนวน 4 คน คิดเป็นร้อยละ 9.1

ตารางที่ 3 ความต้องการให้จัดการอบรมหลักสูตรนี้อีกในโอกาสหน้า

ความต้องการให้จัดการอบรมหลักสูตรนี้อีกในโอกาสหน้า	จำนวน (คน)	ร้อยละ
ควรจัดอีก	43	97.7
ไม่ควรจัดอีก	1	2.3
รวมทั้งสิ้น	44	100.0

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ ต้องการให้มีการจัดการฝึกอบรมหลักสูตรนี้อีกในโอกาสหน้า 43 คน คิดเป็นร้อยละ 97.7 นอกนั้นมีความเห็นว่าไม่ควรจัดอีก 1 คน คิดเป็นร้อยละ 2.3 โดยช่วงเวลาที่ควรจัดการฝึกอบรมหลักสูตรนี้อีกนั้น ได้แก่ ช่วงเวลา 13.00 – 16.00 น., ช่วงเวลา 09.00 – 12.00 น., ช่วงเดือนกุมภาพันธ์, มีนาคม, เมษายน, ตุลาคม, ช่วงเวลาปิดภาคการศึกษา และช่วงวันเสาร์อาทิตย์

ตารางที่ 4 แหล่งที่ได้รับข้อมูลข่าวสารในการฝึกอบรม

แหล่งที่ได้รับข้อมูลข่าวสารในการฝึกอบรม	จำนวน (คน)	ร้อยละ
หนังสือจากทางสถาบัน IQS	1	2.3
คนรู้จัก	36	81.8
ป้ายประกาศ	7	15.9
รวมทั้งสิ้น	44	100.0

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ได้รับข้อมูลข่าวสารในการฝึกอบรมมาจากคนรู้จัก จำนวน 36 คน คิดเป็นร้อยละ 81.8 นอกนั้นได้รับข้อมูลข่าวสารในการฝึกอบรมมาจากป้ายประกาศและหนังสือจากทางสถาบัน IQS คิดเป็นร้อยละ 15.9 และ 2.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม ด้านความคิดเห็นทั่วไป

หัวข้อการประเมิน	ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม									
	มากที่สุด		มาก		ปานกลาง		น้อย		น้อยที่สุด	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
1. ความเหมาะสมของเนื้อหาการฝึกอบรม	19	43.2	20	45.5	4	5.1	1	2.3	0	0.0
2. การได้รับความรู้จากการฝึกอบรม	19	43.2	22	50.0	3	6.8	0	0.0	0	0.0
3. การนำความรู้ที่ได้รับจากการอบรมครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้จริง	15	34.1	24	54.5	5	11.4	0	0.0	0	0.0
4. ความเหมาะสมของระยะเวลาในการฝึกอบรม	11	25.0	18	40.9	9	20.5	6	13.6	0	0.0
5. ความเหมาะสมของสถานที่ในการฝึกอบรม	21	47.7	20	45.5	3	6.8	0	0.0	0	0.0
6. คุณภาพของอาหารกลางวัน อาหารว่าง และการบริการ	24	54.5	17	38.6	3	6.8	0	0.0	0	0.0
7. ภาพรวมของการฝึกอบรม	22	50.0	18	40.9	4	9.1	0	0.0	0	0.0

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ มีความพึงพอใจระดับมากในประเด็นความเหมาะสมของเนื้อหาการฝึกอบรม, การได้รับความรู้จากการฝึกอบรม, การนำความรู้ที่ได้รับจากการอบรมครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้จริง และความเหมาะสมของระยะเวลาในการฝึกอบรม คิดเป็นร้อยละ 45.5, 50.0, 54.5 และ 40.9 ตามลำดับ นอกจากนี้ มีความพึงพอใจในระดับมากที่สุด ในประเด็นความเหมาะสมของสถานที่ในการฝึกอบรม, คุณภาพของอาหารกลางวัน อาหารว่าง และการบริการ และภาพรวมของการฝึกอบรม คิดเป็นร้อยละ 47.7, 54.5 และ 50.0 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม ด้านการประเมินภาคบรรยาย

หัวข้อการประเมิน	ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม									
	มากที่สุด		มาก		ปานกลาง		น้อย		น้อยที่สุด	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
1. เนื้อหาของหัวข้อการบรรยาย	20	45.5	22	50.0	2	4.5	0	0.0	0	0.0
2. ระยะเวลาในการบรรยาย	12	27.3	19	43.2	10	22.7	3	6.8	0	0.0
3. วิทยากร										
- มีความรู้ในเนื้อหาที่บรรยาย	25	56.8	19	43.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
- มีความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ ความเข้าใจ	23	52.3	20	45.5	1	2.3	0	0.0	0	0.0
- ตอบคำถามและปัญหาต่างๆ ได้อย่างชัดเจน	18	40.9	23	52.3	3	6.8	0	0.0	0	0.0
- มีความสามารถในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วมในการฝึกอบรม	18	40.9	24	54.5	2	4.5	0	0.0	0	0.0
4. เอกสารประกอบการบรรยาย	17	38.6	21	47.7	6	13.6	0	0.0	0	0.0
5. อุปกรณ์การบรรยาย	19	43.2	22	50.0	2	4.5	1	2.3	0	0.0
6. การนำความรู้ไปใช้งานจริง	18	40.9	23	52.3	3	6.8	0	0.0	0	0.0

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ มีความพึงพอใจในระดับมากในประเด็นเนื้อหาของหัวข้อการบรรยาย, ระยะเวลาในการบรรยาย, วิทยากรตอบคำถามและปัญหาต่างๆ ได้อย่างชัดเจน, วิทยากรมีความสามารถในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วมในการฝึกอบรม, เอกสารประกอบการบรรยาย, อุปกรณ์การบรรยาย และการนำความรู้ไปใช้งานจริง คิดเป็นร้อยละ 50.0, 43.2, 52.3, 54.5, 47.7, 50.0 และ 52.3 ตามลำดับ นอกจากนี้ในประเด็นวิทยากรมีความรู้ในเนื้อหาที่บรรยาย และประเด็นวิทยากรมีความสามารถในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วมในการฝึกอบรม มีความพึงพอใจในระดับมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 56.8 และ 52.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม ด้านการประเมินภาคปฏิบัติ

หัวข้อการประเมิน	ระดับความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม									
	มากที่สุด		มาก		ปานกลาง		น้อย		น้อยที่สุด	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
1. เนื้อหาของหัวข้อการปฏิบัติ	20	45.5	22	50.0	2	4.5	0	0.0	0	0.0
2. ระยะเวลาในการปฏิบัติ	16	36.4	12	27.3	11	25.0	5	11.4	0	0.0
3. วิทยากร										
- มีความรู้ในเนื้อหาที่ปฏิบัติ	26	59.1	16	36.4	2	4.5	0	0.0	0	0.0
- มีความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ ความเข้าใจ	26	59.1	15	34.1	3	6.8	0	0.0	0	0.0
- ตอบคำถามและปัญหาต่างๆ ได้อย่างชัดเจน	27	61.4	15	34.1	2	4.5	0	0.0	0	0.0
- มีความสามารถในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วมในการฝึกอบรม	27	61.4	14	31.8	3	6.8	0	0.0	0	0.0
4. เอกสารประกอบการปฏิบัติ	24	54.5	15	34.1	5	11.4	0	0.0	0	0.0
5. อุปกรณ์การปฏิบัติ	26	59.1	14	31.8	4	9.1	0	0.0	0	0.0
6. การนำความรู้ไปใช้งานจริง	25	56.8	17	38.6	2	4.5	0	0.0	0	0.0

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า ผู้เข้ารับการฝึกอบรมส่วนใหญ่ มีความพึงพอใจในระดับมากที่สุดในระดับระยะเวลาในการปฏิบัติ, วิทยากรมีความรู้ในเนื้อหาที่ปฏิบัติ, วิทยากรมีความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ ความเข้าใจ, วิทยากรตอบคำถามและปัญหาต่างๆ ได้อย่างชัดเจน, วิทยากรมีความสามารถในการทำให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมเกิดความสนใจและมีส่วนร่วมในการฝึกอบรม, เอกสารประกอบการปฏิบัติ, อุปกรณ์การปฏิบัติ และการนำความรู้ไปใช้งานจริง คิดเป็นร้อยละ 36.4, 59.1, 59.1, 61.4, 61.4, 54.5, 59.1 และ 56.8 ตามลำดับ นอกจากนี้ในประเด็นเนื้อหาของหัวข้อการปฏิบัติ มีความพึงพอใจในระดับมาก คิดเป็นร้อยละ 50.0

ข้อเสนอแนะจากผู้เข้าร่วมการอบรม

ข้อเสนอแนะของผู้เข้าร่วมการฝึกอบรมเป็นดังต่อไปนี้

- ขอให้ทางมหาวิทยาลัยแม่โจ้ได้จัดโครงการอบรมเรื่องเกษตรอินทรีย์อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ความรู้แก่กลุ่มฯ องค์กรต่างๆ เพื่อจะได้นำไปเผยแพร่แก่ชุมชนและหมู่บ้านต่อไป
- ควรจะเน้นในกระบวนการผลิต ต้นทุน ค่าขนส่งไปยังตลาด การตลาด
- ควรจะมีการกระจายข่าวเกี่ยวกับความรู้ทางด้านนี้ให้มากขึ้น เพราะถ้าเกษตรกรได้รับความรู้อาจจะปฏิบัติได้ถูกต้องมากกว่าเดิม, ควรจะมีการสาธิตการทำปุ๋ยนอกสถานที่ อาจจะไปตามหมู่บ้านต่างๆ ด้วย
- ควรจะให้นักเรียนตามโรงเรียนต่างๆ, โรงงาน, ร้านอาหาร, หอพัก, เจ้าของตลาด, พระภิกษุ, บ้านจัดสรรฯ, กลุ่มเกษตรกร เข้ารับการอบรม และนำไปปฏิบัติ
- ควรจัดเพิ่มเป็น 2 วัน
- ควรจัดให้มีการอบรมบ่อยๆ เพื่อเผยแพร่ความรู้ให้ประชาชนนำไปใช้ในครัวเรือนของตนเองและญาติๆ
- ควรเพิ่มระยะเวลาการอบรมและเพิ่มด้านทฤษฎีให้มากกว่านี้, ภาคปฏิบัติดูงานให้มีการปฏิบัติทดลองทำของจริงโดยการแบ่งเป็นกลุ่ม
- ควรออกไปจัดอบรมตามหมู่บ้านต่างๆ
- เป็นการอบรมที่มีประโยชน์ ควรจัดอีก
- ให้ความรู้ได้ดี

