

การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน



นางสาวจุฑากานต์ บุญมี

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR LIPID CONTAMINATED
WASTEWATER TREATMENT



Miss Jutakan Boonmee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน

โดย

นางสาว จุฑากานต์ บุญมี

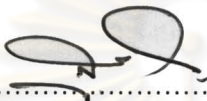
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก


ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ ไขษิตานนท์

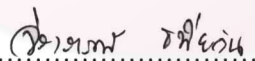
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ ไขษิตานนท์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี จาละ)

จุฬากานต์ บุญมี : การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน.

(CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR LIPID CONTAMINATED WASTEWATER TREATMENT) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. ชาญวิทย์ ไขษิตานนท์, 139 หน้า.

ในปัจจุบันมีการใช้น้ำมันปาล์มเพื่อการบริโภคอย่างแพร่หลาย นอกจากนั้นยังนำน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตอาหารในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆด้วย เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของน้ำมันปาล์มที่ไม่ละลายในน้ำ จึงก่อให้เกิดปัญหาสำคัญในระบบบำบัดน้ำเสียเช่นเกิดการเกาะติดตามท่อระบบบำบัดส่งผลให้การบำบัดน้ำเสียขาดประสิทธิภาพ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสามารถนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันหรือน้ำมันได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการสร้างกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเพื่อนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันปาล์มโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง จากการทดลองพบว่า ยีสต์ 7 สายพันธุ์และแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในขวดเขย่า โดยในจำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 10 สายพันธุ์ *Candida* sp.CBS 10854 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงที่สุดคือ 98.22 เปอร์เซ็นต์และมีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุดคือ 1.639 ± 0.07 ญูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง โดยใช้กลุ่มยีสต์ กลุ่มแบคทีเรีย และจุลินทรีย์กลุ่มผสม ผลการทดลองพบว่า จุลินทรีย์กลุ่มผสมสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลุ่มยีสต์และกลุ่มแบคทีเรีย โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เฉลี่ย 90.50 ± 3.53 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าไลเปสแอกทิวิตีเฉลี่ยเท่ากับ 3.003 ± 0.08 ญูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อศึกษาพลวัตของจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp.CBS 10854, *Candida tropicalis* strain Vaucher และ *Yarrowia lipolytica* แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักที่สามารถอยู่รวมกันได้ในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ผสมและคงอยู่ได้ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง

ภาควิชา.....จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....ลายมือชื่อนิสิต.....จุฬากานต์ บุญมี.....
สาขาวิชา.....จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2552.....

4972254923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : PALM OIL / WASTEWATER TREATMENT / MICROBIAL CONSORTIUM

JUTAKAN BOONMEE : CONSTRUCTION OF MICROBIAL CONSORTIUM FOR
LIPID CONTAMINATED WASTEWATER TREATMENT. THESIS ADVISOR :
ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANON, Ph.D., 139 pp.

Palm oil is one of the most widely consumed edible oils today. Apart from using as cooking oil, palm oil is also used in many processed foods industries. Because of its hydrophobicity, palm oil could cause severe problems in wastewater treatment system for example wastewater pipe clogging. Previous studies found that microorganism that produced extracellular lipase could degrade oil effectively and can be used in wastewater treatment. Thus, the objective of this study was to construct microbial consortium for palm oil degradation in synthetic wastewater using continuous process. Seven yeast isolated strains and three bacteria isolated strains showed high palm oil degradation (%) when incubated into 50 ml. synthetic wastewater medium containing 1% (w/v) palm oil at 30°C and 200 rpm for 72 h. Among these isolated strains, *Candida* sp. CBS 10854 showed the highest palm oil degradation (98.22%) and the highest lipase activity (1.639 ± 0.07 Unit/ml). For the application of oil-containing wastewater treatment, Palm oil degradation by yeast consortium, bacteria consortium and microbial consortium were investigated in continuous cultivation system. The results showed that microbial consortium had the highest palm oil degradation compared to that of yeast consortium and bacteria consortium. The mean of palm oil degradation rate was 90.50 ± 3.53 %. Moreover, microbial consortium had the highest lipase activity as showed in the mean of lipase activity in continuous stirred reactor (3.003 ± 0.08 Unit/ml). In addition, the microbial dynamics of microbial consortium during 168 h in continuous cultivation system were investigated using Denaturing gradient gel electrophoresis technique. The results showed that *Candida* sp. CBS 10854, *Candida tropicalis* strain Vaucher, *Yarrowia lipolytica*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 and *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 were the dominant strains and remained throughout in continuous cultivation system.

Department:.....Microbiology.....Student's signature.....Jutakan Boonmee.....

Field of Study:.....Industrial Microbiology....Advisor's signature.....C. Kositanont.....

Academic Year:.....2009.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน และรองศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี จาละ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี จาละ ที่คอยให้คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุน 90 ปี จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์ สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาวิจัยนี้

ขอขอบคุณคณะบัณฑิตวิทยาลัย สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย รวมทั้งเครื่องมือทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง และห้องวิจัย 406 ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องวิจัย 453 ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง ญาติๆ ทุกคน พี่นง และรุ่นพี่ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ถ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ทัศนวิสัยการมองเห็น.....	4
2.1 ไลเปส.....	4
2.2 ประเภทของเลนส์ไมโครสโคป.....	9
2.3 อิทธิพลที่มีผลต่อการผลิตเลนส์ไมโครสโคปของเชื้อจุลินทรีย์.....	11
2.4 การใช้ประโยชน์จากเลนส์.....	18
2.5 คำจำกัดความของน้ำเสียและองค์ประกอบของน้ำเสีย.....	19
2.6 การบำบัดน้ำเสีย.....	20
2.7 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์.....	21
2.8 กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ.....	22
2.9 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันโดยจุลินทรีย์ผลิตไลเปส.....	23
2.10 ปาล์มน้ำมัน.....	26
2.11 การผลิตปาล์มน้ำมันในประเทศไทย.....	28
2.12 การบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม.....	28
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	31
อุปกรณ์.....	31
เคมีภัณฑ์.....	33
แผนผังของงานวิจัย.....	35

วิธีดำเนินงานวิจัย.....	36
3.1 คัดแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส.....	36
3.1.1 เก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส.....	36
3.1.2 คัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส.....	36
3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้.....	36
3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	36
3.2.2 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis.....	37
3.2.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	38
3.2.3.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....	38
3.2.3.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 5.8S-ITS ของยีสต์.....	38
3.2.3.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย.....	39
3.2.3.4 การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์...	40
3.2.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	41
3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์และไลเปสแอกทิวิตีของยีสต์และแบคทีเรีย ที่คัดเลือกได้.....	41
3.3.1 วิธีการทดสอบไลเปสแอกทิวิตี.....	42
3.3.2 วิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มด้วยวิธี Thin Layer Chromatography – Flame Ionization Detector (TLC-FID).....	43
3.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง.....	44
3.4.1 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม และค่าไลเปสแอกทิวิตีของกลุ่มยีสต์ เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง.....	44
3.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและค่าไลเปสแอกทิวิตีของกลุ่มแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง.....	45

3.4.3	ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและค่าไลเปส	
	แยกทิวติ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง	45
3.5	ศึกษาพลวัตของจุลินทรีย์ (microbial dynamics) ในถังปฏิกรณ์	
	หลังจากเลี้ยงแบบต่อเนื่องจนถึงสภาวะเสถียร (steady state) โดยวิธี	
	Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).....	46
3.5.1	สกัดดีเอ็นเอ.....	46
3.5.2	ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Gel	
	Electrophoresis.....	46
3.5.3	เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส	
	(Polymerase Chain Reaction, PCR).....	46
3.5.3.1	เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ D1 region ของยีสต์.....	46
3.5.3.2	เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของ	
	แบคทีเรีย.....	47
3.5.4	วิเคราะห์สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องด้วย	
	เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	48
4.	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	50
4.1	คัดแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส.....	50
4.1.1	ผลการเก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มี	
	ประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส.....	50
4.1.2	การคัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส	
	อย่างน้อย 50 ไอโซเลท.....	52
4.2	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้.....	55
4.2.1	เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส	
	(Polymerase Chain Reaction, PCR).....	55
4.3	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและไลเปส	
	แยกทิวติ์ของแบคทีเรียและ ยีสต์ที่คัดเลือกได้.....	64
4.3.1	ศึกษาการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ ในอาหาร	
	เหลว น้ำมันปาล์ม.....	64
4.3.2	ทดสอบอัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสีย	

สังเคราะห์และหาค่าไลเปสแอกทิวิตีจากแบคทีเรียและยีสต์ทั้ง 10 สายพันธุ์.....	64
4.3.2.1 การหาค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์.....	65
4.3.2.2 การหาค่าไลเปสแอกทิวิตีในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์คัดเลือก 10 สายพันธุ์.....	71
4.3.2.3 การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อนำมากำหนดอัตราการไหล (Flow rate) ในการบำบัดน้ำเสียในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง.....	76
4.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง.....	77
4.4.1 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยกลุ่มยีสต์ กลุ่มแบคทีเรีย และกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	79
4.4.2 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกลุ่มยีสต์ กลุ่มแบคทีเรีย และกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	82
4.4.3 ค่าไลเปสแอกทิวิตีของกลุ่มยีสต์ กลุ่มแบคทีเรีย และกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	84
4.5 ผลการศึกษาพลวัตของจุลินทรีย์ (microbial dynamics) ในถังปฏิกรณ์หลังจากเลี้ยงแบบต่อเนื่องจนถึงสภาวะเสถียร (steady state) โดยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).....	86
5. สรุปผลการทดลอง.....	93
รายการอ้างอิง.....	95
ภาคผนวก.....	100
ภาคผนวก ก.....	101
ภาคผนวก ข.....	104
ภาคผนวก ค.....	110
ภาคผนวก ง.....	111

ภาคผนวก จ.....	119
ภาคผนวก ฉ.....	126
ภาคผนวก ช.....	129
ภาคผนวก ซ.....	135
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	139



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญัตินำ

ตาราง	หน้า
2.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์บางชนิดที่มีความสามารถในการผลิตไลเปส.....	6
2.2 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์และนำมาใช้ประโยชน์ในระดับ อุตสาหกรรม.....	18
2.3 ลักษณะทั่วไปของน้ำเสีย.....	19
4.1 จำนวนแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำ.....	50
4.2 รัศมีวงใสของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็งไตรบูไทริน.....	52
4.3 สายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้พร้อมแสดงการเกิดบริเวณใสของ จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งไตรบูไทริน.....	59
4.4 ค่า Specific growth rate determination ของจุลินทรีย์คัดเลือก 10 สายพันธุ์.....	76
ง.1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์คัดเลือกทั้ง 10 สายพันธุ์ ในอาหารน้ำเสีย สังเคราะห์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	111
จ.1 ค่าOD ₄₆₀ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส <i>p</i> -nitrophenyl acetate โดยเอนไซม์ ไลเปส ลบด้วย OD ₄₆₀ ของเอนไซม์แบลงค์ เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ใน อาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในขวดเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	119
จ.2 ค่าOD ₄₆₀ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส <i>p</i> -nitrophenyl acetate โดยเอนไซม์ ไลเปส ลบด้วย OD ₄₆₀ ของเอนไซม์แบลงค์ ของกลุ่มยีสต์ เมื่อเลี้ยงกลุ่มยีสต์ ใน อาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหา ค่าไลเปสแอกติวิตี.....	123
จ.3 ค่าOD ₄₆₀ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส <i>p</i> -nitrophenyl acetate โดยเอนไซม์ ไลเปส ลบด้วย OD ₄₆₀ ของเอนไซม์แบลงค์ ของกลุ่มแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงกลุ่ม แบคทีเรียในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัม ต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการ คำนวณหาค่าไลเปสแอกติวิตี.....	124

ตาราง	หน้า
จ.4 ค่า OD_{460} ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส <i>p</i> -nitrophenyl acetate โดยเอนไซม์ไลเปส ลบด้วย OD_{460} ของเอนไซม์แบลนด์ ของจุลินทรีย์กลุ่มผสม เมื่อเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณค่าไลเปสแอกติวิตี.....	125
ฉ.1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อเลี้ยงกลุ่มยีสต์ในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	126
ฉ.2 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	127
ฉ.3 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มผสมในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	128
ช.1 เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มและปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (mg/ml) โดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์.....	129
ช.2 พื้นที่ได้กราฟปริมาณน้ำมันปาล์มเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มและปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (mg/ml) ไป โดยกลุ่มยีสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	132
ช.3 พื้นที่ได้กราฟปริมาณน้ำมันปาล์มเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มและปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (mg/ml) ไป โดยกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง	133
ช.4 พื้นที่ได้กราฟปริมาณน้ำมันปาล์มเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มและปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (mg/ml) ไป โดยจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	134

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของไลเปสที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida</i> sp.	4
2.2 ลักษณะของต้นปาล์มสายพันธุ์ <i>Elaeis guineensis</i> เมื่อโตเต็มที่จะมีการสร้าง ทลาย ปาล์มและมีความยาวของใบประมาณ 8-10 เมตร	27
2.3 ลักษณะของผลปาล์ม (ก) ทลายปาล์ม (ข) ผลปาล์มเดี่ยวเมื่อแยกออกจากทลาย (ค) ภาพตัดขวางของผลปาล์มแสดงส่วนของเนื้อปาล์ม (mesocarp) และเมล็ด ปาล์ม (white kernel).....	27
4.1 ลักษณะของอาหารเหลวน้ำมันปาล์มที่มีอินดิเคเตอร์คือ bromocresol purple (ก) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวอย่างดิน (ข) ตัวอย่างแหล่งดินที่มีการเปลี่ยนสีอินดิเค เตอร์อย่างชัดเจน (ค) ตัวอย่างแหล่งดินที่ไม่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์.....	51
4.2 ลักษณะของอาหารเหลวน้ำมันปาล์มที่มีอินดิเคเตอร์คือ bromocresol purple (ก) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวอย่างน้ำ (ข) ตัวอย่างแหล่งน้ำที่มีการเปลี่ยนสีอินดิเค เตอร์อย่างชัดเจน (ค) ตัวอย่างแหล่งน้ำที่ไม่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์.....	51
4.3 Genomic DNA ของแบคทีเรีย จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: lamda /HinDIII marker ช่องวิ่งที่ 2: แบคทีเรียรหัส T3 ช่องวิ่งที่ 3: แบคทีเรียรหัส V1 ช่องวิ่งที่ 4: แบคทีเรียรหัส V3 ช่องวิ่งที่ 5: Positive control-Genomic DNA ของ <i>E. coli</i> ช่อง วิ่งที่ 6: Negative control.....	56
4.4 Genomic DNA ของยีสต์ จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: lamda /HinDIII marker ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์รหัส C4 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์รหัส C6 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์รหัส C7 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 6: ยีสต์รหัส L11 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์รหัส S4 ช่องวิ่งที่ 8: ยีสต์รหัส Y2 ช่องวิ่งที่ 9: ยีสต์รหัส Y3 ช่องวิ่งที่ 10: ยีสต์รหัส Y4.....	56
4.5 PCR product ของแบคทีเรีย จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2: แบคทีเรียรหัส T3 ช่องวิ่งที่ 3: แบคทีเรียรหัส V1 ช่องวิ่งที่ 4: แบคทีเรียรหัส V3.....	57
4.6 PCR product ของยีสต์ จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์รหัส C4 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์รหัส C6 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์รหัส C7 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 6: ยีสต์รหัส L11 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์รหัส S4 ช่องวิ่งที่ 8:	

รูปที่	หน้า
ยีสต์รหัส Y2 ช่องวุ้นที่ 9: ยีสต์รหัส Y3 ช่องวุ้นที่ 10: ยีสต์รหัส Y4.....	57
4.7 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส C7 (<i>Candida</i> sp.CBS 10854).....	65
4.8 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส L9 (<i>Candida tropicalis</i> strain Vaucher).....	65
4.9 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส L11 (<i>Candida tropicalis</i> strain 131).....	66
4.10 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส S4 (<i>Candida boidinii</i>).....	66
4.11 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส Y2 (<i>Yarrowia lipolytica</i>).....	67
4.12 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส Y3 (<i>Candida albican</i>).....	67
4.13 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส Y4 (<i>Pichai Jadinii</i>).....	68
4.14 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส T3 (<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain E28).....	68
4.15 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส V1 (<i>Pseudomonas</i> sp.).....	69
4.16 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส V3 (<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain A17).....	69
4.17 ค่าไประสอากทวิทิตผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส C7 (<i>Candida</i> sp.CBS 10854).....	71
4.18 ค่าไประสอากทวิทิตผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส L9 (<i>Candida tropicalis</i> strain Vaucher).....	71
4.19 ค่าไประสอากทวิทิตผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส L11 (<i>Candida tropicalis</i> strain 131)..	71
4.20 ค่าไประสอากทวิทิตผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส S4 (<i>Candida boidinii</i>).....	72
4.21 ค่าไประสอากทวิทิตผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส Y2 (<i>Yarrowia lipolytica</i>).....	72
4.22 ค่าไประสอากทวิทิตผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส Y3 (<i>Candida albican</i>).....	72

รูปที่	หน้า
4.23 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดยจุลินทรีย์รหัส Y4 (<i>Pichai Jadinii</i>).....	73
4.24 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส T3 (<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain E28).....	73
4.25 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส V1 (<i>Pseudomonas</i> sp.).....	73
4.26 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส V3 (<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain A17).....	74
4.27 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส <i>p</i> -nitrophenyl acetate เมื่อเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1% (กรัมต่อปริมาตร) (ก) ซับสเตอร์ทแบงค์ (ข) เอนไซม์แบงค์ (ค) ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส <i>p</i> -nitrophenyl acetate ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์.....	74
4.28 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มยีสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	79
4.29 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	79
4.30 เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	80
4.31 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกลุ่มยีสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	82
4.32 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	82
4.33 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม (แบคทีเรียและยีสต์) เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	83
4.34 ค่าไลเปสแอกทิวิตีของกลุ่มยีสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	84
4.35 ค่าไลเปสแอกทิวิตีของกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	84
4.36 ค่าไลเปสแอกทิวิตีของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง.....	85

รูปที่	หน้า
4.37 Genomic DNA ของยีสต์และแบคทีเรีย จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: lamda /HinDIII marker ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์รหัส C7 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์รหัส L11 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์รหัส S4 ช่องวิ่งที่ 6: ยีสต์รหัส Y2 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์ รหัส Y3 ช่องวิ่งที่ 8: ยีสต์รหัส Y4 ช่องวิ่งที่ 9: lamda /HinDIII marker ช่องวิ่งที่ 10: แบคทีเรียรหัส T3 ช่องวิ่งที่ 11: แบคทีเรียรหัส V1 ช่องวิ่งที่ 12: แบคทีเรียรหัส V3.....	87
4.38 PCR product ของแบคทีเรีย จากซ้ายไปขวา 1ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2: แบคทีเรียรหัส T3 ช่องวิ่งที่ 3: แบคทีเรียรหัส V1 ช่องวิ่งที่ 4: แบคทีเรียรหัส V3.....	87
4.39 PCR product ของยีสต์ จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์รหัส C7 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์รหัส L11 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์รหัส S4 ยีสต์ช่องวิ่งที่ 6: รหัส Y2 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์รหัส Y3 ช่องวิ่งที่ 8: ยีสต์รหัส Y4.....	88
4.40 PCR product ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เมื่อใช้ไพรเมอร์ NL1 +GC และ LS2 เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีสต์ เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2-8: PCR product ชั่วโมงที่ 24 48 72 96 120 144 และ 168 ตามลำดับ.....	88
4.41 PCR product ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เมื่อใช้ไพรเมอร์ 338F + GC และ 518R เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอกลุ่มแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2-8: PCR product ชั่วโมงที่ 24 48 72 96 120 144 และ 168 ตามลำดับ.....	89
4.42 DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 30 – 60% denaturant แสดงสายพันธุ์ของยีสต์ในกลุ่มจุลินทรีย์ผสม ช่องวิ่งที่ 1: ยีสต์บริสุทธิ์รหัส C7 ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์บริสุทธิ์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์บริสุทธิ์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์บริสุทธิ์รหัส L11 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์บริสุทธิ์รหัส S4 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์บริสุทธิ์รหัส Y2 ช่องวิ่งที่ 6: ยีสต์บริสุทธิ์รหัส Y3 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์บริสุทธิ์รหัส Y4 ช่องวิ่งที่ 8-14: สายพันธุ์ของยีสต์ในกลุ่มจุลินทรีย์ผสมในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง ชั่วโมงที่ 24 48 72 96 120 144 และ 168 ตามลำดับ.....	89

รูปที่	หน้า
4.43 DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 30 – 70% denaturant แสดงสายพันธุ์ของ แบคทีเรียในกลุ่มจุลินทรีย์ผสม ช่องวิ่งที่ 1: แบคทีเรียบริสุทธิ์รหัส T3 ช่องวิ่งที่ 2: แบคทีเรียบริสุทธิ์รหัส V3 ช่องวิ่งที่ 3: แบคทีเรียบริสุทธิ์รหัส V1 ช่องวิ่งที่ 4-10: สายพันธุ์ของแบคทีเรียในกลุ่มจุลินทรีย์ผสมในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องชั่วโมงที่ 24 48 72 96 120 144 และ 168 ตามลำดับ.....	90
ค.1 กราฟมาตรฐานปริมาณน้ำมันปาล์ม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)ต่อพื้นที่ได้กราฟ จาก การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง TLC-FID.....	110
ค.2 กราฟมาตรฐาน พารา-ไนโตรฟินอล.....	110
ง.1 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส C7 (<i>Candida sp.</i> CBS 10854).....	114
ง.2 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส L9 (<i>Candida tropicalis</i> strain Vaucher).....	114
ง.3 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส L11 (<i>Candida tropicalis</i> strain 131).....	115
ง.4 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส S4 (<i>Candida boidinii</i>).....	115
ง.5 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส Y2 (<i>Yarrowia lipolytica</i>).....	116
ง.6 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส Y3 (<i>Candida albican</i>).....	116
ง.7 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส Y4 (<i>Pichai Jadinii</i>).....	117
ง.8 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส T3 (<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain E28).....	117
ง.9 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส V1 (<i>Pseudomonas sp.</i>).....	118
ง.10 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส V3 (<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain A17).....	118

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 260 นาโนเมตร

A_{280} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 280 นาโนเมตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

น้ำเสียชุมชน (Community wastewater) เป็นน้ำที่ใช้แล้วจากชุมชนประกอบด้วยน้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน ร้านอาหารภัตตาคาร และสถานที่ทำการต่างๆ ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น น้ำจากการทำความสะอาด การซักล้าง การประกอบอาหาร ซึ่งจะไหลรวมเข้าสู่ท่อระบายน้ำ องค์ประกอบของน้ำเสียพบว่าประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ถึง 95 - 99 เปอร์เซ็นต์ และของแข็งที่แขวนลอย 1- 5 เปอร์เซ็นต์ (Preetha และ Kumar, 2007) องค์ประกอบของน้ำเสียที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษส่วนใหญ่มาจากสารอินทรีย์ ซึ่งแบ่งออกได้เป็นกลุ่มหลักๆ คือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน นอกจากน้ำเสียชุมชนแล้ว ไขมันยังจัดเป็นสารอินทรีย์กลุ่มหลักที่พบได้ในน้ำเสียที่ปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหาร อุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น โดยโรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจะใช้น้ำในปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไป ซึ่งน้ำเสียที่มีไขมันหรือน้ำมันปนเปื้อนในสัดส่วนมากจะส่งผลกระทบต่อระบบการบำบัดน้ำเสีย (Chipasa และ Medrzycka, 2007 : online) เนื่องจากลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมันจัดอยู่ในกลุ่มไม่ละลายน้ำ (Hydrophobic organic compounds) ดังนั้นมักจะพบปัญหาการเกาะติดของไขมันบริเวณท่อของระบบบำบัดน้ำเสีย (Matsumiya และคณะ, 2007) ซึ่งจะขัดขวางการไหลเวียนของน้ำเสีย ส่งผลให้ระบบการบำบัดน้ำเสียขาดประสิทธิภาพ และน้ำทิ้งจากโรงงานที่ไหลลงสู่แม่น้ำลำคลองหากยังมีการปนเปื้อนของไขมันหรือน้ำมันอยู่ จะมีการสะสมของคราบน้ำมันลอยเป็นฝ้าทำให้ก๊าซออกซิเจนในอากาศไม่สามารถจะละลายลงไปในน้ำได้ ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำทั้งพืชและสัตว์ เนื่องจากขาดก๊าซออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ในการหายใจ (Wiyada Mongkolthanaruk และ Saovane Dharmsthiti, 2002)

แต่เดิมวิธีการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันและน้ำมันนั้นจะนิยมใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้ถังดักไขมันและมีการอัดอากาศเข้าไปเพื่อให้เกิดการลอยตัวของไขมันและน้ำมันและทำการดักไขมันที่ลอยขึ้นแยกออกจากชั้นน้ำออกไป หรืออาจใช้วิธีทางเคมี เช่น การใช้สารเคมีทำให้ไขมันและน้ำมันแตกตัว (Chemical dispersant) โดยการเติมสารเคมีที่มีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวเพื่อทำให้ไขมันและน้ำมันแตกกระจายออกไป (Mielbrecht และคณะ, 2005) หรือการใช้สารเคมีทำให้ไขมันและน้ำมันรวมตัวกัน (Chemical solidifier) จะส่งผลทำให้คุณสมบัติทาง

กายภาพและคุณสมบัติทางเคมีเปลี่ยนแปลงไปทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนจมลงสู่ก้นบ่อ บำบัด (Delaune และคณะ, 1999) ซึ่งข้อเสียของทั้ง 2 วิธี นี้ คือการกำจัดไขมันและน้ำมันโดยวิธีทางกายภาพ จะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในด้านของอุปกรณ์และค่าใช้จ่ายในการกำจัดไขมัน หลังจากที่ได้ตักออกมาและการใช้ถังดักไขมันมักจะส่งกลิ่นเหม็น ส่วนการกำจัดโดยวิธีทางเคมีนั้น จะต้องใช้สารเคมีในปริมาณมากซึ่งทำให้ค่าใช้จ่ายส่วนนี้สูง อีกทั้งการกำจัดด้วยวิธีนี้จะเป็นวิธีที่รุนแรงซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อระบบบำบัดน้ำเสียและสิ่งแวดล้อมได้ (Matsumiya และคณะ, 2007)

ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาระบบการบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนไขมันและน้ำมันด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยมีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับ 2 วิธีแรก คือ สามารถกำจัดไขมันได้โดยตรงโดยไม่ต้องตักออกเหมือนการกำจัดด้วยวิธีทางกายภาพ ไม่ใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรงและไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในด้านสารเคมีเหมือนวิธีทางเคมี การกำจัดไขมันและน้ำมันด้วยวิธีทางชีวภาพจะอาศัยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ (Dalmau และคณะ, 2000) โดยพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้หลากหลายที่ เช่น ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ผลิตน้ำมันพืช อุตสาหกรรมผลิตนม ดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน กองปุ๋ย บ่อน้ำพุร้อน เป็นต้น (Sharma และคณะ, 2001) โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตไลเปส หรือ (Triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) เอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) ไปเป็นกลีเซอรอล (Glycerols) และกรดไขมันอิสระ (Free fatty - acids) (Kamini และคณะ, 2000) และปฏิกิริยาของไลเปสจะเกิดขึ้นบริเวณผิวระหว่างส่วนของไขมันและน้ำ (Lipid - Water interface) โดยอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นกับจำนวนโมเลกุลของไขมันที่ถูกดูดซับและพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับไขมัน (พัชรวิภา ใจจักรคำ, 2545) เมื่อเกิดการย่อยสลายไขมันแล้วจะมีการเปลี่ยนรูปกลีเซอรอลไปเป็นสารประกอบที่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ผ่านทางผนังเซลล์ได้ (Rapp และ Backhaus, 1992) และพบว่ามียีสต์กลุ่มจุลินทรีย์จำนวนมากสามารถนำกรดไขมันอิสระไปใช้ได้โดยเปลี่ยนรูปไปเป็นอะเซทิล-โคเอ (Acetyl - CoA) ผ่านทางวิถีเบต้า - ออกซิเดชัน (Beta - oxidation pathway) และสุดท้ายจะถูกนำไปใช้ผ่านทาง TCA cycle (Matsumiya และคณะ, 2007)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่สามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ โดยจากงานวิจัยภายนอกประเทศพบว่า จะให้ความสนใจในการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันต่าง

ชนิดกันออกไปขึ้นอยู่กับลักษณะปัญหาที่พบ เช่น ประเทศในแถบยุโรปจะนิยมบริโภคน้ำมันมะกอก ดังนั้นมักพบน้ำมันมะกอกเป็นปัญหาหลักปนเปื้อนในน้ำเสีย ส่งผลให้งานวิจัยที่ผ่านมาจึงมุ่งเน้นในการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันมะกอก ในส่วนของประเทศไทยนั้นพบว่างานวิจัยที่ศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันและน้ำมัน โดยวิธีทางชีวภาพนั้นยังมีน้อย และพบว่าน้ำมันที่เป็นปัญหาหลักในการปนเปื้อนในระบบบำบัดน้ำเสียทั้งจากน้ำเสียชุมชนและน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมคือน้ำมันปาล์ม เนื่องจากเป็นน้ำมันหลักที่ถูกนำมาใช้ภายในประเทศอย่างแพร่หลาย โดยนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการบริโภคโดยตรง รวมทั้งอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมผลิตสบู่ เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกแบคทีเรียและยีสต์จากแหล่งต่างๆ ภายในประเทศไทย เพื่อสร้างกลุ่มจุลินทรีย์ (microbial consortium) เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน โดยมุ่งเน้นไปในการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

สร้างกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมที่มีความสามารถในการผลิตไลเปส และมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อประยุกต์ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมนี้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันต่อไปได้

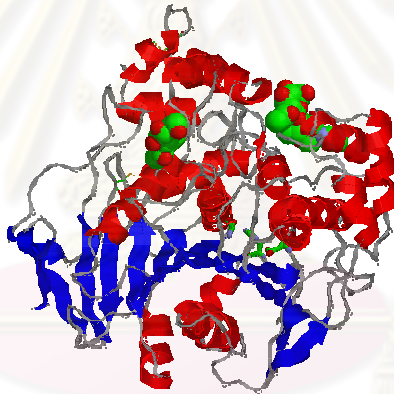
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปรีทรรศน์วรรณกรรม

2.1 ไลเปส

ไลเปสมีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า “Triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3” ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไตรกลีเซอไรด์ ไปเป็น กลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ ซึ่งการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสจะเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าระหว่างส่วนของไขมันและน้ำ (oil-water interface) (Dong-woo และคณะ,1999)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไลเปสที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida sp.*
(AU-KBC research center, 2008 : online)

แหล่งของไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบอยู่ทั่วไปหลากหลายไม่เพียงแต่ในสัตว์และพืชเท่านั้น แต่ยังคงพบได้ในจุลินทรีย์ ทั้งในกลุ่มรา ยีสต์ แบคทีเรีย และแอกติโนมัยซีต (Rapp และ Backhaus,1992) ในสัตว์จะพบไลเปสได้ในตับอ่อน (pancreatic lipase) และในน้ำนม (milk lipase) (พัชระวิภา ,2545) ส่วนในพืชจะพบไลเปสได้ในเนื้อเยื่อที่มีการสะสมพลังงาน เช่นในเมล็ดพืชที่กำลังงอก เช่นเมล็ดข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวเรย์ ฝ้าย เป็นต้น (Wu Lan และคณะ,2009) จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสพบ

ได้ทั่วไป เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะ อุตสาหกรรมผลิตน้ำมันพืช อุตสาหกรรมผลิตนม นอกจากนี้ยังพบได้ในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน กองปุ๋ย บ่อน้ำพุร้อน และเมล็ดพืชที่มีการผลิตน้ำมัน เป็นต้น

ในระยะเวลาที่ผ่านมาพบงานวิจัยส่วนมากจะมุ่งเน้นไปที่เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มากกว่าจากพืชและสัตว์และพบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เท่านั้นที่ถูกนำมาผลิตทางการค้าและมีความสำคัญอย่างมากในด้านอุตสาหกรรมในหลายๆด้าน โดยข้อได้เปรียบของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์คือ ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีความเสถียรค่อนข้างสูงกว่าไลเปสที่ได้จากพืชและสัตว์ และจุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งมีการผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูง นอกจากนี้ขั้นตอนในการเลี้ยงไม่ยุ่งยากและใช้พื้นที่น้อย รวมทั้งง่ายต่อการควบคุมจัดการและพัฒนาสายพันธุ์ให้ดีขึ้นได้ (พัชระวิภา, 2545)

Sztajer และ คณะ (1988) พบว่ากว่า 160 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ประกอบไปด้วย รา แบคทีเรีย และ แอคติโนไมซีต สามารถผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์ได้ โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตไลเปสโดยใช้อาหารแข็งไตรนูไทริน *Streptomyces* sp. *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. มีแอกทิวิตีของไลเปสดีที่สุด และพบว่าไตรนูไทรินและน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดที่มีผลต่อการชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์ เช่นเดียวกับ Rapp และ Backhaus (1992) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์โดยใช้อาหารไตรนูไทรินเป็นอาหารทดสอบ พบว่าส่วนมากราที่สามารถผลิตไลเปสได้นั้นจะเป็นสายพันธุ์ *Rhizopus* sp. เช่น *R. circinans* , *R. microspores* เป็นต้น และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas cepacia* จะผลิตไลเปสออกมาได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน

Ching T. Hou (1997) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสโดยใช้วิธีการดูบริเวณไฮไลต์ที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งพื้นฐาน จากจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ 1229 สายพันธุ์ พบว่าประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมดสามารถผลิตไลเปสได้

Ana และคณะ (1997) คัดแยกยีสต์และราที่มีความสามารถผลิตไลเปส โดยใช้อาหารพื้นฐานที่มีการเติม CaCl_2 และ Tween80 ลงไปเพื่อส่งเสริมการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ โดย

ทดสอบการเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่มของยีสต์คือ *Candida lipolytica* CPhI-50 และ *Hansenula anomala* CPhI-23 และในกลุ่มของราคือ *Rhizopus nigricans* CPhI-RN-50 , *Aspergillus oryzae* CPhI-20-9 และ *Aspergillus niger* CPhI-8-N-9 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างไลเปสออกมานอกเซลล์ได้มากที่สุด และเมื่อนำแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว GYP พบว่า *Candida lipolytica* CPhI-50 และ *Aspergillus oryzae* CPhI-20-9 สามารถผลิตไลเปสออกมาได้สูงส่ง

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์บางชนิดที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Sharma และคณะ, 2001)

Source	Genus	Species	Reference(s)
Bacteria (Gram-positive)	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>	Godtfredsen, 1990
		<i>B. cereus</i>	El-Shafei and Rezkallah, 1997
		<i>B. stearothermophilus</i>	Gowland et al., 1987; Kim et al., 1998
		<i>B. subtilis</i>	Kennedy and Rennarz, 1979
		Recombinant <i>B. subtilis</i> 168	Lesuisse et al., 1993
		<i>B. brevis</i>	Hou, 1994
		<i>B. thermocatenulatus</i>	Rua et al., 1998
		<i>Bacillus</i> sp. IHI-91	Becker et al., 1997
		<i>Bacillus</i> strain WAI 28A5	Janssen et al., 1994
		<i>Bacillus</i> sp.	Helisto and Korpela, 1998
		<i>B. coagulans</i>	El-Shafei and Rezkallah, 1997
		<i>B. acidocaldarius</i>	Manco et al., 1998
		<i>Bacillus</i> sp. RS-12	Sidhu et al., 1998a,b
		<i>B. thermoleovorans</i> ID-1	Lee et al., 1999
		<i>Bacillus</i> sp. J 33	Nawani and Kaur, 2000
		<i>Staphylococcus</i>	<i>S. canosus</i>
	<i>S. aureus</i>		Lee and Yandolo, 1986
	<i>S. hyicus</i>		Van Oort et al., 1989; Meens et al., 1997; van Kampen et al., 1998
	<i>S. epidermidis</i>		Farrell et al., 1993; Simons et al., 1998
	<i>S. warneri</i>		Talon et al., 1995
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus delbrückii</i> sub sp. <i>bulgaricus</i>	El-Sawah et al., 1995
		<i>Lactobacillus</i> sp.	Meyers et al., 1996
	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	Sztajer et al., 1988
	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus freudenreichii</i>	Hou, 1994
		<i>M. luteus</i>	Hou, 1994
	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acne</i>	Sztajer et al., 1988
		<i>Pr. granulosum</i>	Sztajer et al., 1988
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	Yeo et al., 1998	
	<i>Bu. glumae</i>	El Khattabi et al., 2000	
Bacteria (Gram-negative)	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Aoyama et al., 1988; Hou, 1994; Ito et al., 2001
		<i>P. fragi</i>	Mencher and Alford, 1967
		<i>P. mendocina</i>	Jaeger and Reetz, 1998
		<i>P. putida</i> 3SK	Lee and Rhee, 1993
		<i>P. glumae</i>	Frenken et al., 1993; Noble et al., 1994
		<i>P. cepacia</i>	Penereac'h and Baratti, 1996; Lang et al., 1998; Hsu et al., 2000

Source	Genus	Species	Reference(s)
		<i>P. fluorescens</i>	Maragoni, 1994; Lacointe et al., 1996
		<i>P. aeruginosa</i> KKA-5	Sharon et al., 1998
		<i>P. pseudoalcaligenes</i> F-111	Lin et al., 1995, 1996
		<i>Pseudomonas</i> sp.	Sin et al., 1998; Miyazawa et al., 1998; Reetz and Jaeger, 1998; Dong et al., 1999
		<i>P. fluorescens</i> MF0	Guillou et al., 1995
		<i>Pseudomonas</i> sp. KWI56	Yang et al., 2000
	<i>Chromobacterium</i>	<i>Ch. viscosum</i>	Rees and Robinson, 1995; Helisto and Korpela, 1998; Jaeger and Reetz, 1998; Diogo et al., 1999
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Ac. pseudoalcaligenes</i>	Sztajer et al., 1988
		<i>Ac. radioresistens</i>	Chen et al., 1999
	<i>Aeromonas</i>	<i>Ae. hydrophila</i>	Anguita et al., 1993
		<i>Ae. sorbia</i> LP004	Lotrakul and Dharmsthit, 1997
Fungi	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizop. delemar</i>	Klein et al., 1997; Espinosa et al., 1990; Haas et al., 1992; Lacointe, et al., 1996
		<i>Rhizop. oryzae</i>	Salleh et al., 1993; Coenen et al., 1997; Beer et al., 1998; Essamri et al., 1998; Takahashi et al., 1998; Hiol et al., 2000
		<i>Rhizop. arrhizus</i>	Sztajer and Maliszewska, 1989; Elibol and Ozer, 2001
		<i>Rhizop. nigricans</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Rhizop. nodosus</i>	Nakashima et al., 1988
		<i>Rhizop. microsporous</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Rhizop. chinensis</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Rhizop. japonicus</i>	Nakashima et al., 1988
		<i>Rhizop. niveus</i>	Kohno et al., 1994, 1999
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	Long et al., 1996, 1998
		<i>A. niger</i>	Chen et al., 1995
		<i>A. japonicus</i>	Satyanarayan and Johri, 1981
		<i>A. awamori</i>	Satyanarayan and Johri, 1981
		<i>A. fumigatus</i>	Satyanarayan and Johri, 1981
		<i>A. oryzae</i>	Ohnishi et al., 1994a,b
		<i>A. carneus</i>	Helisto and Korpela, 1998
		<i>A. repens</i>	Kaminishi et al., 1999
		<i>A. nidulans</i>	Mayordomo et al., 2000

Source	Genus	Species	Reference(s)
	<i>Penicillium</i>	<i>Pe. cyclopium</i>	Chahinian et al., 2000
		<i>Pe. citrinum</i>	Sztajer and Maliszewska, 1989
		<i>Pe. roqueforti</i>	Petrovic et al., 1990
		<i>Pe. fusiculosum</i>	Hou, 1994
		<i>Penicillium</i> sp.	Helisto and Korpela, 1998
		<i>Pe. camambertii</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Pe. wortmanii</i>	Costa and Peralta, 1999
	<i>Mucor</i>	<i>Mucor miehei</i>	Rantakyla et al., 1996; Lacointe et al., 1996; Plou et al., 1998
		<i>Mu. javanicus</i>	Ishihara et al., 1975
		<i>Mu. circinelloides</i>	Balcão et al., 1998
		<i>Mu. hiemalis</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Mu. racemosus</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>Ashbya</i>	<i>Ashbya gossypii</i>	Stahmann et al., 1997
	<i>Geotrichum</i>	<i>G. candidum</i>	Sugihara et al., 1991; Ghosh et al., 1996
		<i>Geotrichum</i> sp.	Macedo et al., 1997
	<i>Beauveria</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Hegedus and Khachatourians, 1988
	<i>Humicola</i>	<i>H. lanuginosa</i>	Ghosh et al., 1996; Takahashi et al., 1998; Plou et al., 1998; Zhu et al., 2001
	<i>Rhizomucor</i>	<i>R. miehei</i>	Merek and Bednasski, 1996; Weber et al., 1999; Jaeger and Reetz, 1998; Dellamora-Ortiz et al., 1997
	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Rapp, 1995
		<i>F. heterosporum</i>	Takahashi et al., 1998
	<i>Acremonium</i>	<i>Ac. strictum</i>	Okeke and Okolo, 1990
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	Berto et al., 1997
	<i>Eurotium</i>	<i>Eu. herbanorium</i>	Kaminishi et al., 1999
	<i>Ophiostoma</i>	<i>O. piliferum</i>	Brush et al., 1999
Yeasts	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>	Wang et al., 1995; Frense et al., 1996; Yee et al., 1995; Brocca et al., 1998; Xie et al., 1998
		<i>C. tropicalis</i>	Takahashi et al., 1998
		<i>C. antarctica</i>	Weber et al., 1999; Jaeger and Reetz, 1998; Arroyo et al., 1999
		<i>C. cylindracea</i>	Kamiya and Gotto, 1998; Helisto and Korpela, 1998
		<i>C. parapsilosis</i>	Lacointe et al., 1996
		<i>C. deformans</i>	Lacointe et al., 1996

Source	Genus	Species	Reference(s)
		<i>C. curvata</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>C. valida</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Merek and Bednasski, 1996; Pignede et al., 2000
	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rho. glutinis</i>	Papaparaskevas et al., 1992
		<i>Rho. pilimornae</i>	Tahoun et al., 1985
	<i>Pichia</i>	<i>Pi. bispora</i>	Hou, 1994
		<i>Pi. maxicana</i>	Hou, 1994
		<i>Pi. sivicola</i>	Sugihara et al., 1995
		<i>Pi. xylosa</i>	Sugihara et al., 1995
		<i>Pi. burtonii</i>	Sugihara et al., 1995
	<i>Saccharomyces</i>	<i>Sa. lipolytica</i>	Tahoun et al., 1985
		<i>Sa. crataegensis</i>	Hou, 1994
	<i>Torulospira</i>	<i>Torulospira globora</i>	Hou, 1994
	<i>Trichosporon</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>	Dharmstithi and Ammananond, 1997
Actinomycetes	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces fradiae</i> NCIB 8233	Sztajer et al., 1988
		<i>Streptomyces</i> sp. PCB27	Sztajer et al., 1988
		<i>Streptomyces</i> sp. CCM 33	Sztajer et al., 1988
		<i>Str. coelicolor</i>	Hou, 1994
		<i>Str. cinnamomeus</i>	Sommer et al., 1997

2.2 ประเภทของเอนไซม์ไลเปส

2.2.1 การแบ่งโดยอาศัยความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุล สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ

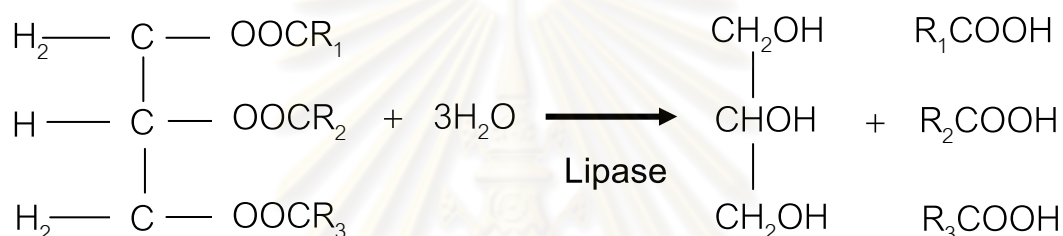
2.2.1.1 เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ทำให้สามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอล (glycerols) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) แต่ในบางครั้งอาจจะพบ ไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) และ โมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ที่ได้มาจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

2.2.1.2 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ 1,2 (2,3) – diglycerides และ 2-monoglyceride แต่ผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 นี้จะเป็นสารไม่คงตัวถ้ามีการบ่มไว้นานพอจะมีการเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3- diglyceride และ 1(3) – monoglyceride ซึ่งจะถูกละลายได้

อย่างสมบูรณ์เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ต่อไป ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ที่ได้มาจาก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และ *Rizopus sp.* อีกหลายชนิด

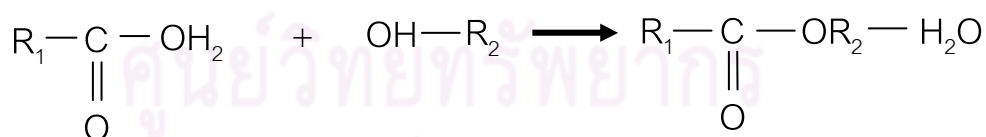
2.2.2 การแบ่งโดยอาศัยรูปแบบในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

2.2.2.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ปฏิกิริยานี้ต้องการน้ำในการทำปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลาย ไตรกลีเซอไรด์คือกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ



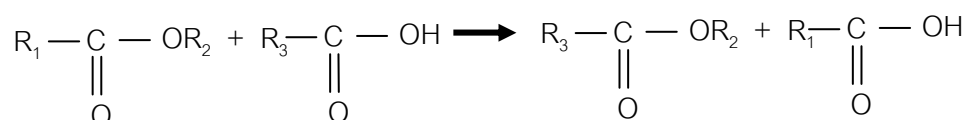
(Options for smallholder milk processing in sub-Saharan Africa, 2008 : online)

2.2.2.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส คือการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมัน ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ ไตรกลีเซอไรด์

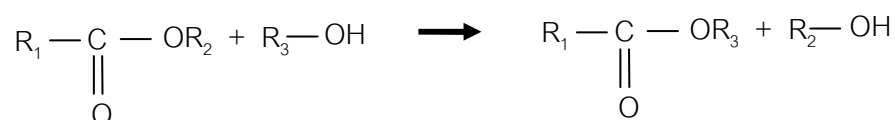


2.2.2.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) เป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนหมู่จากสารหนึ่งไปยังสารหนึ่งซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกัน เช่นการย้ายกรดไขมันระหว่างโมโนเอสเทอร์ การแลกเปลี่ยนหมู่ของแอลกอฮอล์ในกรดไขมันเอสเทอร์ ซึ่งจะเกิดขึ้นใน 4 รูปแบบคือ

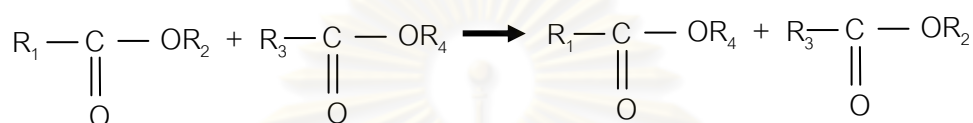
2.2.2.3.1 Acidolysis



2.2.2.3.2 Alcoholysis



2.2.2.3.3 Ester exchange (interesterification)



2.2.2.3.4 Aminolysis



(Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry, 2008 : online)

2.3 อิทธิพลที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ส่วนมากจะได้มาจากการเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) หรือมีการเลี้ยงแบบ solid state fermentation ในบางครั้งมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ (immobilized cell) แต่งานวิจัยและการศึกษาโดยส่วนใหญ่จะอยู่ภายใต้การอธิบายสถานะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงและความต้องการสารอาหารของจุลินทรีย์สำหรับการผลิตไลเปสในสภาวะการเลี้ยงในอาหารเหลว การผลิตเอนไซม์ไลเปสจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ พีเอชที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของออกซิเจน (dissolved oxygen) ในกรณีของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ

2.3.1 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ส่วนต่างๆของเซลล์

และจัดเป็นแหล่งพลังงานแหล่งใหญ่ที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไร้อากาศ จะต้องการแหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในกระบวนการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ในกระบวนการสังเคราะห์เซลล์ (พัชรวิภา ใจจักรคำ, 2545) การศึกษาการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น กลูโคส ฟรุกโตส แป้ง และโดยเฉพาะน้ำมันและไขมันต่างๆที่ได้จากพืชและสัตว์ สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อส่งเสริมให้มีการผลิตไลเปสในปริมาณที่สูงขึ้น จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาความสำคัญของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตไลเปส เช่น

Dalmau และคณะ (2000) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่างๆต่อการผลิตไลเปสโดยยีสต์ *Candida rugosa* รายงานว่า ถ้าใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต เช่น อะราบิโนส (Arabinose) ไซโลส (Xylase) หรือกรด เช่น โอซาลิก แอซิด (Oxalic acid) เป็นแหล่งคาร์บอน จะช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ แต่ไม่ส่งผลให้ค่าการผลิตไลเปสสูงขึ้น ส่วน ปาล์มมิติก แอซิด (Palmitic acid) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดโดยชักนำให้ยีสต์ *Candida rugosa* ผลิตไลเปสออกมาสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมปาล์มมิติก แอซิด และส่งผลให้ค่าไลเปสแอกทิวิตีเพิ่มขึ้นจากเดิมถึง 10 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ Tween80 เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวจะส่งผลให้ค่าไลเปสแอกทิวิตีลดลง แต่หากใช้อาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นร่วมกับการเติม Tween80 ลงไปจะส่งผลให้ค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ยีสต์ *Candida rugosa* ไม่ได้นำ Tween80 มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรงในการผลิตไลเปสแต่ Tween80 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactants) จะช่วยเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านไขมันเข้าสู่เซลล์ และจะมีผลโดยตรงต่อปริมาณการผลิตไลเปส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brozzoli และคณะ (2009) ที่พบว่า Tween80 และ Tween20 ไม่เหมาะสมนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งเดียวในการเลี้ยง *Candida rugosa* เพื่อผลิตไลเปส

Tianwei และคณะ (2003) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากยีสต์ *Candida* sp. 99-125 สายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถนำไขมันและน้ำมันตามธรรมชาติมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง โดยที่น้ำมันที่ได้จากพืช เช่น น้ำมันงา หรือ น้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งประกอบไปด้วยกรดไขมัน โอลิสิก แอซิด (Oleic acid) และ ลิโนลิคิก แอซิด

(Linoleic acid) จะเป็นน้ำมันที่เหมาะสมต่อการชักนำให้มีการผลิตไลเปสได้สูง ในขณะที่ไขมันที่ได้จากสัตว์ เช่น ไขมันจากแกะ จะไปยับยั้งการผลิตไลเปสจากยีสต์ *Candida* sp. 99-125

Alessandro และคณะ (2006) พบว่าน้ำเสียจากการบดมะกอก (olive-mill wastewater) สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเปสได้ โดยยีสต์สายพันธุ์ *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 มีไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุด เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียจากการบดมะกอก นอกจากนั้นยังมีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงถึง 9.23 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เมื่อมีการเติมน้ำมันมะกอก (3 กรัมต่อลิตร) เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมและเติม NH_4Cl (2.4 กรัมต่อลิตร) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริม ลงในน้ำเสียจากการบดมะกอก

Shah และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งไอออนโลหะต่อการผลิตไลเปสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในส่วนของแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์ได้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันละหุ่ง น้ำมันถั่วลิสง และไตรบูไทริน โดยที่เมื่อใช้น้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน จะส่งผลให้มีการผลิตไลเปสออกมาได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนแหล่งอื่น

2.3.2 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นอะตอมที่มีทั้งในโปรตีนและกรดนิวคลีอิก โปรตีนเป็นโมเลกุลที่ประกอบเป็นโครงสร้างของเซลล์ หรือเอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ กรดนิวคลีอิกเป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ โดยจุลินทรีย์จะนำไนโตรเจนไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน ซึ่งเซลล์จุลินทรีย์จะมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แหล่งของไนโตรเจนมีแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่คือ ไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์และไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ ไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ ได้แก่ เปปโติน ทริปโติน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อ เป็นต้น ไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แอมโมเนียมคลอไรด์ $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับจุลินทรีย์ได้อีกด้วย เช่น กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง น้ำแช่ข้าวโพด เป็นต้น

Odibo และคณะ (1995) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์ของรา *Hendersonula toruloidea* เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ คือ 1 เบอร์เซนต์ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรต เปปโตน ทริปโตน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากมอลต์ ถั่วเหลืองบด ถั่วฝักยาวบด ปลาบด เลือดวัวผง ผลแตงบด พบว่าทุกแหล่งไนโตรเจนสามารถส่งเสริมให้มีการผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์ โดยที่แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือแอมโมเนียมซัลเฟต และแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมให้มีการผลิตไลเปสออกมาได้น้อยที่สุดคือ ถั่วฝักยาวบด

Tianwei และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลเปสจากยีสต์ *Candida* sp. 99-125 พบว่า แหล่งไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ มีส่วนสำคัญต่อกระบวนการผลิตไลเปส โดยไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ คือ ถั่วเหลืองบดและเคซีน จะส่งเสริมให้มีการผลิตไลเปสได้ดีที่สุดโดยเฉพาะถั่วเหลืองบด เนื่องจากถั่วเหลืองมีองค์ประกอบของน้ำมันอยู่ในเมล็ดถั่วซึ่งน้ำมันจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ช่วยชักนำให้มีการผลิตไลเปสได้เพิ่มขึ้น ในส่วนของไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยชักนำให้ยีสต์ *Candida* sp. 99-125 ผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์ และส่งผลให้ค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงขึ้นมากกว่า 3 เท่าจากการเลี้ยงด้วยอาหารปกติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shah และคณะ (2006) ที่ทำการศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน ต่อการผลิตไลเปสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ *Bacillus* sp. ผลิตไลเปสออกมาได้มากที่สุด ส่วนแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ที่ดีที่สุดที่ได้ทำการศึกษาคือสารสกัดจากยีสต์

Namita และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia multivorans* สายพันธุ์ใหม่ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยพบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงกว่าการใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ประมาณ 2.5 เท่า

2.3.3 อิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิ

พีเอชและอุณหภูมิมิมีผลโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนั้นพีเอชและอุณหภูมียังมีผลโดยตรงต่อกระบวนการทำงานของและเสถียรภาพของเอนไซม์ด้วย ในส่วนของพีเอช จุลินทรีย์บางชนิดจะเจริญได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชต่ำ (acidophiles) จุลินทรีย์บางชนิดเจริญได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชเป็นกลาง หรือพีเอชประมาณ 7.0 (neutrophiles) และจุลินทรีย์บางชนิดจะเจริญได้ดีในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นเบส (alkalophiles) เมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเป็นเวลานานๆ จะทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเปลี่ยนไป เนื่องมาจากจุลินทรีย์เติบโตมากจะปล่อยสารบางอย่างออกมา อาจเป็นกรดหรือเบส จึงทำให้พีเอชเปลี่ยนแปลงไปอย่างมากและไปขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นในการเตรียมอาหาร จึงต้องใส่สารบางอย่างทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งเป็นสารต้านทานการเปลี่ยนพีเอช ตัวอย่างสารที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ คือ KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 นงลักษณ์และปรีชา(2547)

ในส่วนของอุณหภูมิ พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกันออกไป จุลินทรีย์บางชนิดเจริญได้ดีในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (psychophiles) บางชนิดเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 25 - 45 องศาเซลเซียส (mesophiles) และจุลินทรีย์บางชนิดเจริญได้ดีในอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (thermophiles) อุณหภูมิที่นำมาใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดและอุณหภูมินั้นถือเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆภายในเซลล์ให้ดำเนินต่อไปได้โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆที่ถูกผลิตขึ้นจากเซลล์

จรัส ชื่นสกุล (2547) ได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* พบว่าเชื้อจะมีการสร้างเอนไซม์ไลเปสเมื่อเข้าสู่ช่วง Stationary phase และเมื่อเปรียบเทียบค่า lipase activity ที่ได้จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

Tianwei และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการผลิตไลเปสจากยีสต์ *Candida* sp. 99 -125 พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสอยู่ในช่วง 5.8 - 7.0 และความเสถียรภาพของไลเปสคงอยู่ที่ช่วงอุณหภูมิ 28 - 40 องศาเซลเซียส

Lelie และคณะ (2005) คัดแยกและศึกษาสมบัติของไลเปสทนร้อน (thermoalkalophilic lipase) ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* CCR 11 โดยในส่วนของพีเอชพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้จะมีการผลิตไลเปสออกมาได้มากที่สุดที่พีเอช 9 -10 ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *Bacillus* sp. ผลิตไลเปสทนร้อน ได้ดีในช่วงพีเอช 7.2 - 8.5 ในส่วนของอุณหภูมิพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตไลเปสทนร้อนของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คือ 60 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่าที่อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส ไลเปสแอกทิวิตียังคงมีอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียส แอกทิวิตีลดลงเหลือ 75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส ไลเปสแอกทิวิตีจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์

Sevgi และคณะ (2007) ศึกษาไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ที่ทำการคัดแยกจากน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก พบว่าค่าพีเอชมีผลต่อค่าไลเปสแอกทิวิตี โดยไลเปสแอกทิวิตีจะมีค่าสูงเมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 6 - 9 และที่พีเอช 6 เป็นค่าพีเอชที่ทำให้ไลเปสมีความเสถียรและมีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุดด้วย

2.3.4 อิทธิพลของออกซิเจน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการออกซิเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน ออกซิเจนเป็นธาตุที่สำคัญมากสำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มต้องการอากาศ (Aerobic microorganisms) โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจ ในสภาวะที่มีการให้อากาศอย่างเหมาะสมและต่อเนื่องจุลินทรีย์จะสามารถย่อยสลายสารอาหารและสร้างพลังงานได้สูง การเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการจะใช้เครื่องเขย่า (shaker) ในการให้อากาศ โดยการเขย่าจะช่วยให้มีการถ่ายเทอากาศจากภายนอกเข้าสู่ขวดทดลองผ่านทางจุกสำลี ในระดับถึงปฏิกรณ์จะมีการควบคุมการให้อากาศ ซึ่งการให้อากาศภายในถึงปฏิกรณ์นี้นอกจากจะช่วยเติมอากาศให้เหมาะสมต่อความต้องการของจุลินทรีย์แล้ว ยังช่วยในเรื่องการกระจายตัวของเซลล์จุลินทรีย์ให้แขวนลอยอยู่ในอากาศอย่างสม่ำเสมออีกด้วย

2.3.5 อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) เป็นสารที่เมื่อละลายน้ำแล้วจะช่วยลดแรงตึงผิวของน้ำ คำว่า Surfactant มาจากคำว่า Surface active agent มีคุณลักษณะที่สำคัญ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัวที่เป็น Hydrophilic (ชอบน้ำ) และ ส่วนหางที่เป็น Hydrophobic (ไม่ชอบน้ำแต่ชอบน้ำมัน) สารลดแรงตึงผิวคุณสมบัติในการรวมโมเลกุลให้มีน้ำหนักมากขึ้น เพื่อลดแรงเกาะระหว่างกันของสสารนั้น ๆ และนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น เป็น Emulsifier ซึ่งทำให้น้ำกับน้ำมันเข้ากันได้ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายไขมัน และมีผลต่อการทำงานของไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ด้วย งานวิจัยที่ผ่านมามีหลายงานวิจัยที่ศึกษาอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวต่อการทำงานของไลเปส เช่น

Lin และคณะ (1995) ศึกษาอิทธิพลของ Triton X-100 ต่อการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ของ Triton X-100 เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ช่วยให้แบคทีเรียปล่อยไลเปสออกมานอกเซลล์

Gerardo และ Sergio (1999) ศึกษาอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อค่าไลเปสแอกทิวิตีที่ผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* ด้วยการใส่ Tween80 ลงไปในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ พบว่าค่าไลเปสแอกทิวิตีมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของ Tween80 อยู่ระหว่าง 0.5 - 2 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นที่มากกว่าหรือน้อยกว่าความเข้มข้นในช่วงนี้จะส่งผลให้จุลินทรีย์มีการผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์ลดลง นอกจากนั้นยังศึกษาอิทธิพลของ Tween80 ต่อการเจริญและการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบการเติม Tween80 ที่ 0.5 กรัมต่อลิตร ลงไปในอาหารพื้นฐาน กับ การใช้อาหารพื้นฐานเพียงอย่างเดียว พบว่า อาหารที่มีการเติม Tween80 จะส่งผลให้มีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงกว่า แต่เมื่อพิจารณาในเรื่องจำนวนเซลล์แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างอาหาร 2 แบบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ไม่ได้นำ Tween80 ไปใช้เพื่อการสร้างเซลล์ แต่มีผลต่อการละลายไขมันซึ่งส่งผลให้มีการหลั่งไลเปสออกมานอกเซลล์มากขึ้น นอกจากนั้นยังมีการศึกษาผลของ Tween80 ต่อการเพิ่มการหลั่งไลเปสออกมานอกเซลล์ด้วยเช่น *Bacillus sp.* , *Acinetobacter calcoaceticus* 69V เป็นต้น

2.4 การใช้ประโยชน์จากไลเปส

ตารางที่ 2.2 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์และนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Sharma และคณะ, 2001)

อุตสาหกรรม	การทำงานของไลเปส	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น หรือ ประโยชน์ที่ได้รับ
ผงซักฟอกและสารซักล้าง	ไฮโดรไลซิสไขมัน	ผงซักฟอก กำจัดคราบไขมันบนเสื้อผ้า
ผลิตภัณฑ์นม	ไฮโดรไลซิสไขมันนม บ่มชีส	ประโยชน์ในการปรับปรุงกลิ่นในนมชีส และเนย
ขนมอบ	เพิ่มกลิ่น รส ขนมอบ	ประโยชน์ในการปรับปรุงกลิ่นรส และช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์ขนมอบ
เครื่องดื่ม	เพิ่มกลิ่นหอมของผลิตภัณฑ์	เครื่องดื่ม
สารตกแต่งอาหาร	ปรับปรุงคุณภาพอาหาร	มายองเนส วิปปิงครีม
อาหารเกี่ยวกับสุขภาพ	ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน	อาหารเกี่ยวกับสุขภาพ
เนื้อและปลา	พัฒนามารสชาติและคุณภาพ	ผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาที่ไม่มีไขมัน
ไขมันและน้ำมัน	ไฮโดรไลซิส ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน	เนย มากา린 กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ และ ไดกลีเซอไรด์
สารเคมี	ซินเทอร์ซิส	สารเคมี
เภสัชภัณฑ์	ไฮโดรไลซิส ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน	ยา
เครื่องสำอาง	ซินเทอร์ซิส	มอยเจอร์ไรเซอร์
หนังฟอก	ไฮโดรไลซิส	ผลิตภัณฑ์หนังฟอก
กระดาษ	ไฮโดรไลซิส	กระดาษที่มีคุณภาพ
สารทำความสะอาด	ไฮโดรไลซิส	น้ำยาทำความสะอาดกำจัดไขมัน

2.5 คำจำกัดความของน้ำเสียและองค์ประกอบของน้ำเสีย

ตารางที่ 2.3 ลักษณะทั่วไปของน้ำเสีย (สุบัญญัติ นิรมรัตน์ , 2548)

ลักษณะของน้ำเสีย	ปริมาณเฉลี่ยที่พบ
น้ำ	99%
สารอินทรีย์และอนินทรีย์	0.10%
บีโอดี	200 มก./ล.
ซีโอดี	400 มก./ล.
ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน	100มก./ล.
ปริมาณของแข็ง	20มก./ล.
ปริมาณไนโตรเจน	30มก./ล.
ปริมาณฟอสฟอรัส	5มก./ล.
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด	500มก./ล.
ความขุ่น	ขุ่น
สีและกลิ่น	สีน้ำตาลหรือสีเทาอ่อน
สารพิษ	สารอินทรีย์และโลหะ
จุลินทรีย์	เชื้อก่อโรคและปรสิต

น้ำเสีย (wastewater หรือ sewage) เป็นน้ำที่ใช้แล้วจากชุมชน ประกอบด้วยน้ำเสียจากบ้านเรือน รวมทั้งสิ่งขับถ่าย น้ำซักล้าง และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งน้ำมัน คราบ น้ำมัน น้ำกรด อาจรวมทั้งน้ำฝน น้ำผิวดิน น้ำใต้ดิน ที่รวมเข้าสู่ท่อระบายน้ำ องค์ประกอบของน้ำเสีย พบว่าน้ำเสียจากบ้านเรือนจะประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ของแข็งที่แขวนลอย 0.02-0.03 เปอร์เซ็นต์ และสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ น้ำตาล กรดอะมิโน กรดไขมัน แอลกอฮอล์ และสารอนินทรีย์อื่นๆ ปริมาณของแข็งที่แขวนลอยแม้ดูว่าจะเป็นสัดส่วนที่น้อย แต่ในเมืองใหญ่ ในแต่ละวันจะมีน้ำทิ้งที่เป็นน้ำเสียจำนวนมากดังนั้นปริมาณของแข็งอาจมีถึง 100 ตัน นอกจากนี้ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำเสียยังเปลี่ยนแปลงไปตามแหล่งที่มาของน้ำเสียและช่วงเวลาที่ปลดปล่อยน้ำเสียออกมา สารอินทรีย์ในน้ำเสียได้มาจากสิ่งขับถ่ายของตนและของเสียจากบ้านเรือน ส่วนโรงงานอุตสาหกรรมจะมีการปลดปล่อยทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ได้แก่

โรงงานน้ำตาล โรงงานฆ่าสัตว์ โรงงานกระดาษ โรงงานโลหะต่างๆ เป็นต้น เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำเสียมีการเปลี่ยนแปลงทำให้ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำเสียเปลี่ยนแปลงไปด้วย จุลินทรีย์ในน้ำเสียได้แก่ เชื้อรา โปรโตซัว สาหร่าย แบคทีเรีย ไวรัส เมื่อปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำ จึงเป็นการเพิ่มสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ให้แก่แหล่งน้ำ ส่งผลให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆนำไปใช้เป็นอาหารและมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว พร้อมทั้งย่อยสลายสารอินทรีย์ไปด้วย (Preetha และ Kumar, 2007)

2.6 การบำบัดน้ำเสีย (Wastewater treatments)

แต่เดิมชุมชนที่มีขนาดเล็ก น้ำเสียที่ทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะถูกเจือจางลงและถูกย่อยต่อไปโดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายในแหล่งน้ำนั้น ซึ่งเรียกว่า self-purification แต่ในปัจจุบัน เมืองมีขนาดใหญ่ขึ้น ประชากรจำนวนมากขึ้น ปริมาณน้ำเสียมีมากเกินกว่าที่แหล่งน้ำตามธรรมชาติจะบำบัดได้ ยกตัวอย่างเช่น คลองแสนแสบในกรุงเทพมหานคร รวมทั้งการมีโรงงานอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นระบบการบำบัดน้ำเสียจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญและจำเป็นต้องจัดทำเพื่อเป็นแหล่งการบำบัดน้ำเสียให้มีความสกปรกลดลงจนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานและไม่ก่อให้เกิดปัญหาตามมา (สุภัณฑิต นิมรัตน์, 2548) นอกจากนี้ทางชุมชนและโรงงานเองก็มีความต้องการในการใช้น้ำเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีระบบการบำบัดน้ำที่ดีเพื่อการหมุนเวียนน้ำดีที่ผ่านการบำบัดนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก (นงลักษณ์และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

ประเภทและลักษณะของระบบบำบัดน้ำเสียที่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ คือ

1. เป็นระบบที่สามารถทำงานได้และควบคุมสะดวก
2. มีค่าใช้จ่ายไม่สูงมากเกินไปซึ่งทำให้ผู้ที่สร้างระบบสามารถยอมรับได้
3. เป็นระบบที่ต้องการพื้นที่ในการติดตั้งเหมาะสมกับพื้นที่นั้นๆ เพราะในแต่ละระบบจะต้องการพื้นที่ในการปลูกสร้างไม่เท่ากัน

ระบบบำบัดน้ำเสียที่ถูกนำมาใช้ในประเทศไทยเป็นอันดับแรกก็คือ การบำบัดแบบบ่อเกรอะบ่อซึม (Septic tank) ซึ่งนิยมใช้ในบ้านเรือนโดยทั่วไป นอกจากนั้นเพื่อเป็นการป้องกันน้ำเน่าเสียที่เกิดจากแหล่งโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยจึงได้มีการประกาศใช้พระราชบัญญัติโรงงานซึ่งบังคับให้โรงงานอุตสาหกรรมต้องจัดให้มีระบบบำบัดน้ำเสียแบบต่างๆขึ้นมาก่อนที่จะปล่อยลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ (สุภัณฑิต นิมรัตน์, 2548)

2.6.1 ประเภทของระบบบำบัดน้ำเสีย

ระบบบำบัดน้ำเสียสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

2.6.1.1 ระบบบำบัดน้ำเสียทางกายภาพ (Physical process) คือวิธีการบำบัดโดยใช้กระบวนการทางกายภาพ เช่น การตกด้วยตะแกรง การตกตะกอน (Sedimentation) และการกรอง (Filtration) สารปนเปื้อนจากน้ำเสีย วิธีนี้นิยมใช้ในการบำบัดสารปนเปื้อนบางชนิดหรือบำบัดน้ำเสียที่มีความสกปรกไม่มากนักวิธีการบำบัดน้ำเสียทางกายภาพจะเสียค่าใช้จ่ายสูงพอกับวิธีการบำบัดน้ำเสียทางเคมี

2.6.1.2 ระบบบำบัดน้ำเสียทางเคมี (Chemical process) คือวิธีการบำบัดโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี เช่นการทำให้เป็นกลาง (Neutralization) การทำให้เกิดตะกอน (Precipitation) และการช่วยการตกตะกอนของสารปนเปื้อนทำให้น้ำเสียแยกออกจากน้ำส่วนใส (Chemical-coagulation) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการบำบัดแต่มีข้อเสียตรงที่มีค่าใช้จ่ายสูงและทำให้เกิดกากตะกอนในปริมาณที่สูง

2.6.1.3 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological process) คือระบบบำบัดที่ใช้สิ่งมีชีวิตในธรรมชาติในการบำบัดสารปนเปื้อนในน้ำเสีย จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เชื้อรา สาหร่ายและโพรโต ระบบบำบัดทางชีวภาพ เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีทางเคมีหรือวิธีทางกายภาพ แต่ระบบการบำบัดแบบนี้จะใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ จะประกอบด้วย 2 ประเภทใหญ่ คือ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจน และระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (สุภณชาติ นิมรต์น, 2548)

2.7 ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งที่อาศัยจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (biodegradable organic compound) โดยจุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารและสารตั้งต้นในกระบวนการดำรงชีวิต การเจริญเติบโต

และการสังเคราะห์เซลล์ใหม่ (new cell) และได้ผลผลิตเป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และสารตกค้างซึ่งไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (non biodegradable residual)

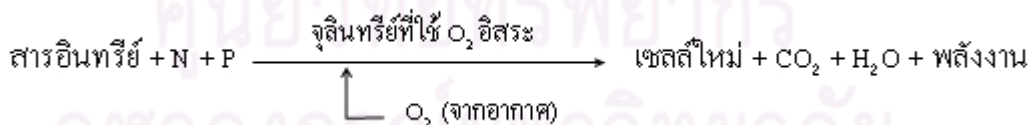
กระบวนการบำบัดทางชีวภาพ สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ตามชนิดของ จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ได้แก่ การบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ หรือใช้ออกซิเจน (aerobic wastewater treatment) และการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ หรือไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic wastewater treatment)

2.8 กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Aerobic wastewater treatment)

เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องอาศัยออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) หรือ ออกซิเจนอิสระ ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ปฏิบัติการย่อยสลาย สารอินทรีย์โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้อากาศ (Aerobic bacteria) สามารถจำแนกได้เป็น 2 ขั้นตอน ตามลำดับดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นกระบวนการนำสารอินทรีย์หรือสารอาหารเข้าไปในเซลล์ โดยจุลินทรีย์ จะส่งเอนไซม์ (enzyme) ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มาเกาะติดที่ผนังเซลล์เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ใน รูปของสารโมเลกุลเล็กที่จะสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้

ขั้นตอนที่ 2 เป็นกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อที่จะผลิตพลังงานไป ใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ และการสร้างเซลล์ใหม่ โดยเขียนอยู่ในรูปของสมการโดยรวมได้ ดังนี้



เมื่อสารอินทรีย์ในน้ำเสียถูกเปลี่ยนรูปมาเป็นจุลินทรีย์เซลล์ใหม่ จะรวมตัวกันเป็นฟล็อก (Biological flocculation) ก็จะมีน้ำหนักมากขึ้น และแยกออกจากน้ำเสียได้ง่ายด้วยการ ตกตะกอน กระบวนการบำบัด

น้ำเสียแบบใช้อากาศ จำแนกได้เป็น 2 ประเภทหลัก คือ

1. ระบบบำบัดที่จุลินทรีย์แขวนลอยอยู่ในระบบ (Suspended system) เช่น บ่อแอโรบิก (Aerobic Pond) บ่อเติมอากาศ (Aerated Lagoon) ระบบแอคติเวทเต็ดสลัดจ์ (Activated Sludge) เป็นต้น
2. ระบบบำบัดที่จุลินทรีย์เกาะติดผิวตัวกลาง หรือ ระบบฟิล์มตรึง (Fixed film system) เช่น ระบบโปรยกรอง (Trickling Filter) และระบบแผ่นหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor) เป็นต้น

2.9 การบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันโดยจุลินทรีย์ผลิตไลเปส

ไขมันและน้ำมันจัดเป็นสารอินทรีย์กลุ่มหลักที่พบได้ในน้ำเสียที่ปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหาร อุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น โดยโรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจะใช้น้ำในปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไป ซึ่งน้ำเสียที่มีไขมันหรือน้ำมันปนเปื้อนในสัดส่วนมากจะส่งผลกระทบต่อระบบการบำบัดน้ำเสีย (Chipasa และ Medrzycka, 2006) เนื่องจากลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมันจัดอยู่ในกลุ่มไม่ละลายน้ำ (Hydrophobic organic compounds) ดังนั้นมักจะพบปัญหาการเกาะติดของไขมันบริเวณท่อของระบบบำบัดน้ำเสีย (Matsumiya และคณะ, 2007) ซึ่งจะขัดขวางการไหลเวียนของน้ำเสีย ส่งผลให้ระบบการบำบัดน้ำเสียขาดประสิทธิภาพ และน้ำเสียจากร้านอาหารรวมถึงน้ำเสียจากแหล่งชุมชนที่ไหลลงสู่แม่น้ำลำคลองหากยังมีการปนเปื้อนของไขมันหรือน้ำมันอยู่ จะมีการสะสมของคราบไขมันลอยเป็นฝ้าทำให้ก๊าซออกซิเจนในอากาศไม่สามารถจะละลายไปในน้ำได้ ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำทั้งพืชและสัตว์ เนื่องจากขาดก๊าซออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ในการหายใจ (Mongkolthanaruk และ Dharmstithi, 2002)

จุลินทรีย์ผลิตไลเปสเพื่อย่อยไขมันและน้ำมันนั้น สามารถคัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ ทั่วไป เช่น แหล่งดินที่มีการปนเปื้อนไขมัน แหล่งน้ำเสีย หรืออาจคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม หรือแหล่งชุมชน

Wakelin และ Forster (1997) ได้ติดตามการกำจัดไขมันสัตว์ (greases) และน้ำมันโดยจุลินทรีย์ โดยพบว่าร้านอาหารประเภทจานด่วน (Fast-Food) จะก่อให้เกิดการปนเปื้อนของไขมัน

สัตว์ในส่งผลให้เกิดน้ำเสีย ซึ่งขณะนั้นยังไม่มีวิธีการบำบัดที่ได้รับการยอมรับ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาระบบการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก (bioreactor) เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย โดยได้ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) และเชื้อกลุ่มผสม (mixed culture) โดยทดสอบกับ น้ำมันพืช น้ำมันหมู และไขมันสัตว์ที่ได้จากเครื่องดักจับไขมันของร้านอาหาร โดยเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้คือ *Acinetobacter* sp., *Rhodococcus rubra*, *Nocardia amarae*, และ *Microthrix parvicella* นำมาเปรียบเทียบกับเชื้อกลุ่มผสมที่แยกได้จากบ่อดักจับไขมัน MC1 และตะกอนจุลินทรีย์ (activated sludge) โดยที่ประสิทธิภาพวัดจากการกำจัดไขมันสัตว์ ค่ามวลชีวภาพที่ผลิตขึ้น และเปอร์เซ็นต์ yield จากการทดลองพบว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถกำจัดไขมันได้มากที่สุดคือ *Acinetobacter* sp. โดยกำจัดไขมันสัตว์ได้ถึง 60 - 65 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพของเชื้อกลุ่มผสมอยู่ในช่วง 29 - 73 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตะกอนจุลินทรีย์จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันสัตว์ได้สูงสุดคือ 90 เปอร์เซ็นต์

Scioli และ Vollaro (1997) พบว่าน้ำเสียที่มาจากกระบวนการผลิตน้ำมันมะกอกเป็นปัญหาสำคัญที่พบมากในแถบเมดิเตอร์เรเนียน เนื่องจากมีค่าซีโอดีสูงประมาณ 100 - 200 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีการปนเปื้อนสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์อื่นๆในปริมาณที่สูงอีกด้วย จากการศึกษาพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 โตได้ดีในน้ำเสียจากการบดมะกอกในระดับขวดเขย่า และเมื่อนำมาศึกษาการบำบัดน้ำเสียในถังปฏิกรณ์ขนาด 3.5 ลิตร พบว่าสามารถลดค่าซีโอดีได้กว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง รวมถึงระหว่างกระบวนการบำบัดสามารถลดองค์ประกอบสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์อื่นๆลงได้อีกด้วย

Becker และคณะ (1999) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันมะกอก และศึกษาความสามารถในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันจากการขาดชนสัตว์ ภายใต้สภาวะเติมอากาศ ที่อุณหภูมิสูง (65 องศาเซลเซียส) โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกมาได้ คือ *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 เมื่อทำการติดตามการย่อยสลายน้ำมันมะกอกของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง พบว่า สามารถย่อยสลายได้สูงถึงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

Mongkolthanaruk และคณะ (2002) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของไขมันสูง โดยใช้กลุ่มของแบคทีเรีย (mixed culture consortium) โดยประกอบไปด้วย *Pseudomonas aeruginosa* LP₆₀₂, *Bacillus* sp. B₃₀₄, และ *Acinetobacter calocoaceticus* LP₀₀₉ ซึ่งคัดแยก

ได้จากตัวอย่างน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนไขมันสูง โดยนำ 6.1×10^8 CFU ของ LP₆₀₂ , 4.8×10^8 CFU ของ B₃₀₄ และ 8.9×10^8 CFU ของ LP₀₀₉ มาเลี้ยงใน 20 มิลลิลิตร ของ basal salt solution ที่มีการเติม 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ของ CaCl₂ ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. B₃₀₄ นอกจากจะผลิตเอนไซม์ไลเปสแล้วยังผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสด้วย ในขณะที่ *Acinetobacter calocoaceticus* LP₀₀₉ และ *Pseudomonas aeruginosa* LP₆₀₂ จะผลิตไลเปสเพียงอย่างเดียว โดยที่กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเปสนี้จะช่วยทำให้ค่า BOD และปริมาณของแข็งในน้ำจะลดลงจาก 3,500 และ 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เหลือน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 12 วันในสภาวะการเลี้ยงแบบให้อากาศ

Lanciotti และคณะ (2005) ทำการคัดแยกยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* จากแหล่งต่างๆ เพื่อศึกษาความสามารถในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานที่มีการบดมะกอก (olive mill wastewater) โดยพบว่าทุกไอโซเลทที่คัดแยกมาได้สามารถเจริญได้ในน้ำเสียจากการบดมะกอก *Y. lipolytica* ไอโซเลทที่ Y17, PO1, B16, C11 และ Y9 สามารถลดค่าซีไอดีในน้ำเสียจากการบดมะกอกได้ดี รวมถึงผลิตค่าน้ำหนักเซลล์และผลิตสารเมตาบอไลต์ เช่น ไลเปส กรดซิติค ออกมาสูง

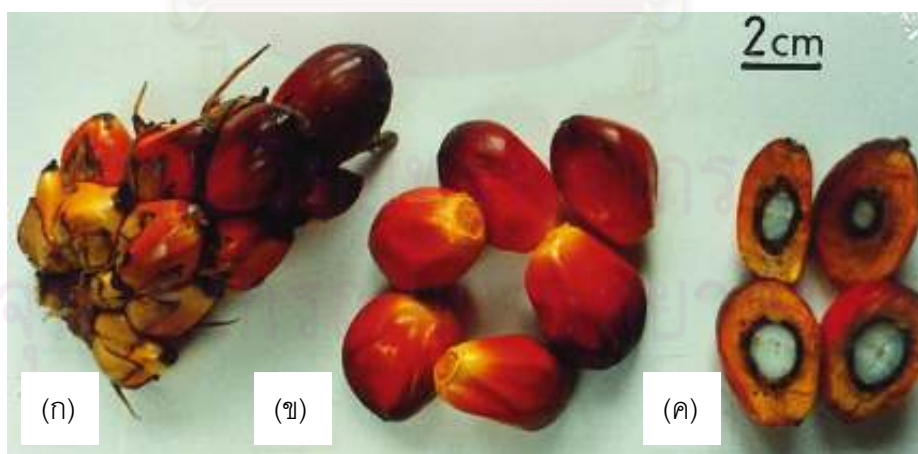
Matsumiya และคณะ (2007) ทำการคัดแยกและศึกษาลักษณะแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน รวมถึงประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนไขมันด้วยผลการศึกษาพบว่าเมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติหลายแหล่ง *Burkholderia* sp. DW2-1 มีความสามารถในการย่อยสลาย 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของน้ำมันสลัดได้สูงที่สุดถึง 96.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงที่สุดในจำนวนทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกมาได้ทั้งหมด โดยมีค่าไลเปสแอกทิวิตีและค่าแอกทิวิตีของสารลดแรงตึงผิวเท่ากับ 1720 ยูนิตต่อลิตร และ 480 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันชนิดอื่น คือ น้ำมันมะกอก น้ำมันงา และไขมันวัว โดยประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันเท่ากับ 92.3, 90.1 และ 77.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำ *Burkholderia* sp. DW2-1 มาทดสอบการย่อยสลายน้ำเสียสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนน้ำมันในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันสลัดได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงมีชีวิตรอดอยู่ได้ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 7 วัน

2.10 ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (Oil palm) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ได้มีการจำแนกปาล์มน้ำมันอยู่ในวงศ์ (family) *Palmae* หรือ *Arecaceae* และอยู่ในสกุล (genus) *Elaeis* ซึ่งประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ย่อย คือ *E. guineensis* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาตะวันตกและแอฟริกาตอนกลาง ลักษณะของ ปาล์มน้ำมัน *E. guineensis* ให้ผลผลิตทะลายสูง มีน้ำหนักผล เปลือกนอกต่อผลและผลผลิตน้ำมันสูง อีกสายพันธุ์หนึ่ง คือ *E. oleifera* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้และอเมริกากลาง ลักษณะต้นเตี้ย น้ำมันปาล์มที่สกัดได้จะมีเปอร์เซ็นต์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (unsaturated fatty acid) รวมทั้งมีวิตามินเอและวิตามินอีสูง แต่ให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันน้อยกว่าปาล์มน้ำมัน *E. guineensis* ปัจจุบันมีประโยชน์ในการเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพสำหรับปรับปรุงพันธุ์ โดยการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ ปาล์มจัดเป็นพืชยืนต้นที่สามารถผลิตน้ำมันออกมาได้มากที่สุด โดยการสกัดน้ำมันปาล์มทำให้ได้น้ำมัน 2 ประเภท คือ น้ำมันปาล์มที่สกัดจากเนื้อผลปาล์มซึ่งเป็นส่วนของ mesocarp โดยที่น้ำมันชนิดนี้เป็นน้ำมันหลักที่ใช้ในการบริโภค อีกประเภทหนึ่งเป็นน้ำมันปาล์มที่สกัดออกมาจากเมล็ดปาล์มซึ่งเป็นส่วนของ endosperm จะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคัล (oleochemical industry) อย่างกว้างขวางเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องด้านการอุปโภคอื่นๆ ต่อไป (Ravigadevi และคณะ, 2000)



รูปที่ 2.2 ลักษณะของต้นปาล์มสายพันธุ์ *Elaeis guineensis* เมื่อโตเต็มที่ที่จะมีการสร้างทลายปาล์มและมีความยาวของใบประมาณ 8 - 10 เมตร (Janice และ Daphne, 2000)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของผลปาล์ม (ก) ทลายปาล์ม (ข) ผลปาล์มเดี่ยวเมื่อแยกออกจากทลาย (ค) ภาพตัดขวางของผลปาล์มแสดงส่วนของเนื้อปาล์ม (mesocarp) และเมล็ดปาล์ม (white kernel) (Janice และ Daphne, 2000)

2.11 การผลิตปาล์มน้ำมันในประเทศไทย

ในปัจจุบันน้ำมันปาล์มเป็นน้ำมันพืชชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการบริโภคมากเป็นอันดับ 2 รองจากน้ำมันถั่วเหลือง โดยแหล่งการผลิตแหล่งใหญ่ที่สำคัญของโลก อยู่ที่ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่นประเทศ มาเลเซีย อินโดนีเซีย และประเทศไทย

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยปาล์มน้ำมันจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้น ดังนั้นปาล์มน้ำมันจึงเจริญเติบโตได้ดีในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งถือว่าเป็นเขตเศรษฐกิจปาล์มน้ำมัน บริเวณพื้นที่ที่ปลูกมาก คือ จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูลและตรัง โดยจังหวัดกระบี่ ปลูกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 39.40 และรองลงมาได้แก่จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดชุมพร คิดเป็นร้อยละ 29.70 และ 15.89 ของพื้นที่ปลูกทั้งประเทศตามลำดับ ในด้านปริมาณการผลิตทั้งประเทศ พบว่า ในปี 2540 ปาล์มน้ำมันมีเนื้อที่ให้ผลผลิต 1,047,612 ไร่ ผลผลิตปาล์มสดทั้งหมดทะลาย 2.78 ล้านตัน ส่วนปี 2541 มีพื้นที่ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 60,000 ไร่ เป็นพื้นที่ให้ผลผลิต 1,109,245 ไร่ ส่งผลให้ได้ผลผลิตประมาณ 2.79 ล้านตัน ผลผลิตปาล์มน้ำมันดังกล่าวสามารถผลิตเป็นปาล์มน้ำมันได้ประมาณ 475,042 - 530,929 ตัน ในปี 2547 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันถึง 2.19 ล้านไร่ และผลิตน้ำมันปาล์มดิบได้ถึง 775,000 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2552)

2.12 การบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม

มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์มที่ผลิตทั่วโลกถูกนำมาใช้ในการบริโภคโดยตรง โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศ มาเลเซีย อินโดนีเซีย และประเทศไทย เป็นต้น ดังนั้นจึงมักพบปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันปาล์มในน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม ยกตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ. 1990 ประเทศมาเลเซียมีน้ำเสียที่เกิดจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มมากกว่า 9 ล้านตัน ซึ่งพบว่าน้ำเสียเหล่านี้มีความเป็นมลพิษสูงและมีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ในปริมาณที่สูงด้วย ดังนั้นจำเป็นจะต้องมีการบำบัดน้ำเสียก่อนที่จะปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติต่อไป (Mohamed และ Ahmad, 1989) นอกจากนี้จะพบว่าน้ำมันปาล์มจะปนเปื้อนในน้ำเสียจากโรงงานแล้วยังพบว่ามีการปนเปื้อนของน้ำมันปาล์มในน้ำเสียครัวเรือนและน้ำเสียชุมชนอีกด้วย ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของแหล่งน้ำและส่งผลกระทบต่อธรรมชาติ

โดยรวมด้วย และที่ผ่านมามีงานวิจัยเพื่อหาวิธีบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม ได้แก่การบำบัดโดยวิธีกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การเติมสารเคมีเพื่อให้เกิดการรวมตัวและลอยตัวเป็นก้อนของน้ำมันปาล์ม (chemical coagulation and flocculation) เป็นต้น (Chin K.K. และ Wong K.K., 1980) และอีกหนึ่งทางเลือกหนึ่งคือการบำบัดทางชีวภาพเป็นการใช้จุลินทรีย์ในกระบวนการบำบัด ซึ่งประกอบไปด้วยการบำบัดแบบใช้อากาศ และการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ ในปัจจุบันมีงานวิจัยระบุว่าจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ เช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรีย สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้

Mohamed และ Ahmad (1989) ศึกษาการบำบัดน้ำมันปาล์มที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม (palm oil mill effluent) โดยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้รา *Trichoderma viride* ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดีและสามารถลดค่า COD (chemical oxygen demand) ในน้ำเสียได้ จากงานวิจัยพบว่าเมื่อใช้ *Trichoderma viride* เป็นหัวเชื้อในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม สามารถลดค่า COD ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 10-14 วัน และมีการผลิตเซลล์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำมันปาล์มถึง 1.37-1.42 กรัมต่อลิตรของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Oswal และคณะ (2002) ได้ศึกษาการบำบัด น้ำมันปาล์มที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เช่นเดียวกับ Mohamed และ Ahmad (1989) แต่เลือกใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 ซึ่งคัดแยกมาจากเมืองมุมไบ ประเทศอินเดีย โดยสายพันธุ์นี้พบว่าสามารถเจริญได้ดีทั้งในน้ำทะเลและในน้ำจืด และสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงพีเอชที่กว้างคือ 3.0 - 8.5 จากงานวิจัยพบว่าภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยง ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถลดค่า COD ได้มากถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการนำเอายีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 มาผสมกับดินเพื่อสร้างกลุ่มจุลินทรีย์ พบว่า สามารถค่า COD ได้มากถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จากค่าเริ่มต้นอยู่ที่ 250,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเพียง 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยวิธีทางชีวภาพนั้นยังมีอยู่ในวงจำกัด โดยส่วนใหญ่งานวิจัยการย่อยสลายน้ำมันปาล์มนั้นมักจะมาจากประเทศมาเลเซีย ซึ่งเป็นประเทศหลักที่มีการผลิตและบริโภคน้ำมันปาล์ม ในส่วนของประเทศไทยนั้นมีการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยวิธีทางชีวภาพน้อยมาก มีเพียงการศึกษาของ สุรอรอด

และคณะ (2545) ที่ทำการศึกษาค่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้บำบัดไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยศึกษานั้นผู้วิจัยได้ใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสได้ แต่ไม่ได้มีการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มจากจุลินทรีย์โดยตรง และงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนมากมักมุ่งเน้นในการศึกษาค่าการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในรูปเชื้อเดี่ยว มีเพียงงานวิจัยของ Oswal และคณะ (2002) ที่ศึกษาค่าการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ปนเปื้อนในน้ำเสียโดยใช้เชื้อกลุ่มผสมของ *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 มาผสมกับจุลินทรีย์ในดิน แต่ก็ไม่ได้มีการตรวจสอบว่าจุลินทรีย์กลุ่มผสมที่นำมาศึกษานั้นเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มใด ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่า ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มนั้นมาจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ใด ซึ่งทำให้มีขอบเขตจำกัดในการนำไปศึกษาต่อ

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย ที่มีความสามารถในการสร้างไลเปส มาทำการสร้างกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เพื่อใช้ในการบำบัดไขมัน และน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยมุ่งเน้นไปที่การศึกษาค่าการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม โดยทำการศึกษาค่าไลเปสแอกทิวิตี และเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มของจุลินทรีย์กลุ่มผสมในการบำบัดในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง พร้อมทั้งศึกษาความสามารถในการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์แต่ละตัวที่นำมาสร้างกลุ่มจุลินทรีย์ผสมด้วยเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น UNILUX-12 บริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
2. กระดาษอะลูมิเนียม
3. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
4. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, U.S.A.
5. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.
6. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, U.S.A.
7. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
8. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., U.S.A.
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
11. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, U.S.A.
12. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, U.S.A. และ รุ่น MJ Mini™ Personal Thermal Cycler บริษัท Biorad, U.S.A.
13. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., U.S.A.
14. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
15. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, U.S.A.
16. เครื่อง Sonicator รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท สยามแอนด์โก, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย
17. เครื่อง IATROSCAN TLC-FID Analyzer, Japan
18. ชุดอุปกรณ์ทำ agarose gel electrophoresis ได้แก่ ถาดเทเจล ถังใส่สารละลาย แผ่นหวี และแหล่งจ่ายไฟ ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan

19. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific supply Co., Ltd., Thailand
20. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
21. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80°C รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, U.S.A.
22. ตู้ป่นเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE800, Germany
23. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
24. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
25. ถังปฏิกิริยา (Reactor) รุ่น Marubishi Model MDL , Japan
26. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf AG, Germany
27. อุปกรณ์นับเซลล์ (hemacytometer) บริษัท Schott Duran, Germany



(Marubishi Model MDL) reactor

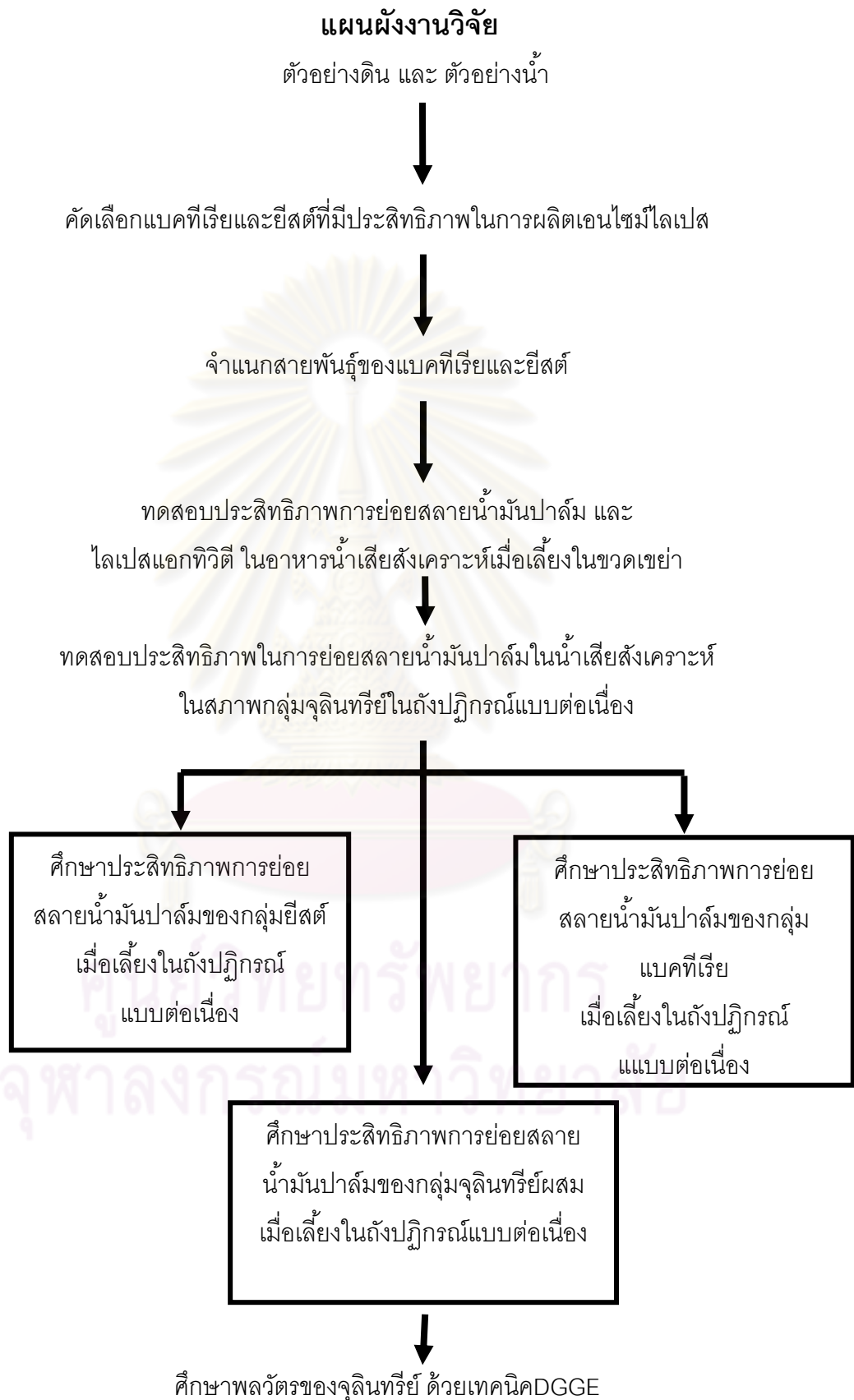


IATROSCAN TLC-FID Analyzer

เคมีภัณฑ์

1. กรดบอริกเข้มข้น บริษัท Merck, Germany
2. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
4. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., U.S.A.
5. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
6. คลอโรฟอร์ม (chloroform) บริษัท Merck, Germany
7. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
8. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
9. ชุด สารละลาย KAPA2G Robust HotStart บริษัท Kapa Biosystems, United States
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
11. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS), ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3$) บริษัท Nacal tesque, Japan
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
13. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kilobase DNA ladder) บริษัท Bio-Rad, UK และ บริษัท บริษัท Fermentas, U.S.A.
14. ดีเอ็นเอ 100 bp DNA ladder ของบริษัท BioExcellence, Thailand
15. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
16. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
17. ไตรบูไทรีน (Tributyrin) บริษัท Fluka, Switzerland
18. ทริปโตเนน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
19. แบคโตเปปโทน (Bacto peptone broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
20. ผงวุ้น
21. ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
22. ผงสกัดจากมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
23. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
24. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
25. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany

26. พารา-ไนโตรฟีนอล อะซิเตท (*p*-nitrophenyl acetate) บริษัท Fluka, Switzerland
27. พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) บริษัท Sigma, U.S.A.
28. ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ [Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)] บริษัท USB, USA
29. เมทานอล (CH₃OH) บริษัท Merck, Germany
30. แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄·7H₂O) บริษัท Carlo ERBA, France
31. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., U.S.A.
 - ฟอร์มามาไมด์ ([Formamide (Deionized)])
 - สารละลาย 40% อะคริลาไมด์/บิส (40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1)
 - ยูเรีย (Urea)
 - แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate)
 - N,N,N',N'-เททระ เมทิล เอทิลีนไดเอมีน (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine, TEMED)
 - ทีเออี เข้มข้น 50 เท่า (50xTAE)
 - สีติดตาม (Dye solution)
 - เอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide solution) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
32. สาร EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid), (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O) ของบริษัท Sigma, USA
33. สาร Tween 80 Merck, Germany
34. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUI, Japan
35. อาร์เอ็นเอส เอ (Ribonuclease A, Rnase A) บริษัท Promega, U.S.A.
36. เอทานอล ของบริษัท J.T. Baker, U.S.A.
37. แอมโมเนียม
38. แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) บริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England
39. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท E. Merck, Germany



วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 คัดแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส

3.1.1 เก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส

เก็บตัวอย่างจากบริเวณดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนน้ำมันซึ่งคาดว่าจะมีแบคทีเรียและยีสต์ที่มีความสามารถผลิตไลเปส โดยนำตัวอย่างดิน 5 กรัมหรือน้ำ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวน้ำมันปาล์มดัดแปลงจากสูตรของ สุวรรณศุภจตุรัส (2545) ตามภาคผนวก ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะขวดที่มีการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple ในอาหารเหลวจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง

3.1.2 คัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส

โดยนำจุลินทรีย์ที่ได้ในข้อ 3.1.1 มาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} - 10^{-6} จากสารละลายเจือจางดินทุกระดับความเข้มข้น ปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารแข็งไตรบูไทรีน (Tributyryl agar plate) ดัดแปลงจาก พัชรวิภา ใจจักรคำ (2545) ตามภาคผนวก ก บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คัดเลือกโคโลนีที่ทำให้เกิดบริเวณใส และถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ ทำซ้ำจนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยปลายเข็มเชื้อและจุดลงบนอาหารอีกครั้ง วัดบริเวณกว้างของบริเวณใสที่เกิด ขึ้นโดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างรัศมีบริเวณใสมากกว่า 0.3 เซนติเมตร ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ โดยศึกษาสีและโครงสร้างของโคโลนี พร้อมทั้งย้อมสีแกรมและตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้

3.2.1 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียและยีสต์ตามวิธีของ Cocolin และคณะ (2000) โดยเลี้ยงยีสต์

บนอาหารเหลว YM และเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง ปิเปต 1.5 มิลลิลิตรของอาหารเหลวแต่ละชนิด ที่มีเชื้อลงในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำกัน 3 รอบ จนได้ปริมาณเซลล์ตามที่ต้องการ จากนั้นละลายเซลล์ที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปลอดประจุ เพื่อล้างเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสออกให้หมดจากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ (yeast lysis buffer) 300 ไมโครลิตร ของ 0.4 กรัม glass bead (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-0.25) เติม 200 ไมโครลิตร ของ ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol:chloroform:isoamyl) (25:24:1) นำไปเขย่านาน 15 - 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

เก็บส่วนน้ำใสด้านบนซึ่งเป็นส่วนที่มีดีเอ็นเออยู่มาใส่ในหลอดไมโครพิวจ์อันใหม่จากนั้นเติมฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1) 200 ไมโครลิตร พลิกกลับไปกลับมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสด้านบนซึ่งเป็นส่วนที่มี DNA อยู่ มาใส่ในหลอด ไมโครพิวจ์อันใหม่

เติม 100 เปอร์เซนต์ เอทานอลแช่เย็น ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเติม 5 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตต 0.1 เท่าของปริมาตรน้ำใส พลิกกลับไปมา นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อตกตะกอน DNA จากนั้นเทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม 70 % เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อล้างตะกอน DNA ให้สะอาด ตากตะกอนดีเอ็นเอ ให้แห้ง ละลายตะกอน ดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม RNase 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2.2 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis

เตรียมวุ้นความเข้มข้น 1% โดยชั่งผงวุ้นหนัก 1 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า หลอมด้วยไมโครเวฟประมาณ 2-3 นาที ทิ้งให้สารละลายเย็นลง จนเหลืออุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในภาชนะที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 60 นาที วางแผ่นวุ้นลงในแชมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมแผ่นวุ้นประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร รวมกับสีติดตาม (6X loading dye) 1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) บนแผ่นพาราฟิล์ม แล้วนำมาหยอดลงในหลุมบนแผ่นวุ้น โดยหลุมแรกให้หยอด

ด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน lamda /HinDIII marker จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านแผ่นวุ้น และบัฟเฟอร์ TAE โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel Documentation system)

3.2.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.2.3.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 3.2.1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ถ้าอัตราส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.2.3.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 5.8S-ITS ของยีสต์

ใช้ไพรเมอร์ ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และไพรเมอร์ ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Cristina และคณะ, 2005) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS region ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีความยาวแตกต่างกันออกไปตามแต่ละสายพันธุ์ของยีสต์ โดยจะมีขนาดอยู่ในช่วง 900-300 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้

สารละลาย KAPA2G Robust HotStart 11.1 ไมโครลิตร น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 11 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ 338F 1 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ 518R 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไพรเมอร์เป็น 10 ไมโครโมล (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตร รวมส่วนผสมทั้งหมดในหลอด PCR จะมีปริมาตรสุทธิ

25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation step	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
2. Denaturation step	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
3. Annealing step	อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
4. Extension step	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
ทำขั้นตอนที่ 2-5 จำนวน 35 รอบ	
5. Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยใช้วุ้นความเข้มข้น 2% โดยซึ่งผงวุ้นหนัก 2 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.2.2 แต่เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสเพอร์ (100 bp DNA ladder)

3.2.3.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

โดยใช้ไพรเมอร์ 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') และไพรเมอร์ 518R (5'-ATTACCGCGGCTGG-3') (DeJournett และคณะ, 2007) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความยาวประมาณ 200 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้

สารละลาย KAPA2G Robust HotStart 11.1 ไมโครลิตร น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 11 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ 338F 1 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ 518R 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไพรเมอร์เป็น 10 ไมโครโมล (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตร รวมส่วนผสมทั้งหมดในหลอด PCR จะมีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ
 - 2.1 Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
 - 2.2 Annealing step อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
(ลดอุณหภูมิลดลงทีละ 0.5 องศาเซลเซียส ในแต่ละรอบ)
 - 2.3 Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
3. Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
4. Annealing step อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
5. Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ
7. Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยใช้วุ้นความเข้มข้น 2% โดยชั่งผงวุ้นหนัก 2 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ทำตามวิธีในข้อ 3.2.2 แต่เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสแพร์ (100 bp DNA ladder)

เมื่อได้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียและยีสต์ตามข้อ 3.2.3.2 และ 3.2.3.3 แล้ว นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล ตามวิธีในข้อ 3.2.3.4 ต่อไป

3.2.3.4 การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์

ตัดอะกาโรสเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาสกัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAquick Gel ExtractionKit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ นำชิ้นอะกาโรสเจลที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่หลอดไมโครพิวจ์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที พลิกหลอดกลับไปมาจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล ผสมให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็น

เวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง เติม บัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดสารละลายที่เหลือติดคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพีพอร์หลอดใหม่ เติม บัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ เป็นระยะเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอ เก็บรักษาสารละลายของดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.2.3.4 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR[®] NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI[®] PRISM DNA Sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ของแบคทีเรียคือ 338F และ 518R ส่วนไพรเมอร์ของยีสต์คือ ITS1F และ ITS4R

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ดีเอ็นเอแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank ใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์และไลเปสแอกทิวิตีของยีสต์และแบคทีเรีย ที่คัดเลือกได้

ใช้เข็มเย็บวัสดุของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.2 ลงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) และยีสต์ลงในอาหารเหลว yeast extract-malt extract broth (YM) บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปิเปต 2 มิลลิลิตรของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวน้ำมันปาล์ม บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปรับปริมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ให้เท่ากับ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปิเปตน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ดัดแปลงจาก Matsumiya และคณะ (2007) ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนเซลล์ทั้งหมดมาหาปริมาณมวลชีวภาพ (Biomass) นำส่วนน้ำใสที่ได้มาทดสอบไลเปสแอกทิวิตีตามวิธีของ Marianne และคณะ (1991) และวิเคราะห์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม โดยวิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยเติมลงไปปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายชั้นคลอโรฟอร์มที่ได้มาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายชั้นคลอโรฟอร์มไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography -Flame Ionization Detector (TLC-FID)

3.3.1 วิธีการทดสอบไลเปสแอกทิวิตี

ผสมสารละลาย A ที่มีส่วนประกอบของ พารา-ไนโตรฟีนอล อะซิเตตรต (*p*-nitrophenyl acetate) ซึ่งทำหน้าที่เป็นซับสเตรต ปริมาตร 90 ไมโครลิตร กับ สารละลาย B ที่ทำหน้าที่เป็น บัฟเฟอร์ ปริมาตร 810 ไมโครลิตร จากนั้นเติมตัวอย่างที่เก็บได้จากข้อ 3.2 ซึ่งทำหน้าที่สารละลาย เอนไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าไลเปสแอกทิวิตี โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับ ซับสเตรตแบลงค์ คือ สารละลาย A ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย B ที่ทำหน้าที่เป็น บัฟเฟอร์ ปริมาตร 910 ไมโครลิตร และหักลบออกจาก ค่าเอนไซม์แบลงค์ ซึ่งคือ สารละลาย B ผสมกับสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร

$$\text{ค่า OD460 nm ของไลเปสแอกทิวิตี} = \text{ค่า OD460 nm ของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์} - \text{ค่า OD460 nm ของเอนไซม์แบลงค์}$$

การคำนวณแอกทิวิตีของไลเปสโดยวิธีของ Marianne และคณะ (1991)

จากกราฟมาตรฐานของ พารา-ไนโตรฟีนอล เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Marianne และคณะ (1991) สามารถหาค่าความชันได้ นำค่าความชันที่ได้มาคำนวณแอกทิวิตีของไลเปส

แยกทิวิตีของไลเปส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{เวลาที่บ่มเอนไซม์ (นาทึ่)}} \times \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \frac{1}{\text{ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}} \times \frac{1}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของ พารา-ไนโตรฟีนอล}}$$

3.3.2 วิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มด้วยวิธี Thin Layer Chromatography – Flame Ionization Detector (TLC-FID)

นำสารละลายชั้นคลอโรฟอร์มที่ได้จาก ข้อ 3.3 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม โดยต้องนำแท่งโครมาทอดมาเคลือบด้วยกรดบอริกเข้มข้น 3% น้ำหนักต่อปริมาตร (Boric acid impregnated) ก่อนจึงจะสามารถแยกส่วนของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ ออกจากกันได้

ขั้นตอน

1. นำแท่งโครมาทอดที่จะใช้ทดสอบมาทำการแบลงค์สแกนก่อนหนึ่งครั้งเพื่อตรวจสอบสถานะแท่งโครมาทอด
2. หลังจากทำแบลงค์สแกนเสร็จแล้ว นำแท่งโครมาทอดจุ่มลงในสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 3% น้ำหนักต่อปริมาตร นาน 5 นาทีเพื่อให้กรดบอริกเคลือบแท่งโครมาทอด
3. นำไปเข้าตู้อบความร้อน 120 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
4. นำไปแบลงค์สแกนทันที
5. ได้แท่งโครมาทอดที่เคลือบด้วยกรดบอริก เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป
6. นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาจุดลงบนแท่งโครมาทอด
7. นำแท่งโครมาทอดที่ได้ไปจุ่มลงในตัวทำละลาย (solvent) ที่ใช้ในการพาสารเคลื่อนที่ไปในแท่งโครมาทอด ซึ่งในวิธีการนี้จะใช้ตัวทำละลาย 2 ระบบ คือ ระบบที่ 1 ใช้คลอโรฟอร์มเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ในการพาสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่ไปได้ระยะทาง 8 เซนติเมตร ระบบที่ 2 ใช้คลอโรฟอร์มเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ผสมกับตัวทำละลายที่ผสมกันระหว่าง เมทานอลกับแอมโมเนีย (ในอัตราส่วน 8 ต่อ 2) ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ในการพาสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่ไปได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร

8. นำไปเข้าตู้อบความร้อน 120 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปสแกน
9. สภาวะที่ใช้ในการสแกนคือ อัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน = 160 มิลลิลิตรต่อนาที
 อัตราการไหลของอากาศ = 2.0 ลิตรต่อนาที
 อัตราความเร็วที่ใช้ในการสแกน = 30 วินาทีต่อหนึ่งแท่งโครมาทอด

3.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

นำแบคทีเรีย และยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่คัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วจากข้อ 3.3 มาทำการทดลองต่อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง รุ่น Marubishi Model MDL, Japan แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

3.4.1 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม และค่าไลเปสแอกทิวิตี ของกลุ่มยีสต์ เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

นำยีสต์ที่คัดเลือกแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract-malt extract broth (YM) บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเปิดเชื้อแบคทีเรียมาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวน้ำมันปาล์มดัดแปลงจาก พัชรวิภา ใจจักรคำ (2545) จากนั้นเลี้ยงยีสต์จนเข้าสู่ระยะกลางของช่วงทวีคูณ (mid- log phase) นำเซลล์ยีสต์มาคำนวณหาจำนวนเซลล์ ปรับจำนวนเซลล์ของยีสต์รวมทั้ง 7 สายพันธุ์ให้มีค่าเท่ากับหรือใกล้เคียง 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเปิดเซลล์แต่ละสายพันธุ์มา 5.7 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาณเซลล์รวมทั้งหมด 8×10^7 เซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงเอาน้ำเลี้ยงเชื้อออกเหลือเพียงตะกอนของเซลล์

นำตะกอนเซลล์ละลายใน 40 มิลลิลิตร ของอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น จากนั้นเปิดหัวเชื้อที่ได้ลงในถังปฏิกรณ์ซึ่งมีอาหารเหลวน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนอยู่ในถังปริมาตร 960 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์แบบกะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยคำนวณค่าอัตราการไหลของอาหารจากค่า Specific growth rate determination ที่ได้จากการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ที่เจริญได้ช้าที่สุด อัตราการให้

อากาศเท่ากับ 1 vvm ควบคุมค่าอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชอยู่ที่ 6.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงจนถึง 168 ชั่วโมง โดยเปิดมา 18 มิลลิลิตร มาทดสอบอัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์มด้วยวิธี TLC - FID ทดสอบไลเปสแอกทิวิตีตามวิธีของ Marianne และคณะ (1991) ตามข้อ 3.3.1 หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำตะกอนที่เหลือมาวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยวิธี DGGE ต่อไป

3.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและค่าไลเปสแอกทิวิตี ของกลุ่มแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 แต่นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเปิดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวน้ำมันปาล์ม ดัดแปลงจาก พัชรวิภา ใจจักรคำ (2545) แล้วเลี้ยงแบคทีเรียจนเข้าสู่ระยะกลางของช่วงทวีคูณ (mid - log phase) นำเซลล์แบคทีเรียมาคำนวณหาค่าจำนวนเซลล์ ปรับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ให้มีค่าเท่ากับหรือใกล้เคียง 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเปิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มา 13.3 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาณเซลล์รวมทั้งหมด 8×10^7 เซลล์นำไปปั่นเหวี่ยงเอาน้ำเลี้ยงเชื้อออกเหลือเพียงตะกอนของเซลล์ นำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายใน 40 มิลลิลิตร ของอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น คำนวณค่าอัตราการไหลของอาหาร โดยใช้ค่า Specific growth rate determination ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญได้ช้าที่สุดมาเป็นตัวกำหนดอัตราการไหลของ (flow rate) และทำการวิเคราะห์ผลตามข้อ 3.4.1

3.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและค่าไลเปสแอกทิวิตี ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) และเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว yeast extract- malt extract broth (YM) บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเปิดเชื้อแบคทีเรียมาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวน้ำมันปาล์ม ดัดแปลงจาก พัชรวิภา ใจจักรคำ (2545) จนเข้าสู่ระยะกลางของช่วงทวีคูณของแบคทีเรียและยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ปรับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ให้ได้

2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปิเปตยีสต์และแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มา 4 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์รวมทั้งหมด 8×10^7 เซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงเอาน้ำเลี้ยงเชื้อออกเหลือเพียงตะกอนของเซลล์ นำตะกอนเซลล์มาละลายใน 40 มิลลิลิตร ของอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น โดยคำนวณค่าอัตราการไหลของอาหาร และใช้ค่า Specific growth rate determination ของแบคทีเรียหรือยีสต์สายพันธุ์ที่เจริญได้ช้าที่สุดมาเป็นตัวกำหนดอัตราการไหลของ (flow rate) จากนั้นดำเนินการตามข้อ 3.4.1.

3.5 ศึกษาพลวัตของจุลินทรีย์ (microbial dynamics) ในถังปฏิกรณ์หลังจากเลี้ยงแบบต่อเนื่องจนถึงสภาวะเสถียร (steady state) โดยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

3.5.1 สกัดดีเอ็นเอ

นำตะกอนที่ได้จากข้อ 3.4.1 3.4.2 และ 3.4.3 มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.2.1

3.5.2 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis

เมื่อสกัดดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่ได้ตามวิธีในข้อ 3.2.2

3.5.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.5.3.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ D1 region ของยีสต์

โดยใช้ไพรเมอร์ NL1+GC (5'-GCG GGC CGC GCG ACC GCC GGG ACG CGC GAG CCG GCG GCG GGC CAT ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG-3') ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และไพรเมอร์ LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3') (Cocolin และคณะ, 2000)

สารละลาย KAPA2G Robust HotStart 11.1 ไมโครลิตร น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 11 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ 338F 1 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ 518R 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไพรเมอร์เป็น 10 ไมโครโมล (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตร รวมส่วนผสมทั้งหมดในหลอด PCR จะมีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาโดยใช้พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. Initial denaturation step | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที |
| 2. Denaturation step | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที |
| 3. Annealing step | อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที |
| 4. Extension step | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที |
| ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ | |
| 5. Final extension | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยใช้วุ้นความเข้มข้น 2% โดยซึ่งผงวุ้นหนัก 2 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสเพอร์ (100 bp DNA ladder)

3.5.3.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

โดยใช้ไพรเมอร์ 338F + CG (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG CAC GGG GGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') ซึ่งมี GC clamp เชื่อมต่อบริเวณ 5' และไพรเมอร์ 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GG-3') (DeJournett และคณะ, 2007) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความยาวประมาณ 200 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้

สารละลาย KAPA2G Robust HotStart 11.1 ไมโครลิตร น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 11 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ 338F 1 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ 518R 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไพรเมอร์เป็น 10 ไมโครโมล (ของแต่ละตัว) สารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตร รวมส่วนผสมทั้งหมดในหลอด PCR จะมีปริมาตรสุทธิ

25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นดำเนินการปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. Initial denaturation step | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที |
| 2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ | |
| 2.1 Denaturation step | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที |
| 2.2 Annealing step | อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
(ลดอุณหภูมิลดลงทีละ 0.5 องศาเซลเซียส ในแต่ละรอบ) |
| 2.3 Extension step | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที |
| 3. Denaturation step | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที |
| 4. Annealing step | อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที |
| 5. Extension step | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที |
| 6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ | |
| 7. Final extension | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยใช้วุ้นความเข้มข้น 2% โดยซึ่งผงวุ้นหนัก 2 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสแพร์ (100 bp DNA ladder)

3.5.4 วิเคราะห์สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ในการวิเคราะห์ DGGE ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Biorad, USA) โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30 - 60 เปอร์เซ็นต์ จากสารละลาย denaturant 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหัวไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งข้ามคืนให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแทมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิ

ประมาณ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมดกับสปีดติดตาม หยดลงในช่องวิ่ง จากนั้นเปิดสวิทช์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านชุดเจลแซนวิชและบัฟเฟอร์ TAE จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ นาน 5 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วย สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่องตรวจสอบเจล

ตัดชิ้นพอลิอะคริลาไมด์เจลบริเวณแถบดีเอ็นเอเด่นใส่ลงในหลอดไมโครพิพซ์ เติมน้ำกลั่น ปลอดประจุปลอดเชื้อ 20 ไมโครลิตร แซ่ชิ้นเจลไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 20-24 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาจากเจลให้มากที่สุด เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามวิธีการในข้อ 3.5.4 จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาไหลลงในพอลิอะคริลาไมด์เจลอีกครั้งเพื่อยืนยันผลว่าแถบดีเอ็นเอที่ตัดมาได้นั้นเป็นแถบดีเอ็นเอเดี่ยวจริง จากนั้นตัดชิ้นพอลิอะคริลาไมด์เจลบริเวณแถบดีเอ็นเอเดี่ยวในแต่ละแถบ นำมาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และนำไปส่งวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

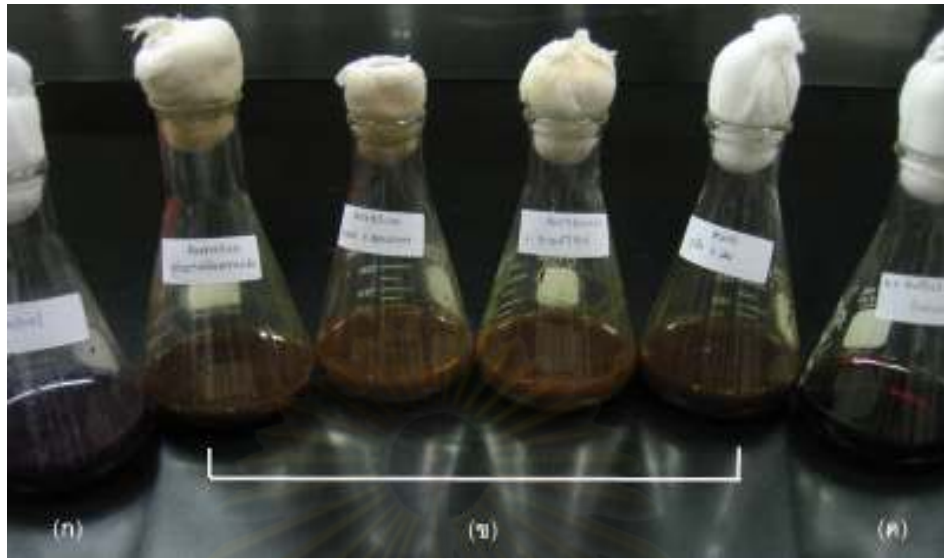
4.1 คัดแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส

4.1.1 เก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส

จากการเก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อคัดแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปสจำนวน 14 แห่ง นำมาบ่มในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและมีอินดิเคเตอร์ คือ bromocresol purple ตามสูตรอาหารดัดแปลงจาก สุรอรุณ ศุภจัตุรัส (2545) มีตัวอย่างดินและน้ำเพียง 6 แห่งเท่านั้น (ตารางที่ 4.1) ที่เปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองอย่างชัดเจน ภายในระยะเวลา 36 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดินและน้ำเหล่านั้นมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเปส โดยปล่อยไลเปสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายแหล่งคาร์บอนคือน้ำมันปาล์ม ซึ่งน้ำมันปาล์มมีคุณสมบัติเป็นไตรกลีเซอไรด์ เมื่อถูกย่อยแล้วจะมีการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) และเมื่อมีกรดเกิดขึ้นจะส่งผลให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำ

รหัสเชื้อ	แหล่งที่คัดแยก	จำนวนแบคทีเรียและยีสต์ (ไอโซเลท)
C	ดินรอบบริเวณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	9
L	ดินจาก ภูเรือ จ. เลย	12
S	น้ำทิ้งข้างโรงอาหาร โรงเรียนวิสุทธิกษัตริย์ จ.สมุทรปราการ	11
T	ดินรอบบริเวณร้านอาหาร จ. สมุทรปราการ	5
V	แหล่งน้ำรอบมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	12
Y	ดินจากสวนปาล์ม จ. ประจวบคีรีขันธ์	8
	รวม	57



รูปที่ 4.1 ลักษณะของอาหารเหลวน้ำมันปาล์มที่มีอินดิเคเตอร์คือ bromocresol purple (ก) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวอย่างดิน (ข) ตัวอย่างแหล่งดินที่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์อย่างชัดเจน (ค) ตัวอย่างแหล่งดินที่ไม่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์



รูปที่ 4.2 ลักษณะของอาหารเหลวน้ำมันปาล์มที่มีอินดิเคเตอร์คือ bromocresol purple (ก) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวอย่างแหล่งน้ำ (ข) ตัวอย่างแหล่งน้ำที่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์อย่างชัดเจน (ค) ตัวอย่างแหล่งน้ำที่ไม่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์

4.1.2 คัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปสอย่างน้อย 50 ไอโซเลท

นำตัวอย่างดินและน้ำที่มีการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ bromocresol purple มาคัดแยกแบคทีเรียและยีสต์ที่มีความสามารถผลิตไลเปส โดยอาหารที่ใช้คัดแยกคืออาหารแข็งไตรบูทูไทริน (Tributylin agar plate) ดัดแปลงจาก พัชรวิภา ใจจักรคำ (2545) เนื่องจากไตรบูทูไทรินเป็นไตรกลีเซอไรด์มาตรฐานที่นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ โดยวัดความกว้างจากบริเวณใสที่เกิดขึ้น และทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างรัศมีบริเวณใสได้มากกว่า 0.3 เซนติเมตรภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างดินและน้ำทั้งหมด 6 ตัวอย่างเมื่อนำมาคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ได้ทั้งหมด 57 ไอโซเลท โดยทั้งหมด 57 ไอโซเลทนั้น มี 33 ไอโซเลทที่สามารถสร้างรัศมีบริเวณใสบนอาหารแข็งไตรบูทูไทรินได้มากกว่า 0.3 เซนติเมตรภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 รัศมีวงใสของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็งไตรบูทูไทริน

รหัสจุลินทรีย์	ประเภทของจุลินทรีย์	รัศมีบริเวณใสบนอาหารแข็งไตรบูทูไทริน (เซนติเมตร)	จุลินทรีย์ที่มีความสามารถสร้างรัศมีบริเวณใสได้บนอาหารแข็งน้ำมันปาล์ม
C1	-	0.1	-
C2	-	-	-
C3	ยีสต์	0.5	-
C4	ยีสต์	0.5	+
C5	ยีสต์	0.5	-
C6	ยีสต์	0.5	+
C7	ยีสต์	0.5	+
C8	แบคทีเรีย	0.6	-
C9	-	-	-
L1	-	-	-
L2	แบคทีเรีย	1.0	-

รหัส จุลินทรีย์	ประเภทของ จุลินทรีย์	รัศมีบริเวณไฮ บนอาหารแข็ง ไตรนูไทริน (เซนติเมตร)	จุลินทรีย์ที่มีความสามารถ สร้างรัศมีบริเวณไฮได้บน อาหารแข็งน้ำมันปาล์ม
L3	-	0.2	-
L4	-	0.2	-
L5	ยีสต์	0.5	-
L6	แบคทีเรีย	0.5	-
L7	ยีสต์	0.6	-
L8	ยีสต์	0.5	-
L9	ยีสต์	0.6	+
L10	ยีสต์	0.8	-
L11	ยีสต์	0.4	+
L12	ยีสต์	1.0	-
S1	ยีสต์	0.6	-
S2	แบคทีเรีย	0.5	-
S3	-	-	-
S4	ยีสต์	0.8	+
S5	แบคทีเรีย	0.8	-
S6	-	-	-
S7	ยีสต์	0.7	-
S8	แบคทีเรีย	0.8	-
S9	ยีสต์	0.5	-
S10	ยีสต์	0.5	-
S11	ยีสต์	0.5	-
T1	แบคทีเรีย	0.7	-
T2	-	0.1	-
T3	แบคทีเรีย	0.7	+

รหัส จุลินทรีย์	ประเภทของ จุลินทรีย์	รัศมีบริเวณใส บนอาหารแข็ง ไตรนูไทริน (เซนติเมตร)	จุลินทรีย์ที่มีความสามารถ สร้างรัศมีบริเวณใสได้บน อาหารแข็งน้ำมันปาล์ม
T4	-	0.1	-
T5	-	0.1	-
V1	แบคทีเรีย	0.3	+
V2	-	-	-
V3	แบคทีเรีย	0.6	+
V4	-	-	-
V5	-	-	-
V6	-	-	-
V7	แบคทีเรีย	0.3	-
V8	-	-	-
V9	-	0.2	-
V10	-	-	-
V11	แบคทีเรีย	0.4	-
V12	-	-	-
Y1	ยีสต์	0.2	-
Y2	ยีสต์	0.6	+
Y3	ยีสต์	0.3	+
Y4	ยีสต์	0.4	+
Y5	-	0.1	-
Y6	-	-	-
Y7	แบคทีเรีย	-	-
Y8	-	-	-

หมายเหตุ + แสดงว่าจุลินทรีย์นั้นมีความสามารถในการสร้างบริเวณใสได้บนอาหารแข็งน้ำมันปาล์ม

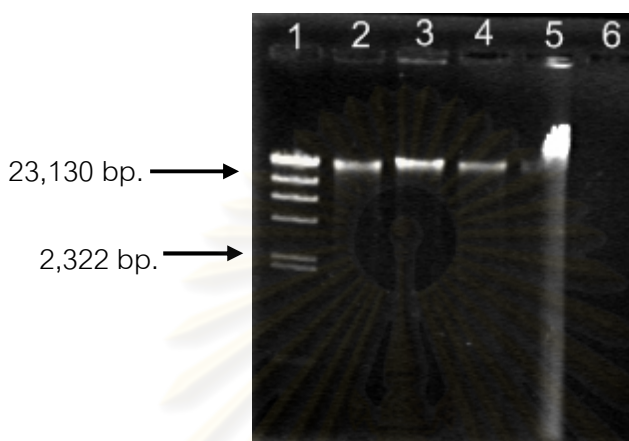
นำ 33 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างรัศมีบริเวณใสได้มากกว่า 0.3 เซนติเมตรบนอาหารแข็ง ไตรบูไทรีนภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเปสบนอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนดัดแปลงจากสูตรของ พัชรวิภา ใจจักรคำ (2545) พบว่าจาก 33 ไอโซเลทที่นำมาทดสอบนั้น มีเพียง 12 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถสร้างบริเวณใสได้บนอาหารแข็ง น้ำมันปาล์ม จุลินทรีย์อีกจำนวนหนึ่งที่สามารถสร้างไลเปสและย่อยไตรบูไทรีนให้บริเวณใสที่เห็นชัดเจนแต่ไม่มีบริเวณใสให้เห็นในน้ำมันปาล์มนั้นอาจจะเกิดจากโครงสร้างของไตรบูไทรีนนั้นเป็นโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์สายสั้น ทำให้ง่ายต่อการย่อยสลาย แต่น้ำมันปาล์มไม่ใช่ไขมันมาตรฐานที่นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเปสโดยดูจากความสามารถในการสร้างบริเวณใส เนื่องจากน้ำมันปาล์มมีโครงสร้างเป็นไตรกลีเซอไรด์สายยาว ทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ยากกว่า บริเวณใสที่เกิดขึ้นจึงมองเห็นไม่ชัดเจนเท่ากับบริเวณใสที่สร้างขึ้นบนอาหารแข็งไตรบูไทรีน รายงานการวิจัยก่อนหน้านี้โดยปกติมักใช้ไตรบูไทรีนหรือน้ำมันมะกอก ซึ่งเป็นไขมันมาตรฐานที่จะสามารถมองเห็นบริเวณใสได้อย่างชัดเจนเป็นน้ำมันทดสอบ การที่จุลินทรีย์ 12 ไอโซเลทให้บริเวณใสที่เห็นชัดเจนในน้ำมันปาล์มอาจเป็นเพราะจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ได้มาก หรือเอนไซม์ที่สร้างขึ้นเหมาะสมกับน้ำมันปาล์ม จากผลการทดลองจึงคัดเลือกจุลินทรีย์ 12 ไอโซเลทดังกล่าว มาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้

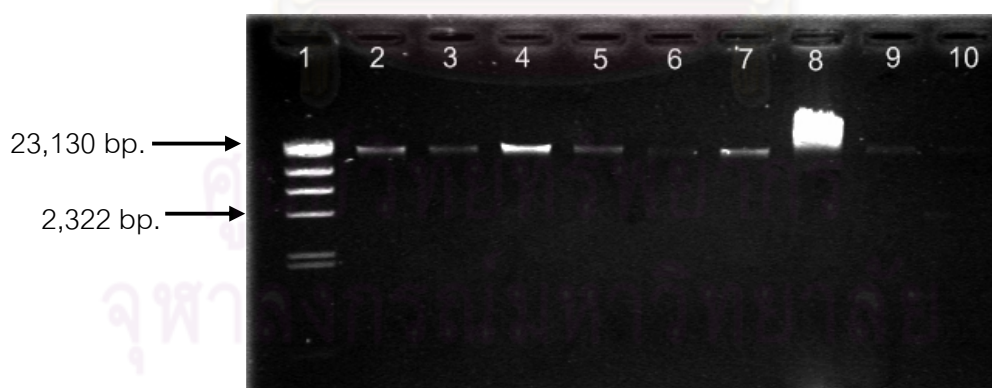
4.2.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

จากการพิสูจน์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจุลินทรีย์ทั้งหมด 12 ไอโซเลท เบื้องต้น พบว่าใน 12 ไอโซเลทนั้น มี 9 ไอโซเลทเป็นยีสต์ และ อีก 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย ซึ่งประกอบด้วย 2 ไอโซเลท ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ 1 ไอโซเลทที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้นั้น จึงต้องใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละประเภท โดยเริ่มจากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียและยีสต์ในอาหารเหลว NB และอาหารเหลว YM ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Cocolin และคณะ (2000) ซึ่งเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์ แต่เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้เช่นกัน ดังนั้นจึงใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอนี้กับทั้งเซลล์แบคทีเรียและยีสต์ ดังรูป 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ

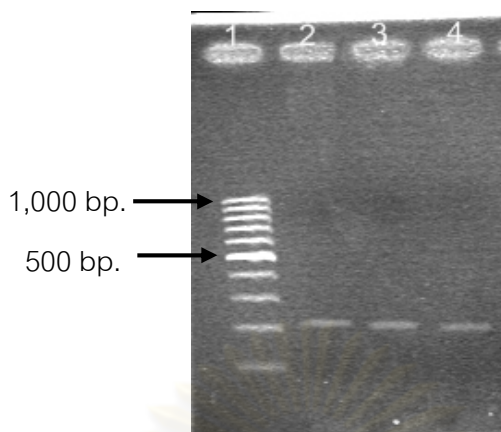
ในส่วนของแบคทีเรีย เมื่อสกัดดีเอ็นเอได้แล้ว นำไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยไพรเมอร์ 338F และ 518R (DeJournett และคณะ, 2007) ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 200 bp เท่ากันหมดในทุกไอโซเลท ดังรูป 4.5



รูปที่ 4.3 Genomic DNA ของแบคทีเรีย จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: lamda /HinDIII marker ช่องวิ่งที่ 2: แบคทีเรียรหัส T3 ช่องวิ่งที่ 3: แบคทีเรียรหัส V1 ช่องวิ่งที่ 4: แบคทีเรียรหัส V3 ช่องวิ่งที่ 5: Positive control-Genomic DNA ของ *E. coli* ช่องวิ่งที่ 6: Negative control



รูปที่ 4.4 Genomic DNA ของยีสต์ จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: lamda /HinDIII marker ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์รหัส C4 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์รหัส C6 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์รหัส C7 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 6: ยีสต์รหัส L11 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์รหัส S4 ช่องวิ่งที่ 8: ยีสต์รหัส Y2 ช่องวิ่งที่ 9: ยีสต์รหัส Y3 ช่องวิ่งที่ 10: ยีสต์รหัส Y4



รูปที่ 4.5 PCR product ของแบคทีเรีย จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2: แบคทีเรียรหัส T3 ช่องวิ่งที่ 3: แบคทีเรียรหัส V1 ช่องวิ่งที่ 4: แบคทีเรียรหัส V3



รูปที่ 4.6 PCR product ของยีสต์ จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์รหัส C4 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์รหัส C6 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์รหัส C7 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 6: ยีสต์รหัส L11 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์รหัส S4 ช่องวิ่งที่ 8: ยีสต์รหัส Y2 ช่องวิ่งที่ 9: ยีสต์รหัส Y3 ช่องวิ่งที่ 10: ยีสต์รหัส Y4

ในส่วนของยีสต์ เมื่อสกัดดีเอ็นเอได้แล้วนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacers region ด้วยไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4R ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีความยาวแตกต่างกันออกไปตามแต่ละสายพันธุ์ของยีสต์ โดยจะมีขนาดอยู่ในช่วง 900 - 300 bp ตามรายงานของ Korabecna (2007) จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR จากยีสต์ทั้งหมด 9 ไอโซเลท

พบว่า 7 ไอโซเลทมีขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 550 bp 1 ไอโซเลทที่มีขนาดประมาณ 600 bp และพบ 1 ไอโซเลทที่มีขนาดประมาณ 400 bp ดังรูป 4.6

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากทั้งหมด 12 ไอโซเลท มาทำให้บริสุทธิ์ตามข้อ 3.3.3.4 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้วิเคราะห์หา ลำดับนิวคลีโอไทด์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ตามข้อ 3.3.3.5

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank พบว่าในกลุ่มของยีสต์ 9 ไอโซเลท ยีสต์รหัส C4 C6 และ C7 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับยีสต์สายพันธุ์เดียวกัน คือ *Candida* sp.CBS 10854 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 95% จึงเลือกใช้รหัส C7 เป็นตัวแทนของยีสต์สายพันธุ์นี้ในการทดลองขั้นต่อไป ยีสต์รหัส L9 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* strain Vaucher โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 98% ยีสต์รหัส L11 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* strain 131 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 99% ยีสต์รหัส S4 มีลำดับเบสเหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida boidinii* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 100% ยีสต์รหัส Y2 มีลำดับเบสเหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 100% ยีสต์รหัส Y3 และยีสต์รหัส Y4 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida albican* และ *Pichia Jadinii* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 99%

ในกลุ่มของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วพบว่า แบคทีเรียรหัส T3 และ V3 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 100% และ 96% ตามลำดับ และแบคทีเรียรหัส V1 มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของ *Pseudomonas* sp. โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 100%

ดังนั้นจากการทดลองในขั้นแรกทำให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสและย่น้ำมันปาล์มได้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบไปด้วย ยีสต์ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ และแบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในตาราง 4.3

ตาราง 4.3 สายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์ที่คัดแยกได้พร้อมแสดงการเกิดบริเวณในสายของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งไตรอบูเทริน

รหัส จุลินทรีย์	ชนิด จุลินทรีย์	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	ลักษณะโคโคไคน์ บนอาหารแข็งไตรอบูเทริน	ภาพแสดงการเกิดบริเวณในสายของ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง ไตรอบูเทริน
C7	ยีสต์	<i>Candida</i> sp.CBS 10854	โคโคไคน์สีขาว ผิวหน้าโคโคไคน์เรียบ ฐานเล็กน้อย ขอบโคโคไคน์เรียบ	
L9	ยีสต์	<i>Candida tropicalis</i> strain Vaucher	โคโคไคน์สีขาวครีม ผิวหน้าโคโคไคน์เรียบ ผิวด้าน นูนสูง ขอบโคโคไคน์เรียบ	

รหัส จุดินทรีย์	ชนิด จุดินทรีย์	สายพันธุ์จุดินทรีย์ที่คัดแยกได้	ลักษณะโคโคไลเน บนอาหารแข็งไตรบูเทริน	ภาพแสดงการเกิดบริเวณใสของ จุดินทรีย์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง ไตรบูเทริน
L11	ยีสต์	<i>Candida tropicalis</i> strain 131	โคโคไลเนสีขาว ผิวหน้าโคโคไลเนเรียบ ผิวด้านผิว โคโคไลเนขนาน ขอบโคโคไลเนเรียบ	
S4	ยีสต์	<i>Candida boidinii</i>	โคโคไลเนสีขาว ผิวหน้าโคโคไลเนเรียบ ผิวด้านผิว โคโคไลเนขนาน ขอบโคโคไลเนหยาบ	

รหัส จุดินทรีย์	ชนิด จุดินทรีย์	สายพันธุ์จุดินทรีย์ที่คัดแยกได้	ลักษณะโคโคเน่ บนอาหารแข็งไตรบูเทริน	ภาพแสดงการเกิดบริเวณในของ จุดินทรีย์ที่คัดเลือกได้บนอาหารแข็ง ไตรบูเทริน
Y2	ยีสต์	<i>Yarrowia lipolytica</i>	โคโคเน่สีครีม ผิวหน้าโคโคเน่หยักเป็นคลื่น ผิว โคโคเน่ขรุขระ ขอบโคโคเน่หยัก	
Y3	ยีสต์	<i>Candida albican</i>	โคโคเน่สีขาว ผิวหน้าโคโคเน่เรียบ มันวาว ขุน เล็กน้อย ขอบโคโคเน่เรียบ	

รหัส จุดเริ่มต้น	ชนิด จุดเริ่มต้น	สายพันธุ์จุดเริ่มต้นที่คัดแยกได้	ลักษณะโคโคโคน บนมอาหารแข็ง ไตรบูเทริน	ภาพแสดงการเกิดบริเวณในของ จุดเริ่มต้นที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง ไตรบูเทริน
Y4	ยีสต์	<i>Pichia jadinii</i>	โคโคโคนสีขาว ขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโคโคนเรียบ แบน ราบ ขอบโคโคโคนเรียบ	
T3	แบคทีเรีย	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis strain E28</i>	โคโคโคนสีขาวขุ่น โคโคโคนแผ่ขยาย ผิวหน้าโคโคโคน เป็นคลื่น แบนราบ ขอบโคโคโคนหยัก	

รหัส จุดเริ่มต้น	ชนิด จุดเริ่มต้น	สายพันธุ์จุดเริ่มต้นที่คัดแยกได้	ลักษณะโคโคไนต์ บนอาหารแข็ง 1 ทรายูเทริน	ภาพแสดงการเกิดบริเวณในของ จุดเริ่มต้นที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง 1 ทรายูเทริน
V1	แบคทีเรีย	<i>Pseudomonas</i> sp.	โคโคไนต์สีขาวครีม ผิวหน้าโคโคไนต์เป็นคลื่น กลาง โคโคไนต์สีเหลืองตรงกลาง ขอบโคโคไนต์เรียบ	
V3	แบคทีเรีย	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain A17	โคโคไนต์สีน้ำตาลอ่อน ผิวหน้าโคโคไนต์เป็นคลื่น แบนราบ ขอบโคโคไนต์หยัก	

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและไลเปสแอกทิวิตีจากแบคทีเรียและ ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 10 อันดับแรก

4.3.1 ศึกษาการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมันปาล์ม

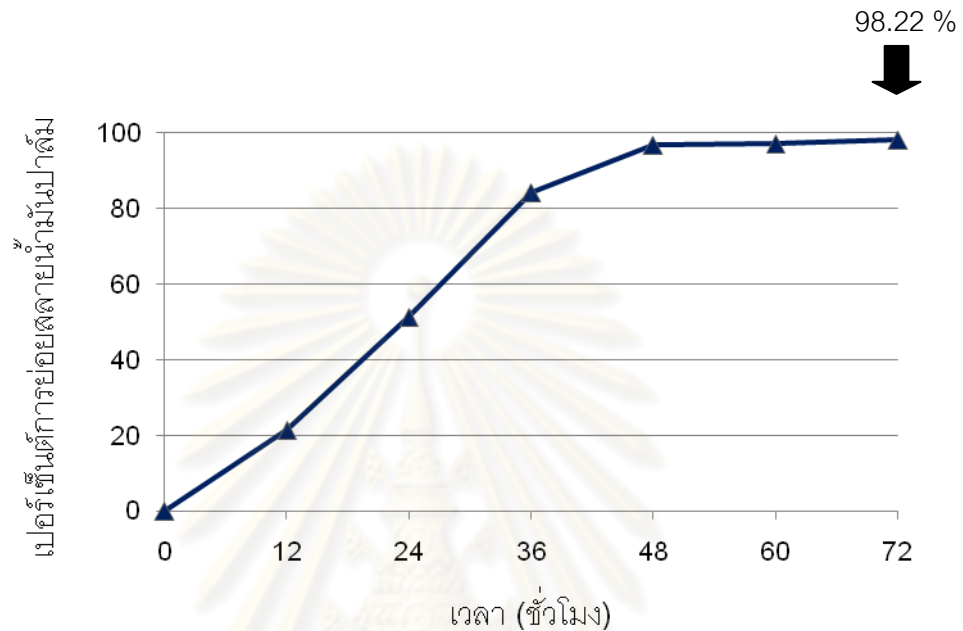
ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมันปาล์ม ดัดแปลงจากสูตรของ พัชรวิภา ใจจักรคำ (2545) โดยเริ่มจากการเลี้ยงแบคทีเรียและยีสต์ในอาหารเหลว NB และ YM ก่อนเป็นเวลา เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ปิเปิดเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารน้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร (4% inoculums) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 28 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 nm. นับจำนวนเซลล์ และหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียและยีสต์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวน้ำมันปาล์ม พบว่าที่ประมาณ 16 ชั่วโมงของการเจริญ ทุกสายพันธุ์เจริญอยู่ในช่วงการเพิ่มแบบทวีคูณ จึงเลือกเวลาที่ 16 ชั่วโมง มาใช้เป็นเวลาในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อทำเป็นหัวเชื้อ inoculums ในการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ต่อไป ซึ่งที่ 16 ชั่วโมงนั้นแบคทีเรียและยีสต์จะมีจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นก่อนนำมาทำเป็นหัวเชื้อในการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์จึงต้องมีการปรับจำนวนเซลล์ให้เท่ากันก่อน โดยปรับจำนวนเซลล์ให้ได้เท่ากับ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

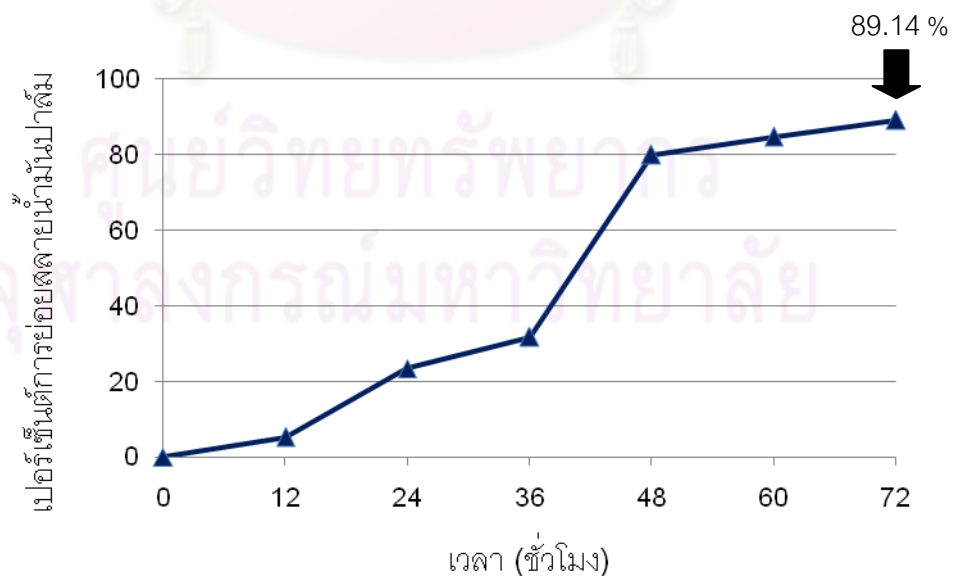
4.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์และหาค่าไลเปสแอกทิวิตีจากแบคทีเรียและยีสต์ทั้ง 10 สายพันธุ์

เมื่อเลี้ยงหัวเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ตามข้อ 4.3.1 แล้ว ปิเปิด 2 มิลลิลิตรของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวน้ำมันปาล์มที่มีการปรับปริมาณเชื้อให้เท่ากับ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ดัดแปลงจากสูตรของ Matsumiya และคณะ (2007) ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำมาหาค่าการเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม และค่าไลเปสแอกทิวิตี

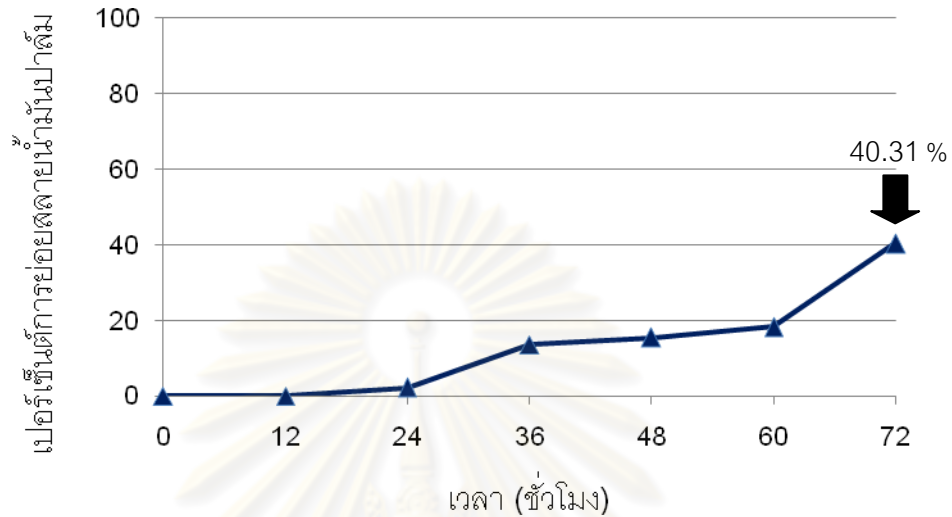
4.3.2.1 การหาค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์



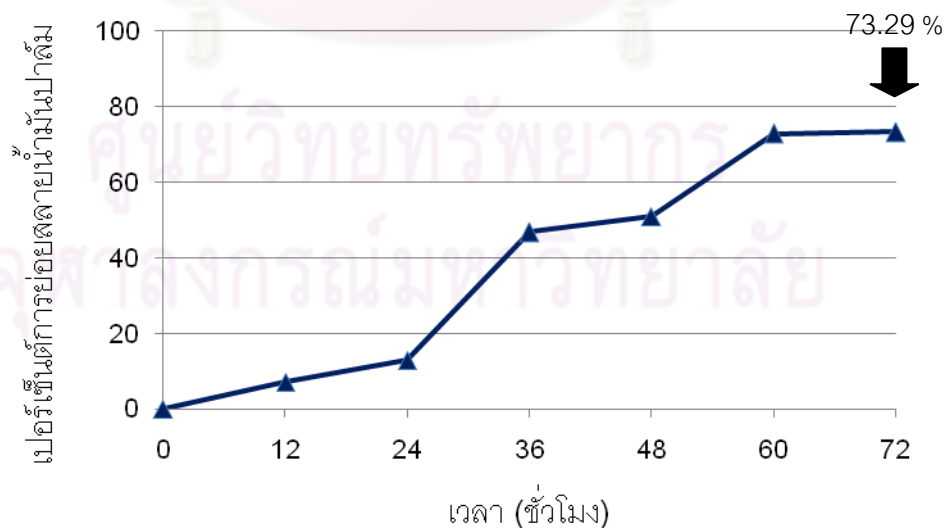
รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส C7 (*Candida* sp.CBS 10854)



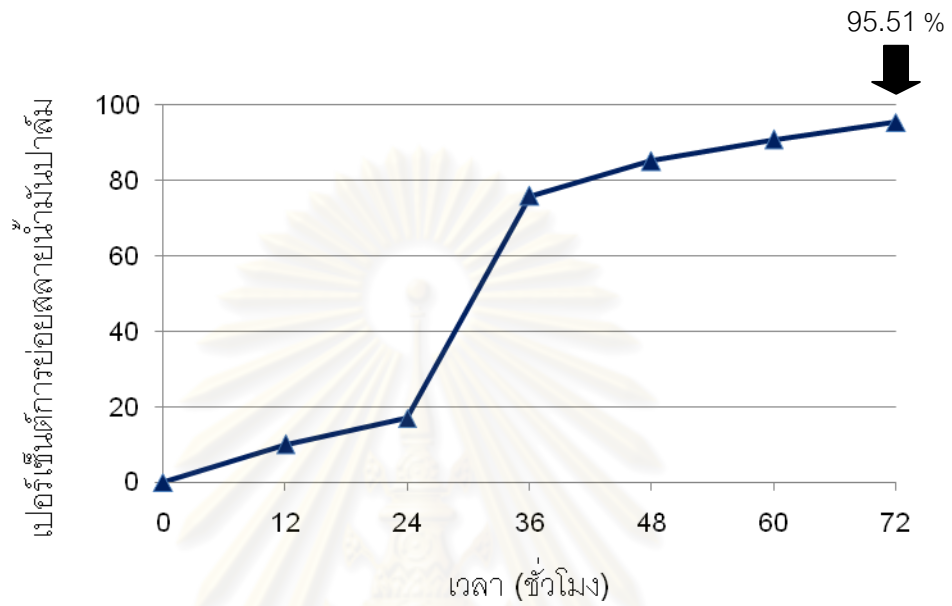
รูปที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส L9
(*Candida tropicalis* strain Vaucher)



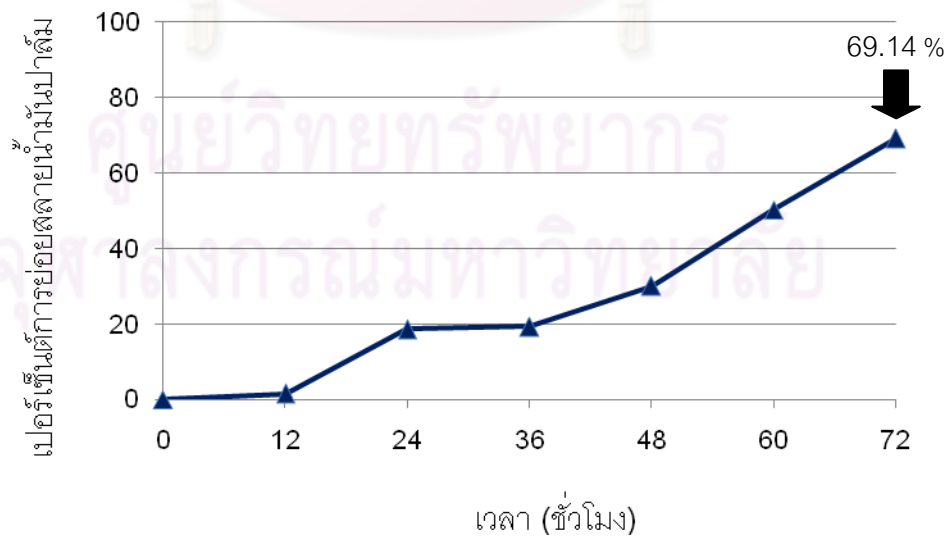
รูปที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส L11
(*Candida tropicalis* strain 131)



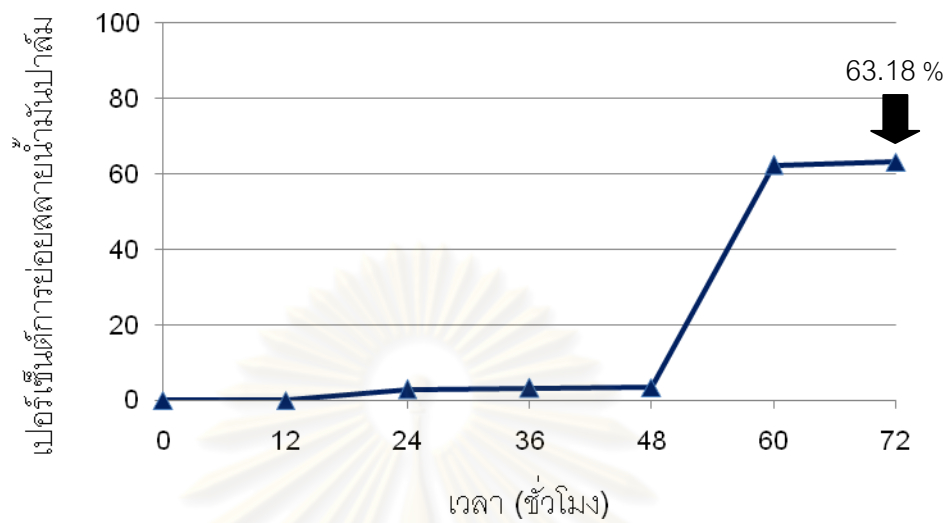
รูปที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์รหัส S4
(*Candida boidinii*)



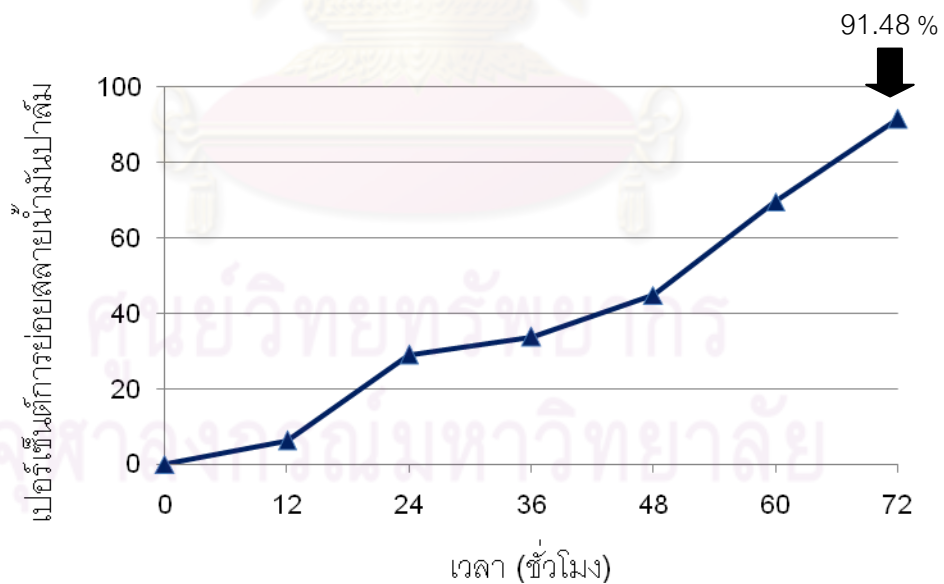
รูปที่ 4.11 เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์ยีสต์ Y2 (*Yarrowia lipolytica*)



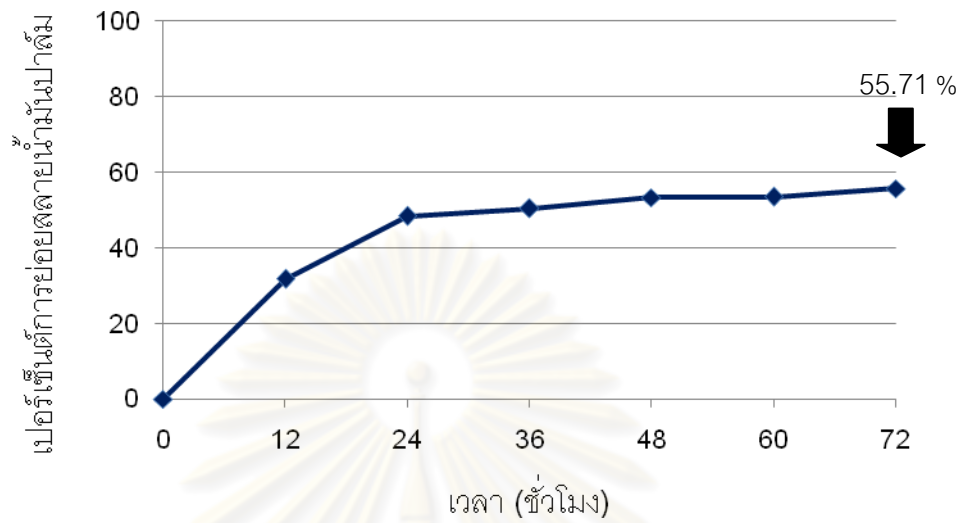
รูปที่ 4.12 เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์ยีสต์ Y3 (*Candida albican*)



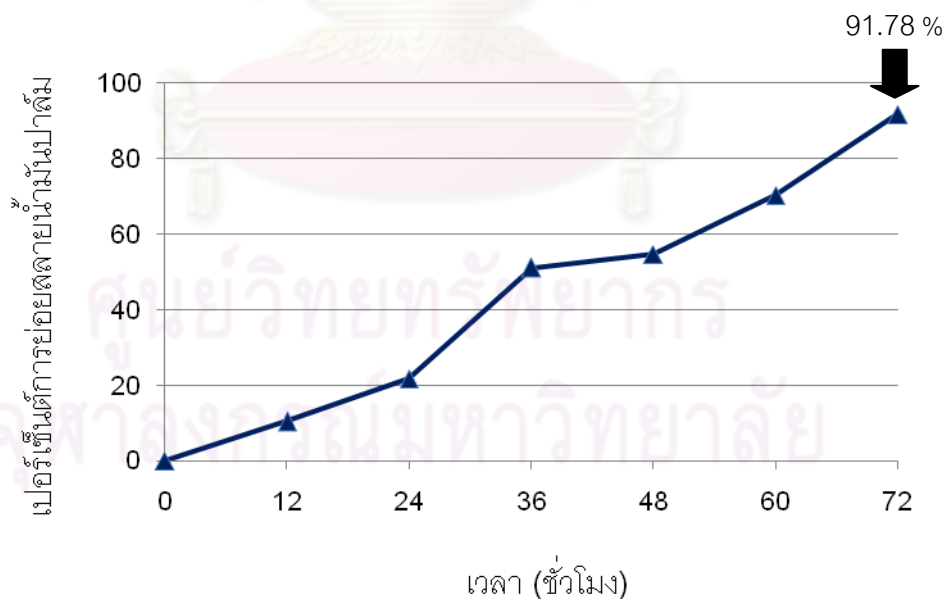
รูปที่ 4.13 เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส Y4 (*Pichia Jadinii*)



รูปที่ 4.14 เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส T3 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28)



รูปที่ 4.15 เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส V1 (*Pseudomonas* sp.)



รูปที่ 4.16 เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์โดย จุลินทรีย์รหัส V3 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17)

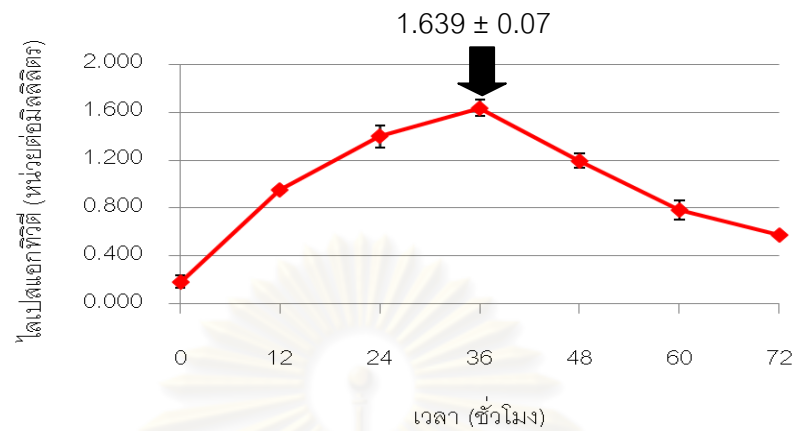
จากผลการทดลองการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่เลี้ยงในขวดเขย่า พบว่า ยีสต์ *Candida* sp.CBS 10854 (จุลินทรีย์รหัส C7) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์คัดเลือกทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ ได้ 98.22 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และบ่มที่เครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

ในกลุ่มของยีสต์ ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เป็นอันดับที่ 2 รองจาก *Candida* sp.CB 10854 คือ *Yarrowia lipolytica* (จุลินทรีย์รหัส Y2) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 95.51 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Candida tropicalis* strain Vaucher (จุลินทรีย์รหัส L9), *Candida boidinii* (จุลินทรีย์รหัส S4), *Candida albican* (จุลินทรีย์รหัส Y3), *Pichia Jadinii* (จุลินทรีย์รหัส Y4), สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 89.14, 73.29 , 69.14 , 63.18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ *Candida tropicalis* strain 131 (จุลินทรีย์รหัส L11) มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้น้อยที่สุดในกลุ่มยีสต์ที่คัดเลือกได้ โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 40.31 เปอร์เซ็นต์

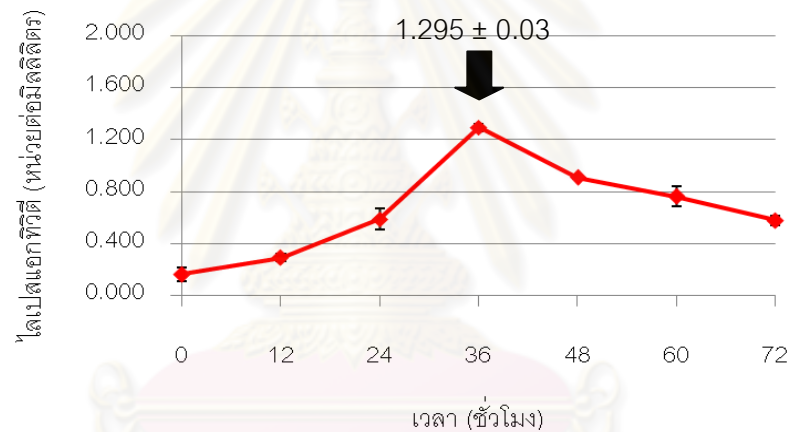
ในส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทั้งหมด 3 สายพันธุ์นั้น พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากที่สุด คือ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 (จุลินทรีย์รหัส V3) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 91.78 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (จุลินทรีย์รหัส T3) มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ใกล้เคียงกันคือ 91.48 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ อาจเนื่องจากเป็นแบคทีเรียในสายพันธุ์เดียวกันดังนั้นจึงมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ใกล้เคียงกัน และแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้น้อยที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดคือแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. (จุลินทรีย์รหัส V1) โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 55.71 เปอร์เซ็นต์

4.3.2.2 การหาค่าไลเปสแอกทิวิตีในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์คัดเลือก

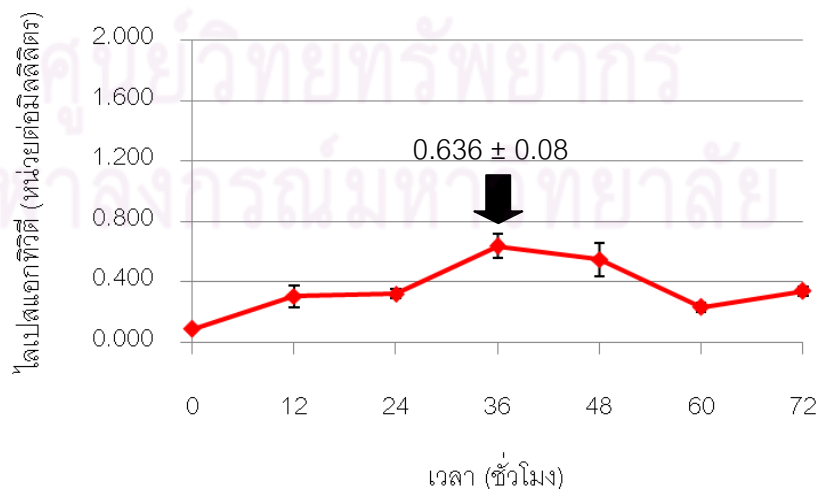
10 สายพันธุ์



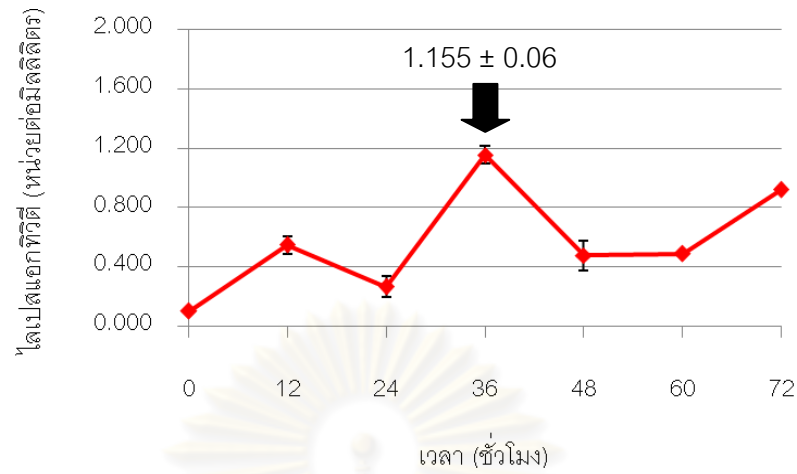
รูปที่ 4.17 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส C7 (*Candida* sp.CBS 10854)



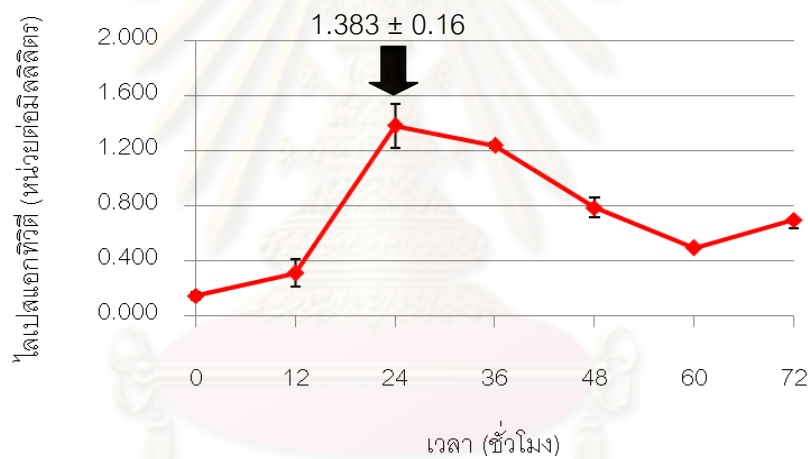
รูปที่ 4.18 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส L9 (*Candida tropicalis* strain Vaucher)



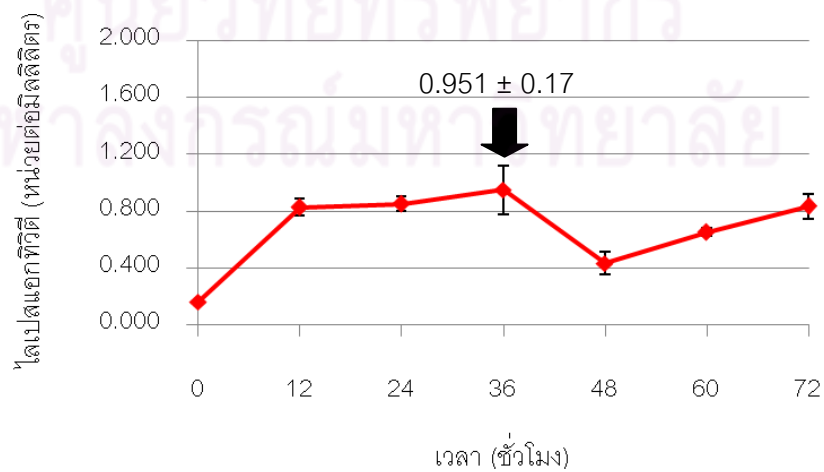
รูปที่ 4.19 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส L11 (*Candida tropicalis* strain 131)



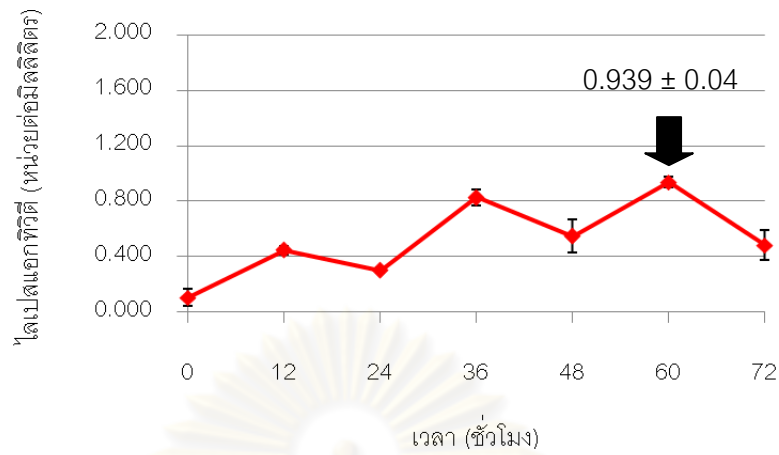
รูปที่ 4.20 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส S4 (*Candida boidinii*)



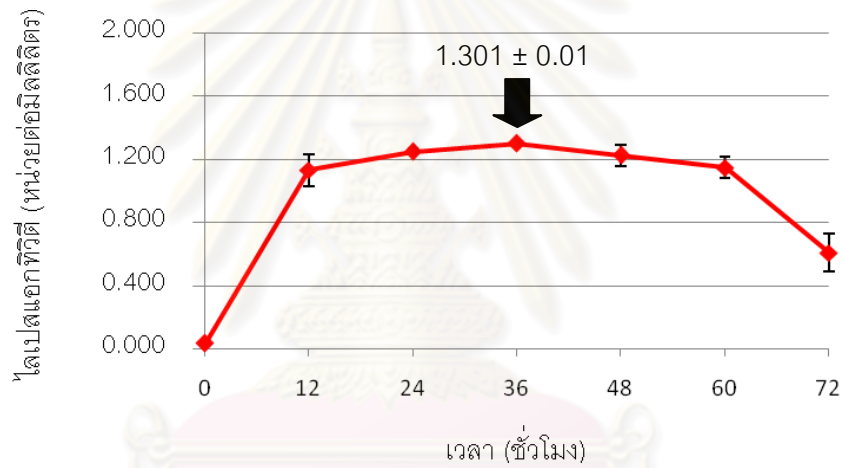
รูปที่ 4.21 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส Y2 (*Yarrowia lipolytica*)



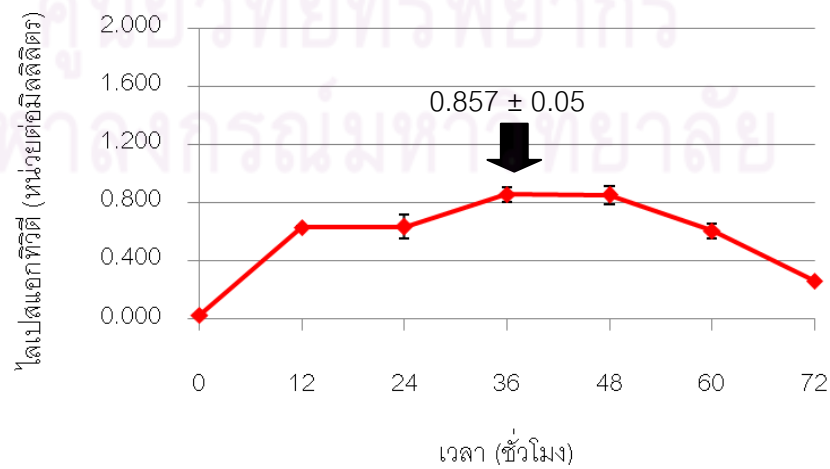
รูปที่ 4.22 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส Y3 (*Candida albican*)



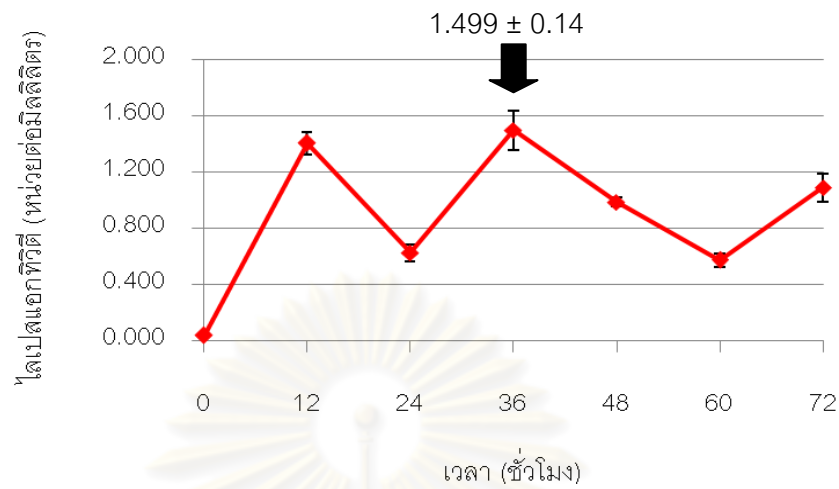
รูปที่ 4.23 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส Y4 (*Pichia jadinii*)



รูปที่ 4.24 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส T3 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28)



รูปที่ 4.25 ค่าไลเปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส V1 (*Pseudomonas* sp.)



รูปที่ 4.26 ค่าได้เปสแอกทิวิตีผลิตโดย จุลินทรีย์รหัส V3 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17)



รูปที่ 4.27 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส *p*-nitrophenyl acetate เมื่อเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร (ก) ซับสเตรทแบบค์ (ข) เอนไซม์แบบค์ (ค) ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส *p*-nitrophenyl acetate ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

จากการหาค่าไลเปสแอกทิวิตีของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ พบว่า จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตค่าไลเปสแอกทิวิตีมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน คือ *Candida sp.*CBS 10854 (จุลินทรีย์รหัส C7) ซึ่งสามารถผลิตค่าไลเปสแอกทิวิตีได้สูงถึง 1.639 ± 0.067 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการบ่มในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าไลเปสแอกทิวิตีพบว่า มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม เนื่องจาก *Candida sp.*CBS 10854 สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากที่สุดคือ 98.22 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มของยีสต์ที่คัดเลือกได้นั้น ยีสต์ที่ผลิตไลเปสแอกทิวิตีได้มารองลงมาคือ *Yarrowia lipolytica* (จุลินทรีย์รหัส Y2) ซึ่งมีค่าไลเปสแอกทิวิตี 1.383 ± 0.156 หน่วยต่อมิลลิลิตร และยีสต์ที่ผลิตไลเปสแอกทิวิตีออกมาได้น้อยสุดคือ *Pichia jadinii* (จุลินทรีย์รหัส Y4) ซึ่งมีค่าไลเปสแอกทิวิตี 0.939 ± 0.041 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยค่าไลเปสแอกทิวิตีที่ได้มีสัมพันธ์กับค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์เนื่องจากสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่คัดเลือกได้อีก 6 สายพันธุ์ คือสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 63.18 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาค่าไลเปสแอกทิวิตีของยีสต์ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ที่คัดเลือก ยีสต์ในกลุ่ม *Candida sp.* ทั้ง 5 สายพันธุ์ จะมีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง ของการบ่มในน้ำเสียสังเคราะห์ ส่วน *Yarrowia lipolytica* (จุลินทรีย์รหัส Y2) และ *Pichia Jadinii* (จุลินทรีย์รหัส Y4) มีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงสุดที่เวลา 24 และ 60 ชั่วโมงตามลำดับ

ในส่วนของกลุ่มแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลิตไลเปสแอกทิวิตีออกมาสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงของการบ่มในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสแอกทิวิตีออกมาสูงที่สุดคือ *Bacillus subtilis subsp. subtilis strain A17* (จุลินทรีย์รหัส V3) ซึ่งมีค่าไลเปสแอกทิวิตี 1.499 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม เนื่องจากสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงที่สุดในกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้คือ 91.78 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียที่ผลิตไลเปสแอกทิวิตีรองลงมาคือ *Bacillus subtilis subsp. subtilis strain E28* (จุลินทรีย์รหัส T3) และ *Pseudomonas sp.* (จุลินทรีย์รหัส V1) โดยมีค่าไลเปสแอกทิวิตี 1.301 และ 0.857 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.3.2.3 การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห่งเพื่อนำมากำหนดอัตราการไหล (Flow rate) ในการบำบัดน้ำเสียในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

นำค่าน้ำหนักเซลล์แห่งของจุลินทรีย์ทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำเสีย สัปดาห์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln X$ และเวลา (ชั่วโมง) ดังแสดงในภาคผนวก ง พร้อมทั้งคำนวณหาค่า Specific growth rate determination ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้กำหนดค่าอัตราการไหล (Flow rate) ดังแสดงตามตาราง 4.7

ตาราง 4.4 ค่า Specific growth rate determination ของจุลินทรีย์คัดเลือก 10 สายพันธุ์

ชนิดจุลินทรีย์	รหัสจุลินทรีย์	Specific growth rate determination
ยีสต์	รหัสจุลินทรีย์ C7	0.111
	รหัสจุลินทรีย์ L9	0.071
	รหัสจุลินทรีย์ L11	0.040
	รหัสจุลินทรีย์ S4	0.048
	รหัสจุลินทรีย์ Y2	0.088
	รหัสจุลินทรีย์ Y3	0.026
	รหัสจุลินทรีย์ Y4	0.034
	ค่า Specific growth rate determination ต่ำที่สุดในกลุ่มยีสต์	0.026
	ค่า Safety factor 10 เปอร์เซ็นต์	0.024
	ค่าอัตราการไหล (ลิตรต่อชั่วโมง)	0.024
แบคทีเรีย	รหัสจุลินทรีย์ T3	0.074
	รหัสจุลินทรีย์ V1	0.030
	รหัสจุลินทรีย์ V3	0.072
	ค่า Specific growth rate determination ต่ำที่สุดในกลุ่มแบคทีเรีย	0.030
	ปริมาตรถังปฏิกรณ์ (ลิตร)	1.0
	ค่า Safety factor 10 เปอร์เซ็นต์	0.027
	ค่าอัตราการไหล (ลิตรต่อชั่วโมง)	0.027

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในสภาพกลุ่ม จุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) และเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว yeast extract- malt extract broth (YM) บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงจากนั้นปิเปตเชื้อแบคทีเรียและยีสต์มาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวน้ำมันปาล์ม ดัดแปลงจาก พัชรวิภา ใจจักรคำ (2545) จนเข้าสู่ระยะกลางของช่วงทวีคูณของแบคทีเรียและยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ปรับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ให้ได้ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงเอาเฉพาะตะกอนเซลล์เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ inoculum ตั้งต้นในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

1. ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ ของกลุ่มยีสต์ เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มยีสต์ ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง โดยใช้ค่าอัตราการไหลของน้ำเสียสังเคราะห์จากค่า Specific growth rate determination ของยีสต์สายพันธุ์ที่เจริญได้ช้าที่สุด โดยพิจารณาจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ *Candida albican* (จุลินทรีย์รหัส Y3) มีค่า Specific growth rate determination น้อยที่สุดจากยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ซึ่งมีค่า Specific growth rate determination เท่ากับ 0.026 โดยในการทดลองจะกำหนดค่า Safety factor 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอัตราการไหลของน้ำเสียสังเคราะห์เข้าสู่ถังปฏิกรณ์เพื่อเริ่มระบบการบำบัดน้ำเสียแบบต่อเนื่อง จึงเท่ากับ 0.024 (ลิตรต่อชั่วโมง)

2. ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ ของกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มแบคทีเรีย ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง โดยใช้ค่าอัตราการไหลของน้ำเสียสังเคราะห์จากค่า Specific growth rate determination ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญได้ช้าที่สุด จากการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. (รหัสจุลินทรีย์ V1) มีค่า Specific growth rate determination น้อยที่สุดจาก

แบบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งเท่ากับ 0.030 และกำหนดค่า Safety factor เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองในกลุ่มยีสต์ ดังนั้นอัตราการไหลของอาหารน้ำเสียสังเคราะห์เข้าสู่ถังปฏิกรณ์เพื่อเริ่มระบบการบำบัดน้ำเสียแบบต่อเนื่อง จึงเท่ากับ 0.027 (ลิตรต่อชั่วโมง)

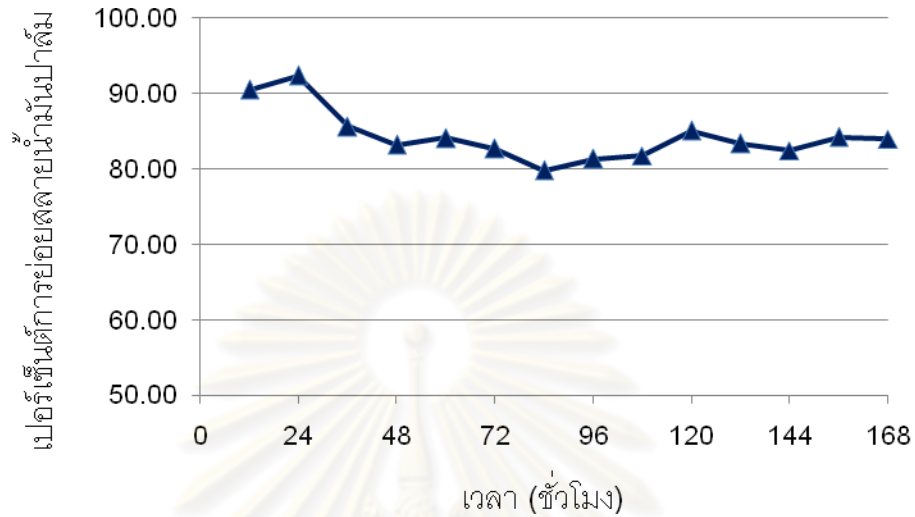
3. ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม (แบบคทีเรียและยีสต์) เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม ใช้ค่าอัตราการไหลของน้ำเสียสังเคราะห์จากค่า Specific growth rate determination ของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ช้าที่สุด โดยพิจารณาจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ซึ่งคือ *Candida albican* (จุลินทรีย์รหัส Y3) ดังนั้นอัตราการไหลของน้ำเสียสังเคราะห์ ในกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เท่ากับ 0.024 (ลิตรต่อชั่วโมง)

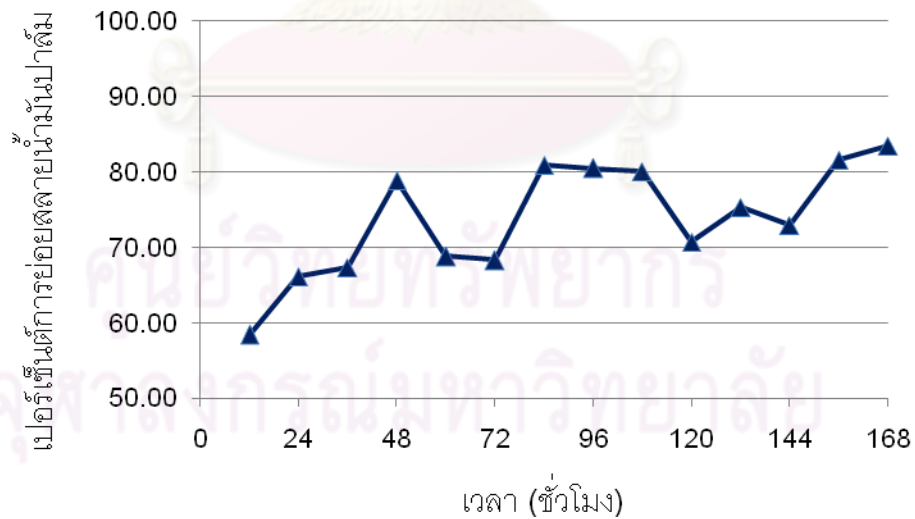
ในการทดลองทั้ง 3 การทดลองจะควบคุมให้มีค่าพารามิเตอร์ต่างๆเท่ากัน โดยควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm ควบคุมค่าอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าพีเอชอยู่ที่ 6.0 ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบกะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ระบบการบำบัดแบบต่อเนื่อง โดยกำหนดค่าอัตราการไหลเข้าของน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในแต่ละการทดลองตามที่กล่าวไว้ข้างต้น ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงจนถึง 168 ชั่วโมง โดยปิเปตตัวอย่าง 18 มิลลิลิตร มาทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลายน้ำมันปาล์มด้วยวิธี TLC-FID ทดสอบไลเปสแอกทิวิตีตามวิธีของ Marianne และคณะ (1991) หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและนำตะกอนที่เหลือมาวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยวิธี DGGE

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

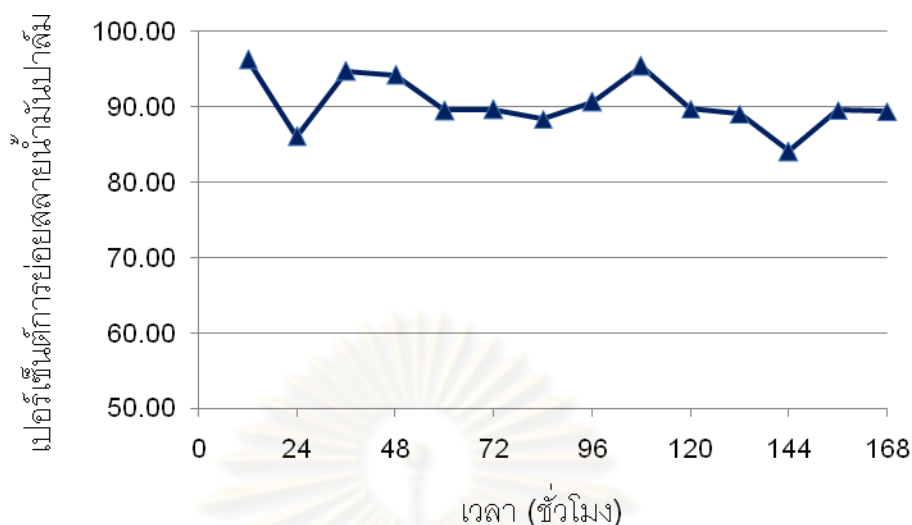
4.4.1. ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์



รูปที่ 4.28 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มยีสต์เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง



รูปที่ 4.29 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง



รูปที่ 4.30 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องพิจารณาจากพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการนำตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี TLC-FID และนำผลจากพื้นที่ใต้กราฟไครอกลีเซอร์ไรด์มาคำนวณหาค่าปริมาณน้ำมันปาล์มที่เหลืออยู่ในระบบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานปริมาณน้ำมันปาล์มตามภาคผนวก ค. ในการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันปาล์มโดยกลุ่มยีสต์และกลุ่มจุลินทรีย์ผสม จะมีอัตราการไหลเข้าของน้ำเสียสังเคราะห์ผสมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 0.024 ลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นในทุกๆ 12 ชั่วโมงจะมีการไหลเข้าของน้ำเสียสังเคราะห์ผสมน้ำมันปาล์ม เท่ากับ 0.288 ลิตร ซึ่งจะมีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไหลเข้าสู่ระบบบำบัดเท่ากับ 2.88 กรัม ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันปาล์มโดยกลุ่มแบคทีเรีย จะมีอัตราการไหลเข้าของน้ำเสียสังเคราะห์ผสมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 0.027 ลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นในทุกๆ 12 ชั่วโมงจะมีการไหลเข้าของน้ำเสียสังเคราะห์ผสมน้ำมันปาล์ม เท่ากับ 0.324 ลิตร ซึ่งจะมีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไหลเข้าสู่ระบบบำบัดเท่ากับ 3.24 กรัม

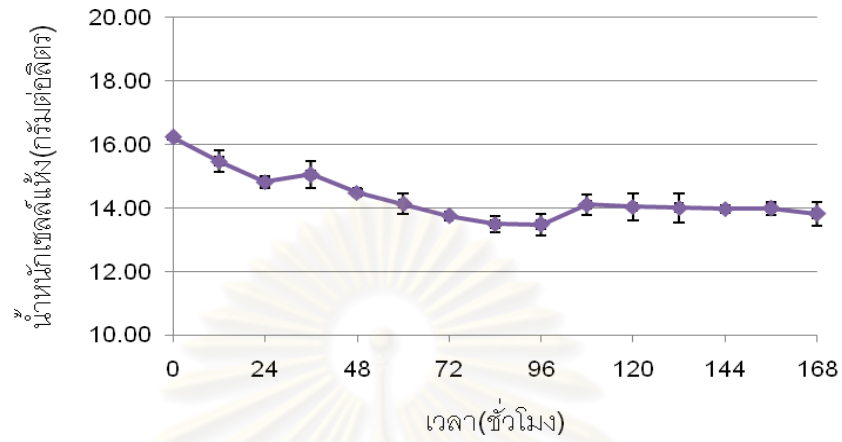
จากผลการทดลองการใช้กลุ่มยีสต์บำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง พบว่า เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มจะเริ่มคงที่คือเข้าสู่สภาวะเสถียรที่ ชั่วโมงที่ 60 และจะค่อนข้างคงที่ตลอดไปจนถึงชั่วโมงที่ 168 และตลอดการทดลองตั้งแต่ชั่วโมงที่

12 ถึงชั่วโมงที่ 168 ของระบบบำบัดแบบต่อเนื่องมีน้ำมันปาล์มเหลืออยู่ในระบบโดยเฉลี่ย 0.45 กรัม ดังนั้นนำค่าน้ำมันปาล์มที่เหลืออยู่ในระบบมาคำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเฉลี่ยได้เท่ากับ 84.32 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนการทดลองโดยใช้กลุ่มแบคทีเรียพบว่า เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มนั้นจะมีค่าขึ้นลงไม่คงที่ แต่จะพบช่วงที่มีค่าค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 84 และตลอดการทดลองตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 168 ของระบบบำบัดแบบต่อเนื่องมีน้ำมันปาล์มเหลืออยู่ในระบบโดยเฉลี่ย 0.85 กรัม ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเฉลี่ยได้เท่ากับ 73.80 ± 7.45 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมพบว่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มจะเริ่มคงที่ที่ชั่วโมงที่ 60 และจะคงที่ตลอดการทดลอง โดยชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 168 ของระบบบำบัดแบบต่อเนื่องมีน้ำมันปาล์มเหลืออยู่ในระบบโดยเฉลี่ย 0.27 กรัม นำมาคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้เท่ากับ 90.50 ± 3.53 เปอร์เซ็นต์

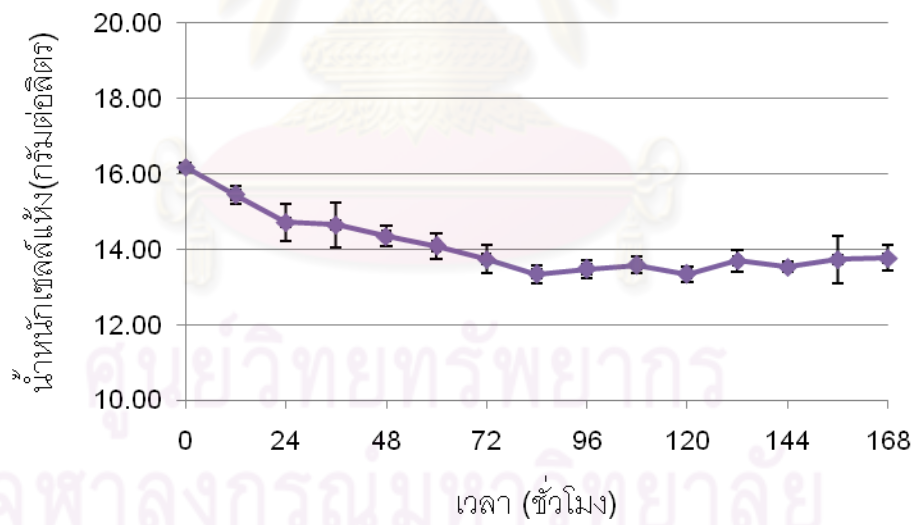
ผลการหาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง ใน 3 การทดลองคือ ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันปาล์มโดยกลุ่มยีสต์ กลุ่มแบคทีเรีย และกลุ่มจุลินทรีย์ผสม สรุปได้ว่า ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องโดยกลุ่มจุลินทรีย์ผสมให้ผลดีที่สุด โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เฉลี่ย 90.50 ± 3.53 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำมันปาล์มโดยกลุ่มยีสต์ ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้โดยเฉลี่ย 84.32 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในระบบต่อเนื่องได้น้อยที่สุดคือ 73.80 ± 7.45 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

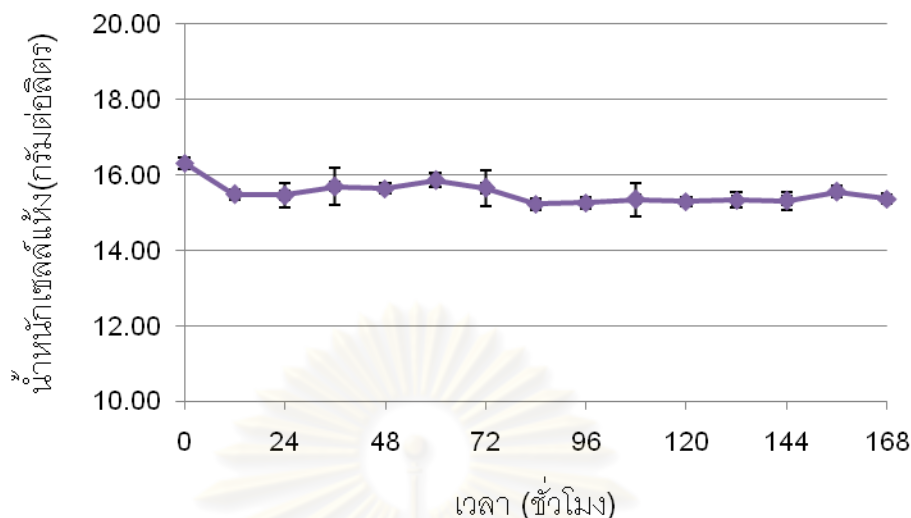
4.4.2. ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง



รูปที่ 4.31 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกลุ่มยีสต์เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง



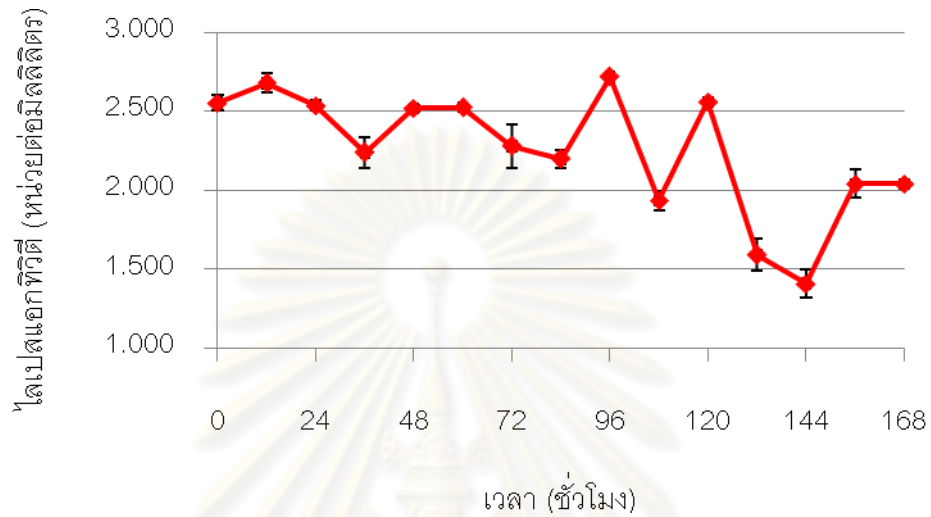
รูปที่ 4.32 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง



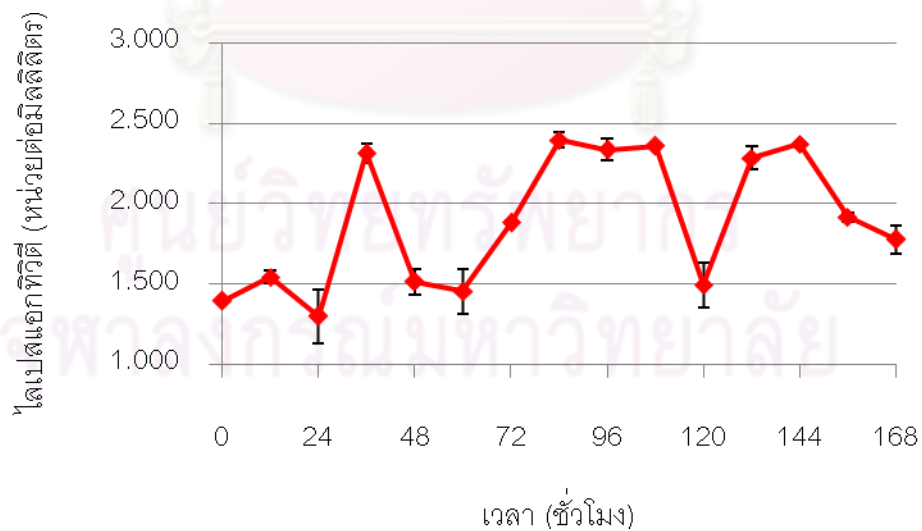
รูปที่ 4.33 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกลุ่มจูลินทรีย์ผสม (แบคทีเรียและยีสต์) เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

จากผลการทดลองการหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งใน 3 การทดลองคือ น้ำหนักเซลล์แห้งกลุ่มยีสต์ น้ำหนักเซลล์แห้งกลุ่มแบคทีเรีย และน้ำหนักเซลล์แห้งกลุ่มจูลินทรีย์ผสม ซึ่งกำหนดให้เป็นชั่วโมงที่ 0 เป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้งก่อนเริ่มระบบการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง พบว่า ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของทั้ง 3 การทดลองในชั่วโมงที่ 0 มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งเท่ากับ 16.22 ± 0.06 , 16.18 ± 0.13 และ 16.32 ± 0.15 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อเริ่มเข้าสู่ระบบการบำบัดแบบต่อเนื่อง ทำการเก็บตัวอย่างและนำมาวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 12 พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในทั้ง 3 การทดลองมีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 0 โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 12 ของกลุ่มยีสต์เท่ากับ 15.47 ± 0.35 กลุ่มแบคทีเรียเท่ากับ 15.45 ± 0.23 และกลุ่มจูลินทรีย์ผสมเท่ากับ 15.48 ± 0.13 หลังจากนั้นค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของทั้ง 3 การทดลองจะเริ่มคงที่ โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งในระหว่างการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 168 ทั้ง 3 การทดลอง คือ น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยกลุ่มยีสต์เท่ากับ 14.19 ± 0.58 น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยกลุ่มแบคทีเรียเท่ากับ 13.96 ± 0.15 และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยของกลุ่มจูลินทรีย์ผสมเท่ากับ 15.46 ± 0.19 เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยของทั้ง 3 การทดลองพบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยของกลุ่มจูลินทรีย์ผสมมีค่ามากที่สุด

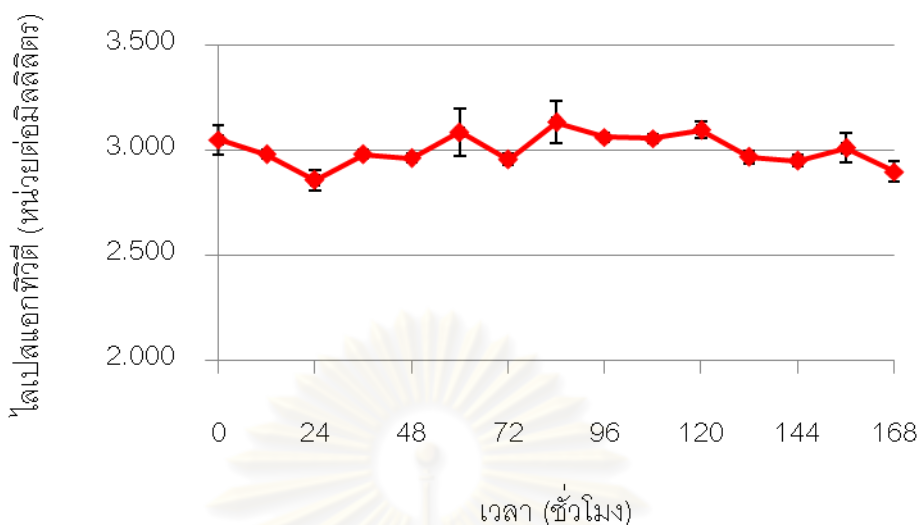
4.4.3. ค่าไลเปสแอกทिवิตี



รูปที่ 4.34 ค่าไลเปสแอกทिवิตีของกลุ่มยีสต์เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง



รูปที่ 4.35 ค่าไลเปสแอกทिवิตีของกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง



รูปที่ 4.36 ค่าไลเปสแอกทิวิตีของจุลินทรีย์กลุ่มผสมเมื่อเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่าค่าไลเปสแอกทิวิตีตลอดการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในระบบต่อเนื่อง มีค่าไม่คงที่ในทั้ง 3 การทดลอง ตั้งแต่ก่อนเริ่มระบบบำบัดแบบต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 168 เมื่อพิจารณาค่าไลเปสแอกทิวิตีในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่ากลุ่มยีสต์ มีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 96 ของระบบการบำบัดแบบต่อเนื่อง โดยมีค่าไลเปสแอกทิวิตีที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 2.718 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนกลุ่มแบคทีเรียมีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 84 ของระบบการบำบัดแบบต่อเนื่อง โดยมีค่าไลเปสแอกทิวิตีที่ชั่วโมงที่ 84 เท่ากับ 2.398 ± 0.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร และกลุ่มจุลินทรีย์ผสมมีค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 84 ของระบบการบำบัดแบบต่อเนื่อง โดยมีค่าไลเปสแอกทิวิตีที่ชั่วโมงที่ 84 เท่ากับ 3.133 ± 0.10 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงสุดที่ผลิตจากกลุ่มจุลินทรีย์ผสมมีค่ามากกว่าค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงสุดที่ผลิตจากกลุ่มยีสต์ และกลุ่มแบคทีเรียถึง 1.15 เท่า และ 1.31 เท่า ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุดที่ได้จากกลุ่มยีสต์ (2.718 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิลิตร) กับค่าไลเปสแอกทิวิตีของ *Candida* sp.CBS 10854 (จุลินทรีย์รหัส C7) ซึ่งเป็นค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุดที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ในรูปเชื้อเดี่ยวในน้ำเสียสังเคราะห์ (1.639 ± 0.067 หน่วยต่อมิลลิลิตร) พบว่ามีค่ามากกว่าถึง 1.66 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบค่าไลเปสแอกทิวิตีสูงที่สุดที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรีย (2.398 ± 0.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร) กับค่าไลเปสแอกทิวิตี

ที่สูงที่สุดที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 จุลินทรีย์รหัส V3 (1.499 ± 0.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร) พบว่ามีค่ามากกว่า 1.6 เท่า

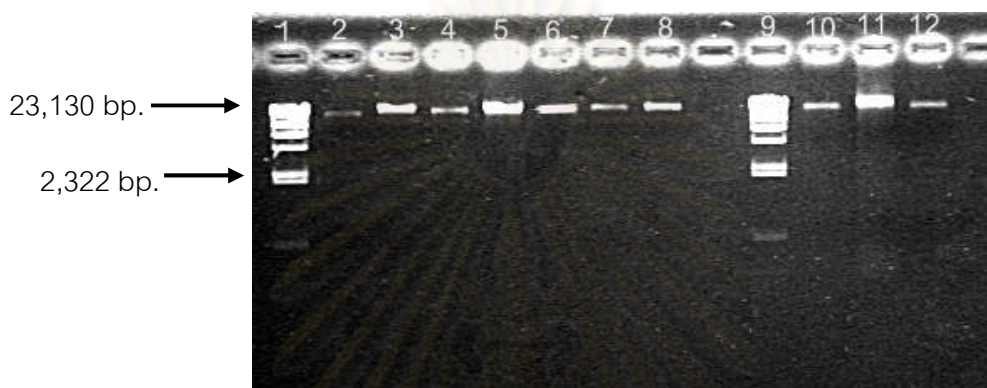
ค่าไลเปสแอกทิวิตีเฉลี่ยตลอดการทดลองของระบบการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง พบว่าค่าไลเปสแอกทิวิตีเฉลี่ยตลอดการทดลองของกลุ่มยีสต์มีค่าเท่ากับ 2.256 ± 0.39 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าไลเปสแอกทิวิตีเฉลี่ยตลอดการทดลองของกลุ่มแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 1.892 ± 0.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าไลเปสแอกทิวิตีเฉลี่ยตลอดการทดลองของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมมีค่าเท่ากับ 3.003 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองการหาค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง รวมถึงการหาค่าไลเปสแอกทิวิตีและค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า มีความสัมพันธ์กัน โดยที่กลุ่มจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม และมีค่าไลเปสแอกทิวิตีเฉลี่ยตลอดการทดลองเป็นเวลา 168 ชั่วโมง สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มยีสต์และกลุ่มแบคทีเรีย โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มเฉลี่ยเท่ากับ 90.50 ± 3.53 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าไลเปสแอกทิวิตีเฉลี่ยเท่ากับ 3.003 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกันค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.32 ± 0.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มยีสต์และกลุ่มแบคทีเรีย เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มผสมสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดีและสามารถนำน้ำมันปาล์มไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการสร้างเซลล์ได้ดีกว่ากลุ่มยีสต์และกลุ่มแบคทีเรีย

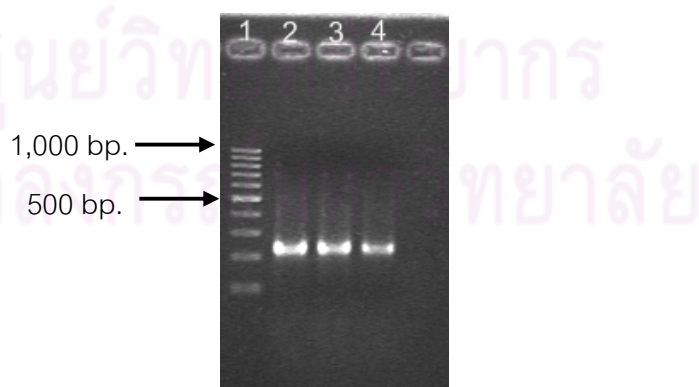
4.5 ศึกษาพลวัตของจุลินทรีย์ (microbial dynamics) ในถังปฏิกรณ์หลังจากเลี้ยงแบบต่อเนื่องจนถึงสภาวะเสถียร (steady state) โดยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

นำตะกอนเซลล์ของเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียและยีสต์แต่ละสายพันธุ์มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.3.1 ดังรูปที่ 4.7 พร้อมทั้งเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสก่อนนำไปศึกษาพลวัตของจุลินทรีย์โดยวิธี DGGE โดยแบคทีเรียจะใช้ไพรเมอร์ 338F + GC และ 518R และยีสต์จะใช้ไพรเมอร์ NL1 + GC และ LS2 ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หลังจากนั้น แอบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเชื้อบริสุทธิ์จะถูกนำมาใช้เป็น marker เพื่อศึกษาพลวัตของแบคทีเรียและยีสต์ในถังปฏิกรณ์ต่อไป

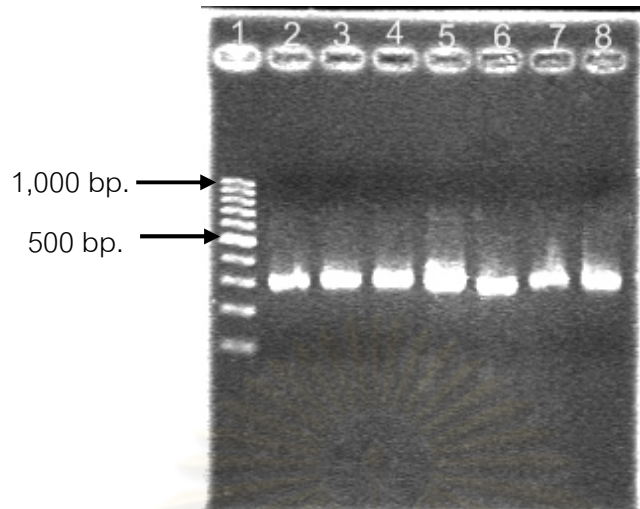
ในส่วนของตะกอนเซลล์ที่เก็บได้จากระบบการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์จะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.3.1 และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 +GC และ LS2 เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีสต์ที่อยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ผสม และใช้ไพรเมอร์ P338F + GC และ 518R เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ผสม



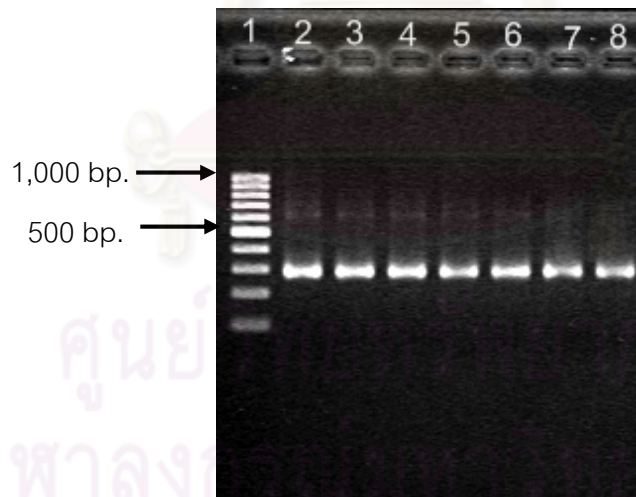
รูปที่ 4.37 Genomic DNA ของยีสต์และแบคทีเรีย จากซ้ายไปขวา ช่องวงที่ 1: lamda /HinDIII marker ช่องวงที่ 2: ยีสต์รหัส C7 ช่องวงที่ 3: ยีสต์รหัส L9 ช่องวงที่ 4: ยีสต์รหัส L11 ช่องวงที่ 5: ยีสต์รหัส S4 ช่องวงที่ 6: ยีสต์รหัส Y2 ช่องวงที่ 7: ยีสต์รหัส Y3 ช่องวงที่ 8: ยีสต์รหัส Y4 ช่องวงที่ 9: lamda /HinDIII marker ช่องวงที่ 10: แบคทีเรียรหัส T3 ช่องวงที่ 11: แบคทีเรียรหัส V1 ช่องวงที่ 12: แบคทีเรียรหัส V3



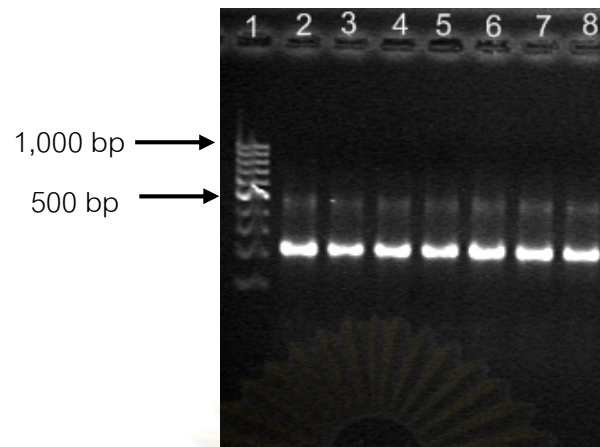
รูปที่ 4.38 PCR product ของแบคทีเรีย จากซ้ายไปขวา 1ช่องวงที่ 1: 100 bp marker ช่องวงที่ 2: แบคทีเรียรหัส T3 ช่องวงที่ 3: แบคทีเรียรหัส V1 ช่องวงที่ 4: แบคทีเรียรหัส V3



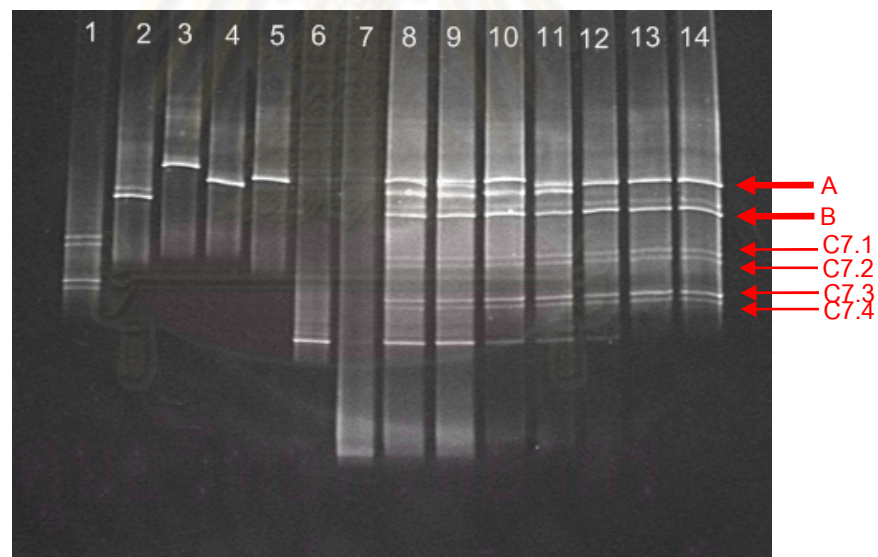
รูปที่ 4.39 PCR product ของยีสต์ จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์ รหัส C7 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์รหัส L9 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์รหัส L11 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์รหัส S4 ยีสต์ช่องวิ่งที่ 6: รหัส Y2 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์รหัส Y3 ช่องวิ่งที่ 8: ยีสต์รหัส Y4



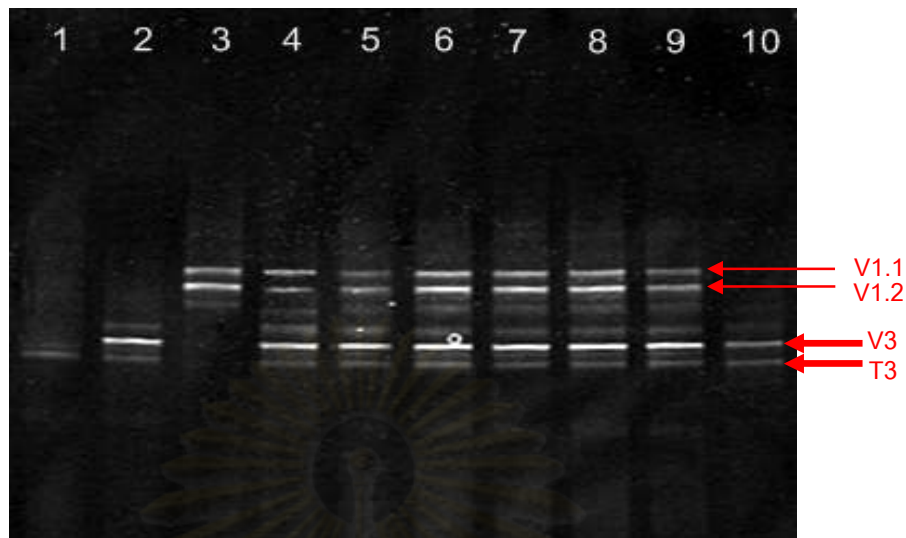
รูปที่ 4.40 PCR product ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เมื่อใช้ไพรเมอร์ NL1 +GC และ LS2 เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีสต์ เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2-8: PCR product ชั่วโมงที่ 24 48 72 96 120 144 และ 168 ตามลำดับ



รูปที่ 4.41 PCR product ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เมื่อใช้ไพรเมอร์ 338F + GC และ 518R เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอกลุ่มแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง จากซ้ายไปขวา ช่องวิ่งที่ 1: 100 bp marker ช่องวิ่งที่ 2-8: PCR product ชั่วโมงที่ 24 48 72 96 120 144 และ 168 ตามลำดับ



รูปที่ 4.42 DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 30 – 60% denaturant แสดงสายพันธุ์ของยีสต์ในกลุ่มจุลินทรีย์ผสม ช่องวิ่งที่ 1: ยีสต์บริสุทธิ์หัด C7 ช่องวิ่งที่ 2: ยีสต์บริสุทธิ์หัด L9 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์บริสุทธิ์หัด L9 ช่องวิ่งที่ 3: ยีสต์บริสุทธิ์หัด L11 ช่องวิ่งที่ 4: ยีสต์บริสุทธิ์หัด S4 ช่องวิ่งที่ 5: ยีสต์บริสุทธิ์หัด Y2 ช่องวิ่งที่ 6: ยีสต์บริสุทธิ์หัด Y3 ช่องวิ่งที่ 7: ยีสต์บริสุทธิ์หัด Y4 ช่องวิ่งที่ 8-14: สายพันธุ์ของยีสต์ในกลุ่มจุลินทรีย์ผสมในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง ชั่วโมงที่ 24 48 72 96 120 144 และ 168 ตามลำดับ



รูปที่ 4.43 DGGE ในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 30 – 70% denaturant แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรียในกลุ่มจุลินทรีย์ผสม ช่องวิ่งที่ 1: แบคทีเรียบริสุทธิ์รหัส T3 ช่องวิ่งที่ 2: แบคทีเรียบริสุทธิ์รหัส V3 ช่องวิ่งที่ 3: แบคทีเรียบริสุทธิ์รหัส V1 ช่องวิ่งที่ 4-10: สายพันธุ์ของแบคทีเรียในกลุ่มจุลินทรีย์ผสมในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องชั่วโมงที่ 24 48 72 96 120 144 และ 168 ตามลำดับ

จากผลการทดลองการศึกษาพลวัตของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมในส่วนของเชื้อยีสต์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค DGGE แสดงให้เห็นว่า ในช่องวิ่งที่ 8 ถึงช่องวิ่งที่ 10 ซึ่งคือ ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 72 ของระบบการให้อาหารน้ำเสียผสมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักรต่อปริมาตร จะมีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นหลายแถบดีเอ็นเอซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตำแหน่งบนพอลิอะคริลาไมด์เจลของแถบดีเอ็นเอของเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ในช่องวิ่งที่ 1 ถึงช่องวิ่งที่ 7 พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 นั้นยังคงมียีสต์ทุกสายพันธุ์คงอยู่ในถังปฏิกรณ์ หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเชื้อยีสต์จนถึงชั่วโมง 168 ของระบบต่อเนื่อง จะเหลือจำนวนของสายพันธุ์ของยีสต์ เพียง 3 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอของเชื้อยีสต์บริสุทธิ์แล้วน่าจะเป็น *Candida* sp. CB 10854 (ยีสต์รหัส C7) *Candida tropicalis* strain Vaucher (ยีสต์รหัส L9) และ *Yarrowia lipolytica* (ยีสต์รหัส Y2)

ในส่วนของการศึกษาพลวัตของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จะคงอยู่ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 144 ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง แต่จะไม่พบแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียรหัส V1 ในชั่วโมงที่ 168

ทำการยืนยันผลสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มและสามารถอยู่รวมกันเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ได้ โดยตัดพอลิอะคริลาไมด์เจล บริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยในส่วนของเชื้อยีสต์ ทำการตัดเจลทั้งหมด 6 แถบดีเอ็นเอ ตามที่แสดงดังรูป 4.4.1 ส่วนเชื้อแบคทีเรีย ทำการตัดเจลทั้งหมด 4 แถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 4.4.2 จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ตัดมาแช่ในหลอดไมโครพิพพ์ เดิม น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ 20 ไมโครลิตร แช่ขึ้นเจลไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 - 24 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาจากเจลให้มากที่สุด เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน แล้วนำ PCR product ที่ได้มาโหลดลงในพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มี 30 - 60 เฟอร์เซ็นต์ เพื่อดูว่าแถบดีเอ็นเอที่ตัดมาได้นั้นมีความบริสุทธิ์และเป็นแถบดีเอ็นเอเดี่ยวแน่นอนแล้วจึงตัดแถบดีเอ็นเอเดี่ยวในแต่ละแถบมาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันอีกครั้ง ก่อนนำไปส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและตรวจสอบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank ใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

เมื่อแถบนำแถบดีเอ็นเอรหัส C7.1 C7.2 C7.3 และ C7.4 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบส (Sequences producing significant alignments) พบว่ามีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันมาก และเมื่อนำลำดับเบสของแต่ละแถบดีเอ็นเอไปตรวจสอบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ทั้งแถบดีเอ็นเอรหัส C7.1 C7.2 C7.3 และ C7.4 มีความคล้ายคลึงกันยีสต์ *Candida* sp.CBS 10854 ซึ่งคือเชื้อจุลินทรีย์รหัส C7 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 99% 99% 96% 96% ตามลำดับ ส่วนแถบดีเอ็นเอรหัส A และ B เมื่อนำไปตรวจสอบสายพันธุ์จุลินทรีย์พบว่า แถบรหัส A มีความคล้ายคลึงกับยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งคือเชื้อจุลินทรีย์ Y2 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 99% ส่วนแถบรหัส B มีความคล้ายคลึงกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* ซึ่งคือเชื้อจุลินทรีย์ L9 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 97%

ในส่วนของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ผสมนั้น พบว่าแถบรหัส V1.1 และ แถบรหัส V1.2 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันมาก และเมื่อนำไปตรวจสอบสายพันธุ์จุลินทรีย์พบว่า ทั้ง 2 แถบดีเอ็นเอมีความเหมือนกับ *Pseudomonas* sp. โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 100% ทั้ง 2 แถบดีเอ็นเอ ส่วนแถบดีเอ็นเอรหัส V3 และ T3 เมื่อนำไปตรวจสอบสายพันธุ์พบว่ามี ความเหมือนกับ *Bacillus subtilis* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity เท่ากับ 100%

ดังนั้นในระบบการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องสามารถสรุปได้ว่าสายพันธุ์ยีสต์และสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกมาได้นั้นสามารถอยู่รวมกันในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ได้โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดี ซึ่งประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเฉลี่ยในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง (7 วัน) เท่ากับ 90.50 ± 3.53 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าไคเปสแอกทิวิตีโดยเฉลี่ยเท่ากับ 3.003 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาถึงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รวมกันได้ ในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ผสมและคงอยู่ได้ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง คือ ยีสต์รหัส C7 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Candida* sp.CBS 10854 ยีสต์รหัส L9 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Candida tropicalis* strain Vaucher ยีสต์รหัส Y2 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Yarrowia lipolytica* แบคทีเรียรหัส T3 และ แบคทีเรียรหัส V3 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 ตามลำดับ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

น้ำมันปาล์มจัดเป็นน้ำมันที่ปนเปื้อนในระบบบำบัดน้ำเสียของประเทศไทยทั้งจากน้ำเสียชุมชนและน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นน้ำมันปรุงอาหารที่ใช้ภายในประเทศอย่างแพร่หลาย โดยนำมาใช้ในการบริโภคโดยตรง และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมผลิตสบู่ อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น น้ำเสียที่มีไขมันหรือน้ำมันปนเปื้อนในสัดส่วนมากจะส่งผลกระทบต่อระบบการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมันจัดอยู่ในกลุ่มไม่ละลายน้ำ (Hydrophobic organic compounds) ดังนั้นมักจะพบปัญหาการเกาะติดของไขมันบริเวณท่อของระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งจะขัดขวางการไหลเวียนของน้ำเสีย ส่งผลให้ระบบการบำบัดน้ำเสียขาดประสิทธิภาพ นอกจากนี้หากมีการสะสมของคราบไขมันลอยเป็นฝ้าจะส่งผลให้ก๊าซออกซิเจนในอากาศไม่สามารถจะละลายลงไปในน้ำได้ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำทั้งพืชและสัตว์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกแบคทีเรียและยีสต์จากแหล่งต่างๆ ภายในประเทศไทย เพื่อสร้างกลุ่มจุลินทรีย์ (microbial consortium) เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน โดยมุ่งเน้นไปในการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

จากการทดลองสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วยยีสต์ 7 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ในกลุ่มของยีสต์เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วพบว่า ยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงกับ *Candida* sp.CB8 10854 , *Candida tropicalis* strain Vaucher , *Candida boidinii* , *Candida tropicalis* strain 131 , *Yarrowia lipolytica* , *Pichia jadinii* และ *Candida albican* ในกลุ่มของแบคทีเรียเมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วพบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 , *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 เมื่อทำการทดสอบหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า พบว่า ยีสต์รหัส C7 (*Candida* sp.CBS 10854) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์คัดเลือกทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 98.22 เปอร์เซ็นต์

ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ บ่มที่เครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที นอกจากนั้นยังสามารถผลิตค่าไคเปสแอกติวิตีมากที่สุดคือ 1.639 ± 0.067 หน่วยต่อมิลลิลิตร

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 10 สายพันธุ์ มาทำการเลี้ยงรวมกันในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์พร้อม ทั้งหาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง แบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมันปาล์มโดยกลุ่มยีสต์ กลุ่มแบคทีเรีย และกลุ่ม จุลินทรีย์ผสม สรุปได้ว่า ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ในถังปฏิกรณ์ แบบต่อเนื่องโดยกลุ่มจุลินทรีย์ผสมให้ผลดีที่สุด โดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เฉลี่ย 90.50 ± 3.53 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำมันปาล์มโดยกลุ่มยีสต์ ซึ่งสามารถ ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้โดยเฉลี่ย 84.32 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อย สลายน้ำมันปาล์มในระบบต่อเนื่องได้น้อยที่สุดคือ 73.80 ± 7.45 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นทำการศึกษาหาพลวัตของจุลินทรีย์ (microbial dynamics) ในถังปฏิกรณ์ หลังจากเลี้ยงแบบต่อเนื่องจนถึงสภาวะเสถียร (steady state) โดยวิธี Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) สามารถสรุปได้ว่าสายพันธุ์ยีสต์และสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกมาได้ นั้นสามารถอยู่รวมกันในสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ได้โดยมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดี ซึ่งประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเฉลี่ยในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง (7 วัน) เท่ากับ 90.50 ± 3.53 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าไคเปสแอกติวิตีโดยเฉลี่ยเท่ากับ 3.003 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาถึงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รวมกันได้ในสภาพกลุ่ม จุลินทรีย์ผสมและคงอยู่ได้ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการทดลองนาน 168 ชั่วโมง คือ ยีสต์รหัส C7 (*Candida* sp.CBS 10854) ยีสต์รหัส L9 (*Candida tropicalis* strain Vaucher) ยีสต์รหัส Y2 (*Yarrowia lipolytica*) แบคทีเรียรหัส T3 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28) และ แบคทีเรียรหัส V3 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จรัส ชื่นสกุล.2547. อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis*. วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
- นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่3.กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พัชรวิภา ใจจักรคำ. 2545. การแยกแบคทีเรียทนร้อนและลักษณะสมบัติบางประการของไลเปสทนร้อนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ส่งเสริมการเกษตร,กรม. ปาล์มน้ำมัน. [Online].แหล่งที่มา:www.doae.go.th/plant/palm.htm.[9 พฤษภาคม2552.]
- สุภัณฑิต นิมรัตน์. 2548. จุลชีววิทยาของน้ำเสีย พิมพ์ครั้งที่ 1.กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรอรอด ศุภจัตรัส. 2545. การศึกษาการใช้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้บำบัดไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาษาอังกฤษ

- Alessandro, D.A., Giovanni, G.S., Federico, F. and Maurizio, P. 2006. Olive-mill wastewater : a promising substrate for microbial lipase production. Bioresource Technology. 97: 1828-1833.
- Ana, I., Moscovici, M., Popa, C., Vamanu, A., Popo, O. and Dinu, L. 1997. Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases . Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic. 3: 147-151.

- AU-KBC research center. Lipase database. [Online]. <http://www.aukbc.org/beta/bioproj2/index.html>. Accessed on 28 May 2008.
- Brozzoli, V., Crognale, S., Sampedro, I., Federici, F., D'Annibale, A. and Petruccioli, M. 2009. Assessment of olive –mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. Bioresource Technology. 100: 3395-3402.
- Becker, P., Koster, D., Popov, M.N., Markossian, S., Antranikian, G. and Markl, H. 1999. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. Water Research. 33: 653-660.
- Chin, K.K. and Wong, K.K. 1980. Palm oil refinery wastes treatment. Water Research. 15:1087-1092
- Ching T. Hou. 1997. Characterization of new yeast lipases. Oil Chemical Research. 74.
- Chipasa, K. B., and K. Medrzycka. (ed.) .2006. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. [Online].<http://www.springerlink.com/content/cu27271kp2727g6v/>. Accessed 5 November 2007.
- Cocolin, L., Bisson, L.F. and Mills, D.A. 2000. Direct profiling of the dynamics in wine fermentations. FEMS Microbiology Letters. 189: 81–87.
- Dalmau, E., Montesinos, J.L., Lotti, M. and Casas, C. 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme and Microbial Technology. 26: 657–663.
- DeJournett , T.D., William, A. A. and Timothy M. L.2007. The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments. Applied Soil Ecology.35: 648-659.
- Delaune, R. D., C. W. Lindau, and A. Jugsujinda. 1999. Effectiveness of “Nochar” solidifier polymer in removing oil from open water in coastal wetland. Spill Science & Technology Bulletin. 5:357-359.
- Dong-woo, L., You-Seok, K., Ki-Jun, K., Byung-Chan, K., Hak-Jong, C., Doo-Sik, K.,

- Maggy, T.S. and Yu-Ryang, P. 1999. Isolation and Characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS microbiology Letters. 179: 393-400.
- Gerardo, C. and Sergio, R. 1999. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. 1999. Bioresource Technology. 70:173-180.
- Janice, H. and Daphne, J.O. 2000. The oil palm in all our lives: how this came about . Endeavour. 24.
- Kamini, N. R., T. Fujii, T. Kurosu, and H. Iefuji. 2000. Production purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. Process Biochemistry. 36:317-324.
- Korabecna, M. 2007. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1,ITS2 and 5.8S rRNA GENE): Its biological meaning and application in medical mycology. Communicating Curren Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. 783-786.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D. and Guerzoni, M.E. 2005. Bioresource Technology. 96: 317-322.
- Lelie, D. C. O., Citlali, R.G., Gerardo, V.A. and Rosamaria, O.R. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Enzyme and Microbial Technology. 37: 648-654.
- Lin, S.F., Chiou, C.M. and Tsai, Y.C. 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. Biotechnology Letter. 17: 959-962.
- Marianne, K., H. Birgit, S. Dietmar, and D.S. Rolf.1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808 : purification characterization crystallization and preliminary x- ray diffraction data. Journal of Bacteriology.173, pp. 4836-4841.

- Matsumiya, Y., D. Wakita, A. Kimura, S. Sanpa, and M. Kubo. 2007. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. Bioscience and Bioengineering. 103: 325–330.
- Mielbrecht, E.E., M.F. Wolfe, R.S. Tjeerdema, and M.L. Sowby. 2005. Influence of a dispersant on the bioaccumulation of phenanthrene by topmelt (*Atherinops affinis*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 61: 44-52.
- Mohamed, I.A.K. and Ahmad, Q.A.K. 1989. Biological Treatment of palm oil mill Effluent using *Trichoderma viride*. Biological Wastes. 27: 143-152.
- Mongkolthanasarak, W. and Dharmsthiti, S. 2002. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. International Biodeterioration and Biodegradation. 50:101-105.
- Namita, G., Vikran S. and Rani, G. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans* : Statistical medium optimization and production in a bioreactor. Process Biochemistry. 42: 518-526.
- Odibo, F.J.C., Okereke, U.O. and Oyeka, C.A. 1995. Influence of culture conditions on the production of lipase of *Hendersonula toruloidea*. Bioresource Technology. 54: 81-83.
- O'Mahony, F. and Peters, K.J. Options for smallholder milk processing in sub-Saharan Africa. [Online]. <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/Bulletin27/Options.htm>. Accessed on 28 May 2008.
- Oswal, N., Sarma, P.M., Zinjarde, S.S. and Pant, A. 2002. Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. Bioresource Technology. 85: 35-37.
- Preetha, R., and T. S. Kumar. (ed.) 2007. Rhizosphere treatment technology for community wastewater treatment. [Online]. http://ejeafche.uvigo.es/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=5. Accessed 5 November 2007.
- Rapp, P. and Backhaus, S. 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria. Enzyme microbial Technology. 14:938-943.
- Ravigadevi, S., Kalyana, S. and Yew-Ai, T. 2000. Chemistry and biochemistry of palm oil. Progress in Research. 39: 507-558.

- Savgi, E., Gonul, D. and Serpil, T. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive oil mill wastewater and improving its enzyme activity. Journal of Hazards Materials. 149: 720-724.
- Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Sapna, B. and Ruchi G. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. [Online]. <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles18.htm>. Accessed on 28 May 2008.
- Scioli, C. and L. Vollaro. 1997. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. Water Research. 31: 2520-2524.
- Shah, K. R., Patel, P. M. and Bhatt, S. A. 2007. Lipase production by *Bacillus* sp. Under different physio-chemical conditions. Journal of cell and tissue research. 7: 913-916.
- Sharma, R., Y. Chisti, and Banerjee, U. C. 2001. Production purification characterization and applications of lipases. Biotechnology Advances. 19: 627-662.
- Sztajer, H. Maliszewska, I. and Wiczorek, J. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. Enzyme microbial Technology. 10
- Tianwei, T., Mu, Z., Bingwu, W., Chunha, Y. and Li, D. 2003. Screening of high lipase producing *Candidia* sp. And production of lipase by fermentation. Process Biochemistry. 39: 459-465.
- Wakelin, N.G. and Forster, C. F. 1997. An investigation into microbial of fats oils and greases. Bioresource Technology. 59: 37-43.
- Wu, L., Ge, G. and wan, J. 2009. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. Journal of Environmental Science. 21: 237-242.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB)

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล.ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast extract-Malt extract Broth (YM)

กลูโคส	10	กรัม
แบคโตเปปโตน	5	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์	3	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล.ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract-Malt extract Ager (YM)

กลูโคส	10	กรัม
แบคโตเปปโตน	5	กรัม
ผงสกัดจากมอลต์	3	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	3	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล.ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารแข็งไตรบูไทรีน (Tributyryn Agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต (NH ₄) ₂ SO ₄	5	กรัม
แบคโตเปปโตน	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ •7H ₂ O)	1	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล.ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไตรบูไทรีน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลวน้ำมันปาล์ม (Palm oil Medium)

แอมโมเนียมซัลเฟต (NH ₄) ₂ SO ₄	5	กรัม
แบคโตเปปโตน	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ •7H ₂ O)	1	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	1	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล.ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารแข็งน้ำมันปาล์ม (Palm oil Agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต (NH ₄) ₂ SO ₄	5	กรัม
--	---	------

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารน้ำเสียสังเคราะห์

แบคโตเปปโตน	0.6	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ	0.4	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
ยูเรีย	0.1	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$)	0.03	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.014	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.014	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
Tween 80	0.5	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่มีการปรับพีเอช นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

กลีเซอรอล 15%

นำกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 17.24 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 82.76 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาผสมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

นำเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตรจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 3%

นำเกล็ดบอริก 30 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตรจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

0.5 M โซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 7.31 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS)

Sodium dodecyl sulfate	10	กรัม
------------------------	----	------

ค่อยๆ ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จนได้สารละลายใส หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

15% Triton X-100

Triton X-100	15	มิลลิลิตร
--------------	----	-----------

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

70% เอทานอล

99.9% เอทานอล	700	มิลลิลิตร
---------------	-----	-----------

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	300	มิลลิลิตร
-----------------------	-----	-----------

สารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	6.056	กรัม
-------------------------------	-------	------

ละลาย Tris base ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.0 หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.2	กรัม
-------------------------------	-----	------

ละลาย Tris base ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.0 หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) คนให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็น แล้วปรับ pH 8.0 หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	18.164	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) คนให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็น แล้วปรับ pH 8.0 หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

DNA breaking buffer

15% Triton X-100	26.67	มิลลิลิตร
10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	20	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 8.0	40	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์	40	มิลลิลิตร
Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	18.33	มิลลิลิตร

TE buffer

Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

TE buffer ที่ผสมกับ RNase A

TE buffer	1	มิลลิลิตร
RNase A	2	ไมโครลิตร

เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า

Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตรปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	20	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	200	มิลลิลิตร

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) จนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกันเนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นสารก่อมะเร็ง)

สีติดตาม (6X loading dye)

Sucrose	20	กรัม
Bromphenol blue (ละลาย 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)	12.5	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วย TE buffer จนได้ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15		
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

สารละลาย KAPA2G Robust HotStart

5X KAPA2G buffer A ความเข้มข้นสุดท้าย 1X	5.0	ไมโครลิตร
MgCl ₂ ความเข้มข้นสุดท้าย \geq 1.5mM	0.5	ไมโครลิตร
5X KAPA Enhancer 1ความเข้มข้นสุดท้าย 1X	5.0	ไมโครลิตร
dNTP Mix (10 mM each) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 mM each	0.5	ไมโครลิตร
Forward Primer 10 μ M ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25-1.0 μ M	0.25	ไมโครลิตร
Reverse Primer 10 μ M ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25-1.0 μ M	0.25	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ	1.0	ไมโครลิตร
KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 units/ μ l)		
ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5-1.0 units/ μ l	0.1	ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำ PCR grade ให้ได้ 25 ไมโครลิตร		

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ DGGE

0% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล		
40% อะคริลาไมด์เจล/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
น้ำปลออดประจุ	78	มิลลิลิตร
100% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล		
40% อะคริลาไมด์เจล/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร

ฟอร์มาไมด์	40	มิลลิลิตร
ยูเรีย	42	มิลลิลิตร
เติมน้ำปลอดประจุ จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร		

30% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

0% Denaturing solution	11.2	มิลลิลิตร
100% Denaturing solution	4.8	มิลลิลิตร

60% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

0% Denaturing solution	6.4	มิลลิลิตร
100% Denaturing solution	9.6	มิลลิลิตร

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

สารละลายตรวจวัดไลเปสแอกทิวิตี

สารละลาย A

พารา-ไนโตรฟินิล อะซีเตท	0.45	กรัม
2-โพรพานอล	50	มิลลิลิตร

สารละลาย B

ไดโพรเทสซีเอ็มไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.61	กรัม
โพรเทสซีเอ็มไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.36	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ	450	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรเป็น 500

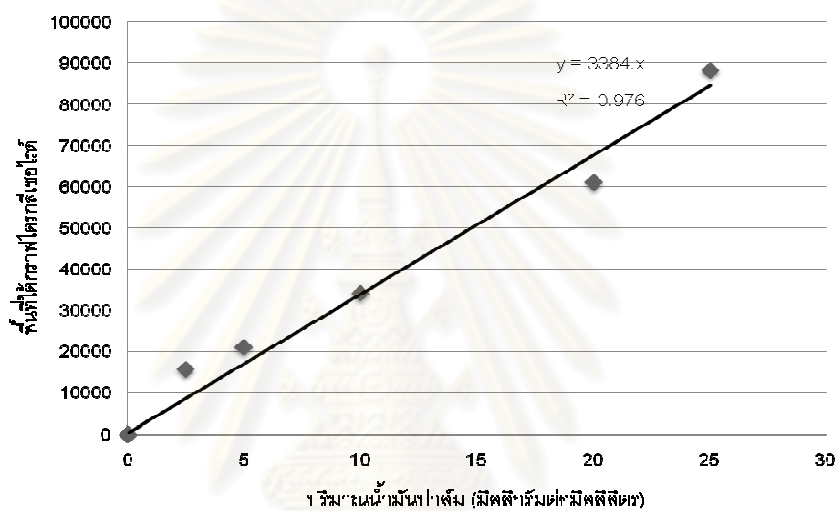
มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

เก็บสารละลาย A และ สารละลาย B ในขวดสีชา

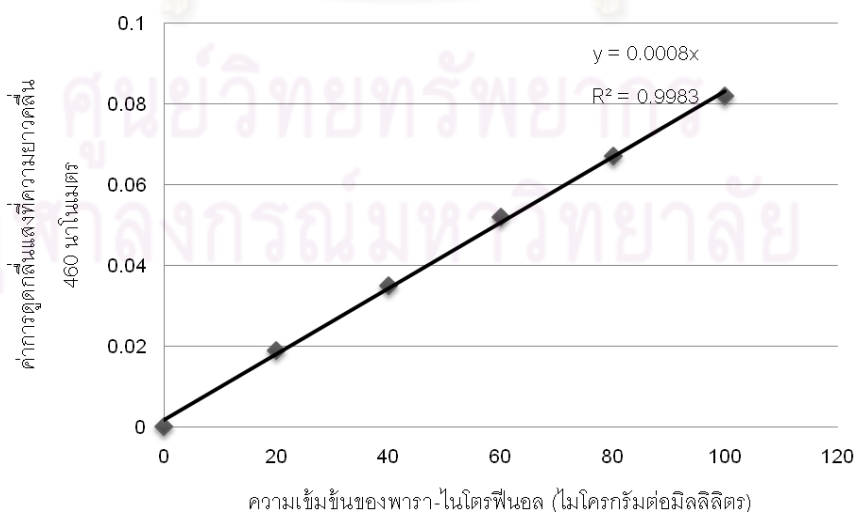
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานปริมาณน้ำมันปาล์ม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อพื้นที่ได้กราฟ จากการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง TLC-FID



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐาน พารา-ไนโตรฟีนอล



ภาคผนวก ง

ตารางและกราฟแสดงค่า Specific growth rate determination ของจุลินทรีย์คัดเลือกทั้ง 10 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

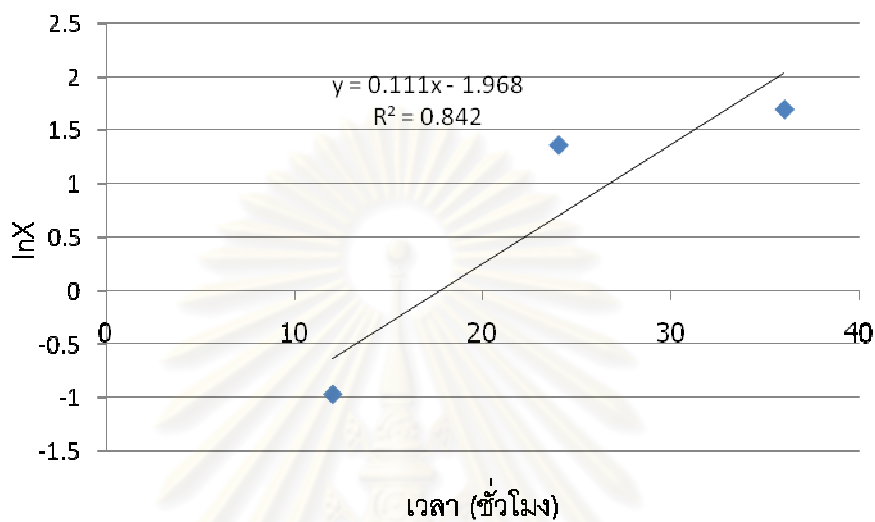
ตาราง ง.1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์คัดเลือกทั้ง 10 สายพันธุ์ ในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

รหัส จุลินทรีย์	เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/50มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ln(X)	$\mu(h-1)$
C7	0	6.20	0.12	-2.12026	-
	12	18.77	0.38	-0.96758	0.096057
	24	196.20	3.92	1.366092	0.194473
	36	274.50	5.48	1.701105	0.027918
	48	233.97	4.68	1.543298	-0.01315
	60	232.10	4.64	1.534714	-0.00072
L9	0	5.71	0.12	-2.12026	-
	12	40.68	0.82	-0.19845	0.160151
	24	181.91	3.64	1.291984	0.124203
	36	224.72	4.50	1.504077	0.017674
	48	260.49	5.20	1.648659	0.012048
	60	204.23	4.08	1.406097	-0.02021
L11	0	4.24	0.08	-2.52573	-
	12	22.47	0.44	-0.82098	0.142062
	24	28.60	0.58	-0.54473	0.023021
	36	42.64	0.86	-0.15082	0.032825
	48	77.36	1.54	0.431782	0.04855
	60	87.12	1.74	0.553885	0.010175
	72	117.08	2.34	0.850151	0.024689

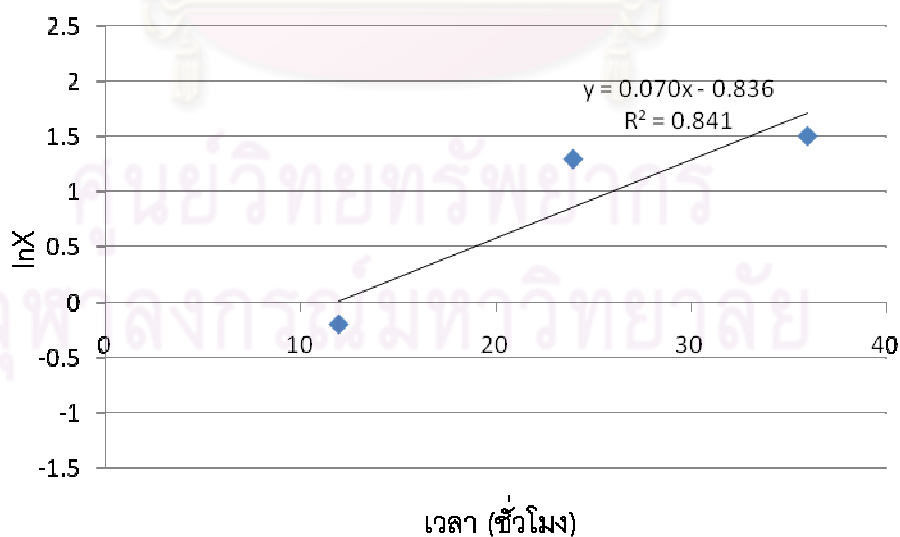
รหัส จุลินทรีย์	เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/50มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ln(X)	$\mu(h-1)$
S4	0	3.19	0.06	-2.81341	-
	12	11.85	0.24	-1.42712	0.115525
	24	42.20	0.84	-0.17435	0.104397
	36	132.81	2.66	0.978326	0.096057
	48	198.96	3.98	1.381282	0.03358
	60	423.23	8.46	2.135349	0.062839
Y2	0	5.00	0.1	-2.30259	-
	12	21.28	0.42	-0.8675	0.11959
	24	127.65	2.56	0.940007	0.150626
	36	172.22	3.44	1.235471	0.024622
	48	206.76	4.14	1.420696	0.015435
	60	308.54	6.18	1.821318	0.033385
Y3	0	5.72	0.12	-2.12026	-
	12	9.45	0.18	-1.7148	0.033789
	24	35.11	0.7	-0.35667	0.113177
	36	67.17	1.34	0.29267	0.054112
	48	85.16	1.70	0.530628	0.01983
	60	125.40	2.50	0.916291	0.032139
Y4	0	5.86	0.12	-2.12026	-
	12	25.60	0.52	-0.65393	0.122195
	24	36.05	0.72	-0.3285	0.027119
	36	73.70	1.48	0.392042	0.060046
	48	90.12	1.8	0.587787	0.016312
	60	132.61	2.66	0.978326	0.032545

รหัส จุดอินทรีย์	เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/50มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ln(X)	$\mu(h-1)$
	72	141.17	2.82	1.036737	0.004868
V1	0	6.65	0.14	-1.96611	-
	12	21.11	0.42	-0.8675	0.091551
	24	40.06	0.80	-0.22314	0.053696
	36	56.68	1.14	0.131028	0.029514
	48	78.23	1.56	0.444686	0.026138
	60	96.31	1.92	0.652325	0.017303
	72	91.46	1.82	0.598837	-0.00446
V3	0	1.06	0.02	-3.91202	-
	12	3.89	0.08	-2.52573	0.115525
	24	20.57	0.40	-0.91629	0.13412
	36	23.36	0.46	-0.77653	0.011647
	48	68.65	1.38	0.322083	0.091551
	60	93.37	1.86	0.620576	0.024874
	72	88.83	1.78	0.576613	-0.00366
T3	0	2.31	0.04	-3.21888	-
	12	6.98	0.14	-1.96611	0.104397
	24	24.25	0.48	-0.73397	0.102679
	36	68.07	1.36	0.307485	0.086788
	48	96.61	1.94	0.662688	0.0296
	60	98.07	1.96	0.672944	0.000855
	72	99.12	1.98	0.683097	0.000846

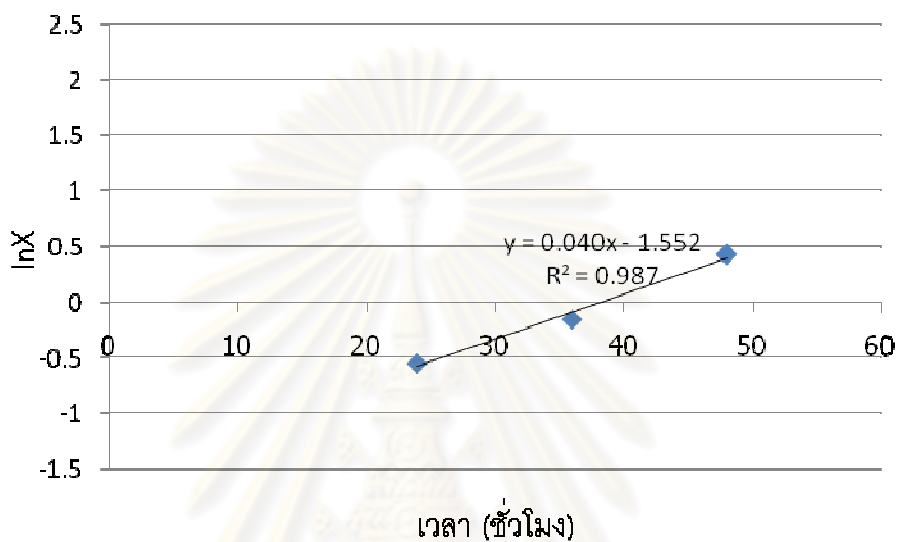
รูปที่ ง.1 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส C7 (*Candida sp.*CBS 10854)



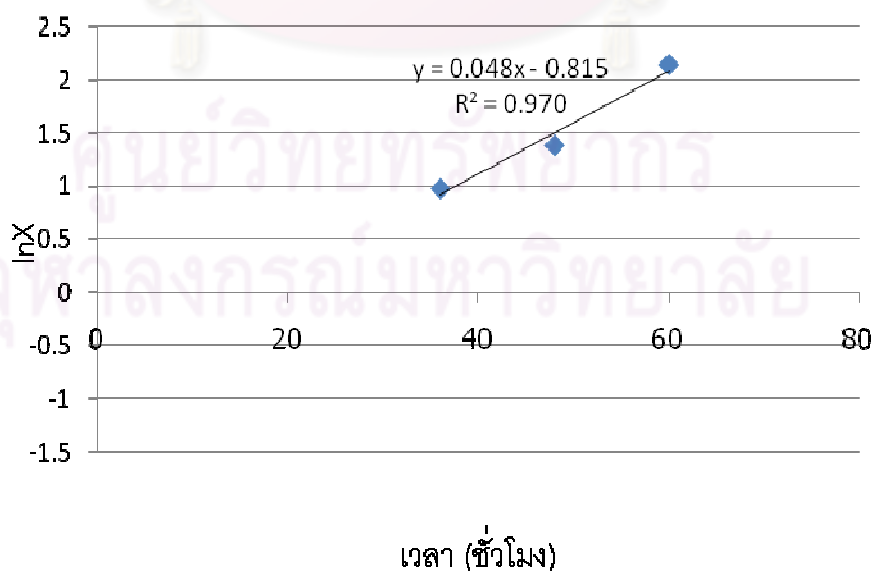
รูปที่ ง.2 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส L9 (*Candida tropicalis* strain Vaucher)



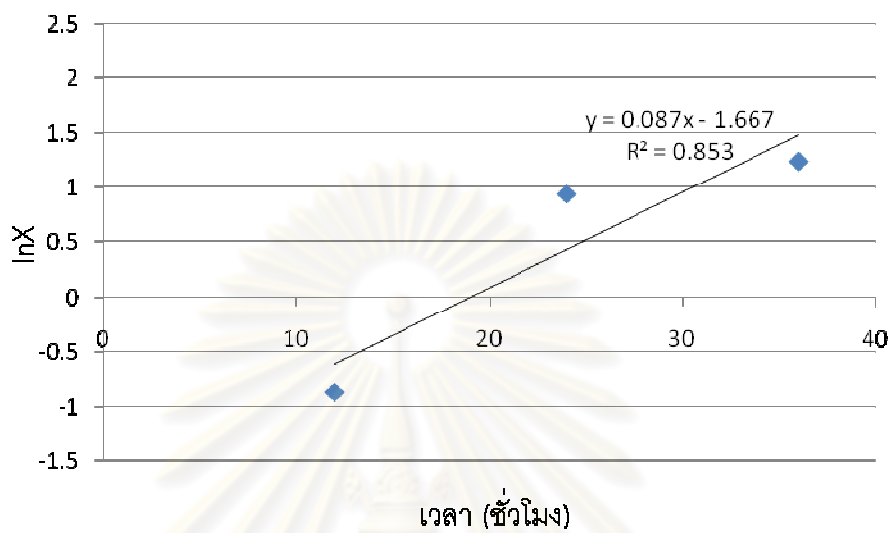
รูปที่ ๓.3 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส L11 (*Candida tropicalis* strain 131)



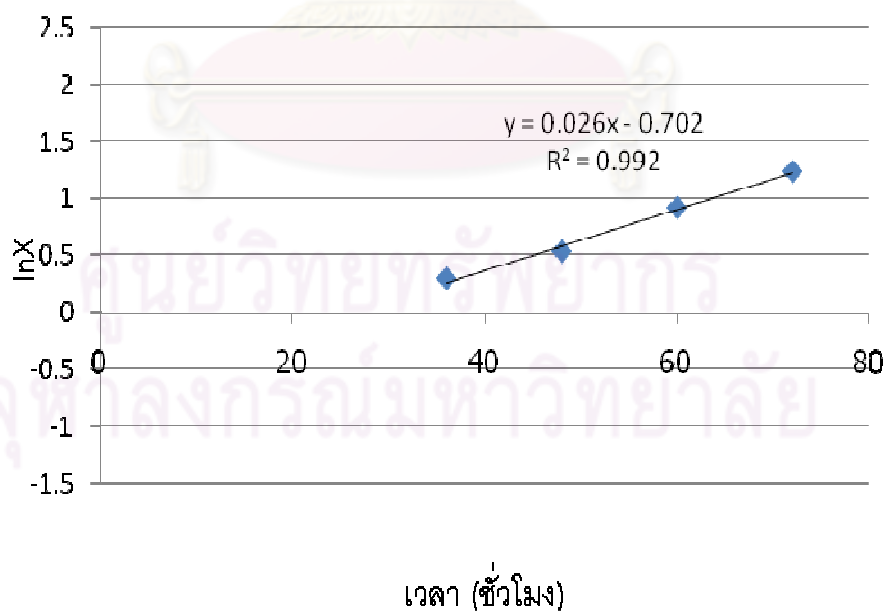
รูปที่ ๓.4 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส S4 (*Candida boidinii*)



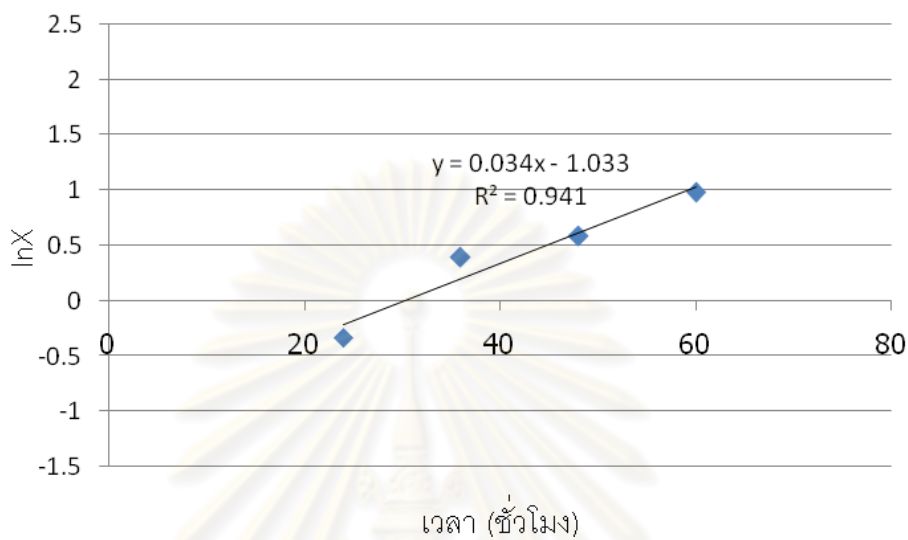
รูปที่ 5.5 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รहित Y2 (*Yarrowia lipolytica*)



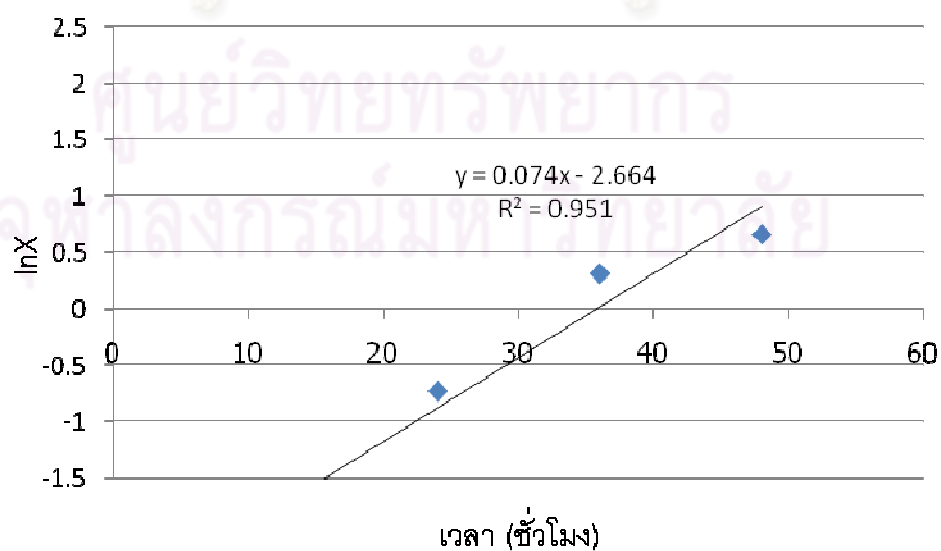
รูปที่ 5.6 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รहित Y3 (*Candida albican*)



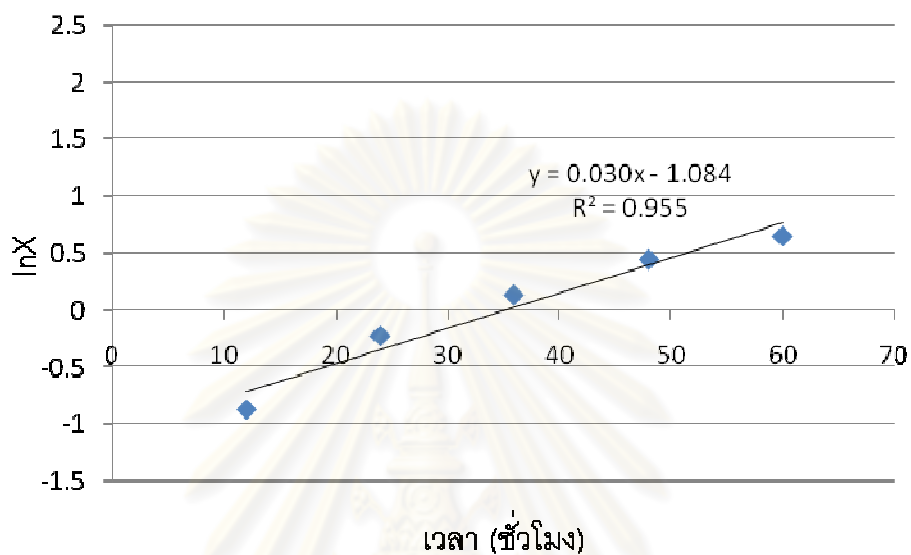
รูปที่ ง.7 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รहित Y4 (*Pichi Jadinii*)



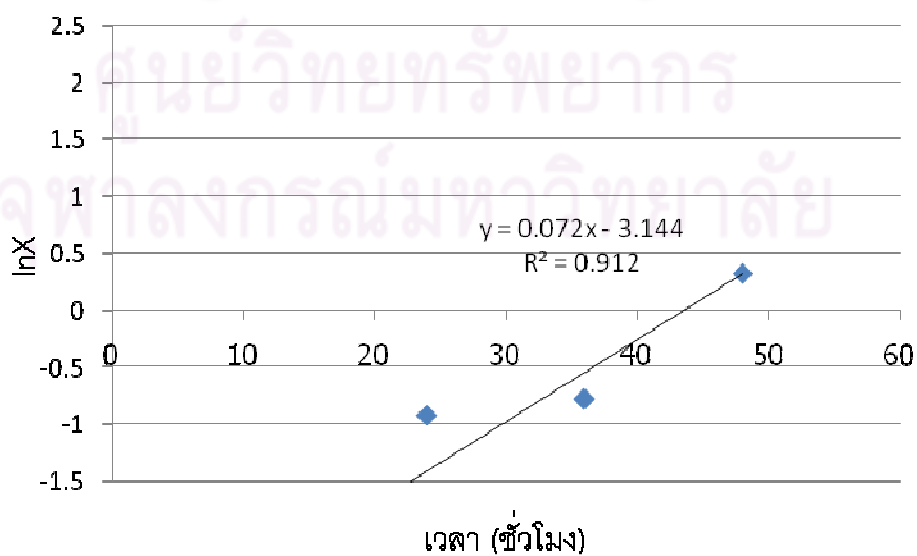
รูปที่ ง.8 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รहित T3 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28)



รูปที่ ง.9 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส V1 (*Pseudomonas* sp.)



รูปที่ ง.10 ค่า Specific growth rate determination ของ จุลินทรีย์รหัส V3 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17)



รหัส จุลินทรีย์	เวลา (h)	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 1	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 2	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 3	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 1	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 2	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml)	ส่วน เบี่ยง เบน มาตรฐาน
	24	0.055	0.061	0.049	0.321	0.356	0.286	0.321	0.03
	36	0.12	0.113	0.094	0.700	0.659	0.548	0.636	0.08
	48	0.108	0.102	0.072	0.630	0.595	0.420	0.548	0.11
	60	0.035	0.044	0.041	0.204	0.257	0.239	0.233	0.03
	72	0.054	0.056	0.064	0.315	0.327	0.373	0.338	0.03
S4	0	0.02	0.016	0.018	0.117	0.093	0.105	0.105	0.01
	12	0.1	0.099	0.083	0.583	0.578	0.484	0.548	0.06
	24	0.055	0.051	0.032	0.321	0.298	0.187	0.268	0.07
	36	0.209	0.197	0.188	1.219	1.149	1.097	1.155	0.06
	48	0.098	0.084	0.064	0.572	0.490	0.373	0.478	0.10
	60	0.084	0.085	0.083	0.490	0.496	0.484	0.490	0.01
	72	0.158	0.16	0.156	0.922	0.933	0.910	0.922	0.01
Y2	0	0.024	0.021	0.03	0.140	0.123	0.175	0.146	0.03
	12	0.067	0.058	0.034	0.391	0.338	0.198	0.309	0.10
	24	0.259	0.245	0.207	1.511	1.429	1.208	1.383	0.16
	36	0.213	0.215	0.208	1.243	1.254	1.213	1.237	0.02
	48	0.146	0.138	0.121	0.852	0.805	0.706	0.788	0.07
	60	0.086	0.083	0.086	0.502	0.484	0.502	0.496	0.01
	72	0.115	0.113	0.132	0.671	0.659	0.770	0.700	0.06
Y3	0	0.028	0.027	0.029	0.163	0.158	0.169	0.163	0.01
	12	0.145	0.151	0.13	0.846	0.881	0.758	0.828	0.06
	24	0.143	0.155	0.14	0.834	0.904	0.817	0.852	0.05
	36	0.188	0.169	0.132	1.097	0.986	0.770	0.951	0.17
	48	0.087	0.076	0.059	0.508	0.443	0.344	0.432	0.08

รหัส จุลินทรีย์	เวลา (h)	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 1	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 2	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 3	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 1	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 2	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml)	ส่วน เบี่ยง เบน มาตรฐาน
	60	0.112	0.117	0.107	0.653	0.683	0.624	0.653	0.03
	72	0.155	0.149	0.125	0.904	0.869	0.729	0.834	0.09
Y4	0	0.03	0.014	0.01	0.175	0.082	0.058	0.105	0.06
	12	0.078	0.072	0.081	0.455	0.420	0.473	0.449	0.03
	24	0.055	0.052	0.049	0.321	0.303	0.286	0.303	0.02
	36	0.154	0.138	0.134	0.898	0.805	0.782	0.828	0.06
	48	0.112	0.098	0.072	0.653	0.572	0.420	0.548	0.12
	60	0.169	0.156	0.158	0.986	0.910	0.922	0.939	0.04
	72	0.098	0.089	0.062	0.572	0.519	0.362	0.484	0.11
T3	0	0.006	0.006	0.006	0.035	0.035	0.035	0.035	0.00
	12	0.208	0.199	0.175	1.213	1.161	1.021	1.132	0.10
	24	0.217	0.211	0.214	1.266	1.231	1.248	1.248	0.02
	36	0.221	0.224	0.224	1.289	1.307	1.307	1.301	0.01
	48	0.209	0.199	0.222	1.219	1.161	1.295	1.225	0.07
	60	0.188	0.192	0.211	1.097	1.120	1.231	1.149	0.07
	72	0.099	0.087	0.126	0.578	0.508	0.735	0.607	0.12
V1	0	0.003	0.005	0.007	0.018	0.029	0.041	0.029	0.01
	12	0.109	0.108	0.107	0.636	0.630	0.624	0.630	0.01
	24	0.121	0.113	0.093	0.706	0.659	0.543	0.636	0.08
	36	0.144	0.156	0.141	0.840	0.910	0.823	0.857	0.05
	48	0.134	0.156	0.148	0.782	0.910	0.863	0.852	0.06
	60	0.112	0.106	0.094	0.653	0.618	0.548	0.607	0.05
	72	0.044	0.044	0.047	0.257	0.257	0.274	0.263	0.01
V3	0	0.006	0.006	0.006	0.035	0.035	0.035	0.035	0.00

รหัส จุลินทรีย์	เวลา (h)	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 1	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 2	OD ₄₆₀ nm. ซ้ำที่ 3	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 1	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 2	ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml) ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย ไลเปส แอกทิวิตี (Unit/ml)	ส่วน เบี่ยง เบน มาตรฐาน
	12	0.231	0.235	0.257	1.348	1.371	1.499	1.406	0.08
	24	0.113	0.112	0.096	0.659	0.653	0.560	0.624	0.06
	36	0.233	0.256	0.282	1.359	1.493	1.645	1.499	0.14
	48	0.167	0.174	0.166	0.974	1.015	0.968	0.986	0.03
	60	0.102	0.089	0.103	0.595	0.519	0.601	0.572	0.05
	72	0.198	0.195	0.168	1.155	1.138	0.980	1.091	0.10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑.2 ค่าOD₄₆₀ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส *p*-nitrophenyl acetate โดยเอนไซม์ไลเปส ผนด้วย OD₄₆₀ ของเอนไซม์แบลงค์ ของกลุ่มยีสต์ เมื่อเลี้ยงกลุ่มยีสต์ ในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปลาเป็นแหล่งคาร์บอน 1เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาค่าไลเปสแอกทิวิตี

กลุ่มจุลินทรีย์	เวลา (h)	OD ₄₆₀ nm. ชั่วโมงที่ 1	OD ₄₆₀ nm. ชั่วโมงที่ 2	OD ₄₆₀ nm. ชั่วโมงที่ 3	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 1	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 2	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 3	ค่าเฉลี่ยไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
จุลินทรีย์กลุ่มยีสต์	0	0.432	0.435	0.447	2.520	2.538	2.608	2.555	0.05
	12	0.451	0.455	0.471	2.631	2.654	2.748	2.678	0.06
	24	0.435	0.435	0.435	2.538	2.538	2.538	2.538	0.00
	36	0.398	0.388	0.366	2.322	2.263	2.135	2.240	0.10
	48	0.433	0.434	0.429	2.526	2.532	2.503	2.520	0.02
	60	0.433	0.433	0.433	2.526	2.526	2.526	2.526	0.00
	72	0.401	0.409	0.363	2.339	2.386	2.118	2.281	0.14
	84	0.388	0.376	0.367	2.263	2.193	2.141	2.199	0.06
	96	0.465	0.468	0.465	2.713	2.730	2.713	2.718	0.01
	108	0.332	0.342	0.322	1.937	1.995	1.878	1.937	0.06
	120	0.439	0.442	0.436	2.561	2.578	2.543	2.561	0.02
	132	0.289	0.275	0.255	1.686	1.604	1.488	1.593	0.10
	144	0.254	0.247	0.225	1.482	1.441	1.313	1.412	0.09
	156	0.332	0.356	0.362	1.937	2.077	2.112	2.042	0.09
168	0.355	0.351	0.344	2.071	2.048	2.007	2.042	0.03	

ตารางที่ ๑.3 ค่า OD_{460} ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส *p*-nitrophenyl acetate โดยเอนไซม์ไลเปส ผนด้วย OD_{460} ของเอนไซม์แบดจ์ของกลุ่มแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาค่าไลเปสแอกทิวิตี

กลุ่มจุลินทรีย์	เวลา (h)	OD_{460} nm. ชั่วโมงที่ 1	OD_{460} nm. ชั่วโมงที่ 2	OD_{460} nm. ชั่วโมงที่ 3	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 1	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 2	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 3	ค่าเฉลี่ยไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย	0	0.236	0.242	0.242	1.377	1.412	1.412	1.400	0.02
	12	0.271	0.266	0.258	1.581	1.552	1.505	1.546	0.04
	24	0.244	0.236	0.189	1.423	1.377	1.103	1.301	0.17
	36	0.387	0.398	0.406	2.258	2.322	2.368	2.316	0.06
	48	0.275	0.256	0.249	1.604	1.493	1.453	1.517	0.08
	60	0.277	0.234	0.239	1.616	1.365	1.394	1.458	0.14
	72	0.322	0.325	0.322	1.878	1.896	1.878	1.884	0.01
	84	0.413	0.418	0.402	2.409	2.438	2.345	2.398	0.05
	96	0.411	0.405	0.387	2.398	2.363	2.258	2.339	0.07
	108	0.405	0.405	0.405	2.363	2.363	2.363	2.363	0.00
	120	0.277	0.264	0.23	1.616	1.540	1.342	1.499	0.14
	132	0.378	0.401	0.397	2.205	2.339	2.316	2.287	0.07
	144	0.408	0.408	0.405	2.380	2.380	2.363	2.374	0.01
	156	0.335	0.324	0.328	1.954	1.890	1.913	1.919	0.03
	168	0.305	0.321	0.289	1.779	1.873	1.686	1.779	0.09

ตารางที่ ๑.4 ค่า OD_{460} ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส *p*-nitrophenyl acetate โดยเอนไซม์ไลเปส ผนด้วย OD_{460} ของเอนไซม์แบลงค์ ของจุลินทรีย์กลุ่มผสม เมื่อเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาค่าไลเปสแอกทิวิตี

กลุ่มจุลินทรีย์	เวลา (h)	OD_{460} nm. ชั่วโมงที่ 1	OD_{460} nm. ชั่วโมงที่ 2	OD_{460} nm. ชั่วโมงที่ 3	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 1	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 2	ไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml) ชั่วโมงที่ 3	ค่าเฉลี่ยไลเปสแอกทิวิตี (Unit/ml)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
จุลินทรีย์กลุ่มผสม	0	0.511	0.534	0.524	2.981	3.115	3.057	3.051	0.07
	12	0.511	0.511	0.511	2.981	2.981	2.981	2.981	0.00
	24	0.5	0.488	0.482	2.917	2.847	2.812	2.858	0.05
	36	0.511	0.511	0.511	2.981	2.981	2.981	2.981	0.00
	48	0.509	0.511	0.504	2.969	2.981	2.940	2.963	0.02
	60	0.514	0.523	0.55	2.998	3.051	3.208	3.086	0.11
	72	0.512	0.508	0.501	2.987	2.963	2.923	2.958	0.03
	84	0.523	0.533	0.555	3.051	3.109	3.238	3.133	0.10
	96	0.525	0.523	0.527	3.063	3.051	3.074	3.063	0.01
	108	0.524	0.523	0.525	3.057	3.051	3.063	3.057	0.01
	120	0.533	0.523	0.537	3.109	3.051	3.133	3.098	0.04
	132	0.513	0.511	0.503	2.993	2.981	2.934	2.969	0.03
	144	0.504	0.51	0.513	2.940	2.975	2.993	2.952	0.03
	156	0.511	0.529	0.508	2.981	3.086	2.963	3.010	0.07
168	0.501	0.502	0.488	2.923	2.928	2.847	2.899	0.05	

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ จ.1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อเลี้ยงกลุ่มยีสต์ในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

กลุ่ม จุลินทรีย์	เวลา (h)	ค่าน้ำหนัก เซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่1	ค่าน้ำหนัก เซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่2	ค่าน้ำหนัก เซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่3	ค่าน้ำหนัก เซลล์แห้ง เฉลี่ย (mg/2.5 ml)	ค่า น้ำหนัก เซลล์แห้ง (mg/l)	ส่วน เบี่ยง เบน มาตรฐาน
จุลินทรีย์กลุ่มยีสต์	ก่อน เริ่ม ระบบ ต่อ เนื่อง	40.25	40.21	41.22	40.56	16.22	0.06
	12	39.01	38.32	38.71	38.68	15.47	0.35
	24	37.09	37.23	36.86	37.06	14.82	0.19
	36	37.76	37.98	37.15	37.63	15.05	0.43
	48	36.33	36.12	36.21	36.22	14.49	0.11
	60	35.01	35.35	35.63	35.33	14.13	0.31
	72	34.99	34.45	33.64	34.36	13.74	0.08
	84	33.13	34.02	34.04	33.73	13.49	0.26
	96	34.08	33.43	33.53	33.68	13.47	0.35
	108	35.56	34.91	35.34	35.27	14.11	0.33
	120	35.09	35.53	34.68	35.10	14.04	0.43
	132	34.78	35.56	34.75	35.03	14.01	0.46
	144	34.88	34.93	34.95	34.92	13.97	0.04
	156	34.89	35.21	34.81	34.97	13.99	0.21
168	34.23	34.45	34.94	34.54	13.82	0.36	

ตารางที่ ๑.2 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อเลี้ยงกลุ่มแบคทีเรียในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

กลุ่มจุลินทรีย์	เวลา (h)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่2	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่3	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (mg/2.5 ml)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย	ก่อนเริ่มระบบต่อเนื่อง	40.00	40.89	40.43	40.44	16.18	0.13
	12	38.34	38.54	38.98	38.62	15.45	0.23
	24	37.02	36.23	37.12	36.79	14.72	0.49
	36	36.65	36.63	36.61	36.63	14.65	0.59
	48	35.59	35.90	36.15	35.88	14.35	0.28
	60	35.11	34.92	35.60	35.21	14.08	0.35
	72	34.24	34.76	34.02	34.34	13.74	0.38
	84	33.35	33.13	33.60	33.36	13.34	0.24
	96	33.25	33.56	34.23	33.68	13.47	0.24
	108	34.21	33.87	33.83	33.97	13.59	0.21
	120	33.45	33.13	33.50	33.36	13.34	0.20
	132	34.13	34.98	33.64	34.25	13.70	0.29
	144	33.84	33.97	33.68	33.83	13.53	0.15
	156	34.43	35.00	33.53	34.32	13.73	0.63
	168	34.14	34.79	34.30	34.41	13.76	0.34

ตารางที่ ๑.3 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มผสมในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

กลุ่ม จุลินทรีย์	เวลา (h)	ค่าน้ำหนัก เซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่1	ค่าน้ำหนัก เซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่2	ค่าน้ำหนัก เซลล์แห้ง (mg/2.5 ml) ซ้ำที่3	ค่าน้ำหนัก เซลล์แห้ง เฉลี่ย (mg/2.5 ml)	ค่า น้ำหนัก เซลล์แห้ง (mg/l)	ส่วน เบี่ยง เบน มาตรฐาน
จุลินทรีย์กลุ่มผสม	ก่อน เริ่ม ระบบ ต่อ เนื่อง	40.25	41.02	41.10	40.79	16.32	0.15
	12	38.71	38.34	39.08	38.71	15.48	0.13
	24	38.69	38.65	38.61	38.65	15.46	0.33
	36	39.21	39.32	39.16	39.23	15.69	0.49
	48	39.13	38.97	39.23	39.11	15.64	0.13
	60	39.56	39.88	39.54	39.66	15.86	0.19
	72	39.12	39.13	39.11	39.12	15.65	0.48
	84	38.18	38.31	37.69	38.06	15.22	0.17
	96	38.34	38.13	38.04	38.17	15.27	0.15
	108	38.37	38.37	38.37	38.37	15.35	0.44
	120	38.29	38.11	38.32	38.24	15.30	0.11
	132	38.35	38.12	38.52	38.33	15.33	0.20
	144	38.24	38.56	38.10	38.30	15.32	0.24
	156	38.91	38.74	39.02	38.89	15.56	0.14
	168	38.55	38.32	38.39	38.42	15.37	0.12

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

ตาราง ข.1 เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มและปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์

จุลินทรีย์	เวลา (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย น้ำมันปาล์ม	ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูก ย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
C7	0	0.00	25.00
	12	21.42	19.64
	24	51.35	12.16
	36	84.24	3.94
	48	96.79	0.80
	60	97.18	0.71
	72	98.22	0.45
L9	0	0.00	25.00
	12	0.00	25.00
	24	2.14	24.47
	36	13.53	21.62
	48	15.47	21.13
	60	18.22	20.45
	72	40.31	14.92
S4	0	0.00	25.00
	12	7.16	23.21
	24	12.82	21.79
	36	46.78	13.30
	48	50.93	12.27
	60	72.87	6.78

จุดอินทรีย์	เวลา (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย น้ำมันปาล์ม	ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูก ย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
	72	73.29	6.68
Y2	0	0.00	25.00
	12	9.90	22.52
	24	17.02	20.74
	36	75.94	6.01
	48	85.20	3.70
	60	90.87	2.28
	72	95.51	1.12
Y3	0	0.00	25.00
	12	1.49	24.63
	24	18.56	20.36
	36	19.24	20.19
	48	30.04	17.49
	60	50.25	12.44
	72	69.14	7.72
Y4	0	0.00	25.00
	12	0.00	25.00
	24	2.88	24.28
	36	3.19	24.20
	48	3.35	24.16
	60	62.28	9.43
	72	63.18	9.21
T3	0	0.00	25.00
	12	6.23	23.44
	24	28.95	17.76
	36	33.83	16.54
	48	44.86	13.78

จุดอินทรีย์	เวลา (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย น้ำมันปาล์ม	ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูก ย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
	60	69.71	7.57
	72	91.48	2.13
V1	0	0.00	25.00
	12	31.67	17.08
	24	48.41	12.90
	36	50.34	12.41
	48	53.28	11.68
	60	53.44	11.64
	72	55.71	11.07
V3	0	0.00	25.00
	12	10.41	22.40
	24	21.74	19.56
	36	51.02	12.25
	48	54.65	11.34
	60	70.28	7.43
	72	91.78	2.06

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข.2 พื้นที่ได้กราฟปริมาณน้ำมันปาล์มเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มและปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไป โดยกลุ่มยีสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

กลุ่ม จุลินทรีย์	เวลา (ชั่วโมง)	พื้นที่ได้กราฟ ไตรกลีเซอไรด์	น้ำมันปาล์มที่เหลืออยู่ ในถังปฏิกรณ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำมันปาล์มที่ถูกย่อย สลายไป (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การ ย่อยสลายน้ำมัน ปาล์ม
จุลินทรีย์กลุ่มยีสต์	0	378	0.11	2.77	96.12
	12	924	0.27	2.61	90.52
	24	739	0.22	2.66	92.42
	36	1400	0.41	2.47	85.64
	48	1637	0.48	2.40	83.20
	60	1549	0.46	2.42	84.11
	72	1686	0.50	2.38	82.70
	84	1965	0.58	2.30	79.84
	96	1818	0.54	2.34	81.35
	108	1778	0.53	2.35	81.76
	120	1456	0.43	2.45	85.06
	132	1624	0.48	2.40	83.34
	144	1714	0.51	2.37	82.41
	156	1538	0.45	2.43	84.22
	168	1565	0.46	2.42	83.94
		ค่าเฉลี่ย		0.45	2.43
เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดยเฉลี่ย = 84.32 ± 3.40					

ตาราง ข.3 พื้นที่ได้กราฟปริมาณน้ำมันปาล์มเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มและปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไป โดยกลุ่มแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

กลุ่มจุลินทรีย์	เวลา (ชั่วโมง)	พื้นที่ได้กราฟ ไตรกลีเซอไรด์	น้ำมันปาล์มที่เหลืออยู่ในถังปฏิกรณ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลายไป (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม
จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย	0	5915	1.75	1.49	46.05
	12	4567	1.35	1.89	58.35
	24	3713	1.10	2.14	66.14
	36	3585	1.06	2.18	67.30
	48	2314	0.68	2.56	78.89
	60	3421	1.01	2.23	68.80
	72	3476	1.03	2.21	68.30
	84	2093	0.62	2.62	80.91
	96	2144	0.63	2.61	80.45
	108	2188	0.65	2.59	80.04
	120	3208	0.95	2.29	70.74
	132	2711	0.80	2.44	75.27
	144	2971	0.88	2.36	72.90
	156	2016	0.60	2.64	81.61
	168	1816	0.54	2.70	83.44
		ค่าเฉลี่ย		0.85	2.39
เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดยเฉลี่ย = 73.80 ± 7.45					

ตาราง ข.4 พื้นที่ได้กราฟปริมาณน้ำมันปาล์มเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มและปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไป โดย จุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

กลุ่ม จุลินทรีย์	เวลา (ชั่วโมง)	พื้นที่ได้กราฟ ไตรกลีเซอไรด์	น้ำมันปาล์มที่เหลืออยู่ ในถังปฏิกรณ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำมันปาล์มที่ถูกย่อย สลายไป (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การ ย่อยสลายน้ำมัน ปาล์ม	
จุลินทรีย์กลุ่มผสม	0	339	0.10	2.78	96.52	
	12	360	0.11	2.77	96.31	
	24	1356	0.40	2.48	86.09	
	36	508	0.15	2.73	94.79	
	48	563	0.17	2.71	94.22	
	60	1019	0.30	2.58	89.54	
	72	1004	0.30	2.58	89.70	
	84	1133	0.33	2.55	88.37	
	96	911	0.27	2.61	90.65	
	108	442	0.13	2.75	95.46	
	120	1001	0.30	2.58	89.73	
	132	1063	0.31	2.57	89.09	
	144	1549	0.46	2.42	84.11	
	156	1016	0.30	2.58	89.58	
	168	1034	0.31	2.57	89.39	
		ค่าเฉลี่ย		0.27	2.61	90.50
	เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์โดยเฉลี่ย = 90.50 ± 3.53					

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ D1 region ของ แถบดีเอ็นเอ C7.1 ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|EU570108.1| Candida sp. CBS 10854 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=563

Score = 237 bits (128), Expect = 2e-59
Identities = 130/131 (99%), Gaps = 0/131 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 57 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAT 116
      |||
Sbjct 1 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAT 60

Query 117 CTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAGTCTTGGTGGGCAACCTTGT 176
      |||
Sbjct 61 CTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAGTCTTGGTGGGCAACCTTGT 120

Query 177 CTATGTTTCCTT 187
      |||
Sbjct 121 CTATGTTTCCTT 131

```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ D1 region ของ แถบดีเอ็นเอ C7.2 ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|EU570108.1| Candida sp. CBS 10854 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=563

Score = 237 bits (128), Expect = 1e-59
Identities = 130/131 (99%), Gaps = 0/131 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 48 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAT 107
      |||
Sbjct 1 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAT 60

Query 108 CTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAGTCTTGGTGGGCAACCTTGT 167
      |||
Sbjct 61 CTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAGTCTTGGTGGGCAACCTTGT 120

Query 168 CTATGTTTCCTT 178
      |||
Sbjct 121 CTATGTTTCCTT 131

```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ D1 region ของ แถบดีเอ็นเอ C7.3 ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|EU570108.1| Candida sp. CBS 10854 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=563

Score = 220 bits (119), Expect = 1e-54
Identities = 127/131 (96%), Gaps = 0/131 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 48 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAT 107
      |||
Sbjct 1 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAT 60

Query 108 CTGGTACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAGTCTTGGTGGGCAACCTTGT 167
      |||
Sbjct 61 CTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAGTCTTGGTGGGCAACCTTGT 120

Query 168 CTTTGTTCCTT 178
      ||
Sbjct 121 CTATGTTTCCTT 131

```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ D1 region ของ แถบดีเอ็นเอ C7.4 ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|EU570108.1| Candida sp. CBS 10854 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=563

Score = 215 bits (116), Expect = 7e-53
Identities = 127/132 (96%), Gaps = 2/132 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 48 AAACCCACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAG-GCAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAA 106
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTG-AAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAA 59

Query 107 TCTGGCACTCTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAGTCTTGGTGGGCAACCTTG 166
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 60 TCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAGTCTTGGTGGCCAACCTTG 119

Query 167 TCTATGTCCTT 178
      ||||| |||||
Sbjct 120 TCTATGTCCTT 131

```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ D1 region ของ แถบดีเอ็นเอ A ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|EU394710.1| Candida tropicalis isolate YZ1 26S ribosomal RNA gene, partial
Sequence Length=610

Score = 237 bits (128), Expect = 1e-59
Identities = 136/140 (97%), Gaps = 0/140 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCA 60
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 14 GGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCA 73

Query 61 AATTTGAAATCTGGTACTTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTC 120
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 74 AATTTGAAATCTGGCACTTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTC 133

Query 121 TGGCGCTTGTCTATGTTTCT 140
      ||||| ||||| |||||
Sbjct 134 TGGCTCTTGTCTATGTTTCT 153

```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ D1 region ของ แถบดีเอ็นเอ B ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|EU239379.1| Yarrowia lipolytica strain TJY18b 26S ribosomal RNA gene, partial
Sequence Length=611

Score = 255 bits (138), Expect = 4e-65
Identities = 141/142 (99%), Gaps = 1/142 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 23 GCGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGA 82
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 62 GCGGG-CATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGA 120


Query 83 GTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATT 142
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 121 GTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATT 180

Query 143 GGAGAAAGCTAACCCAAGTTGC 164
      ||||| ||||| |||||
Sbjct 181 GGAGAAAGCTAACCCAAGTTGC 202

```


ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ แอบริเอ็นเอ V1.1 ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|GU371219.1| Pseudomonas sp. MZ-P4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1366

Score = 231 bits (125), Expect = 5e-58
Identities = 125/125 (100%), Gaps = 0/125 (0%)
Strand=Plus/Plus


Query 7 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC 66
      |||
Sbjct 262 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC 321

Query 67 ATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGCC 126
      |||
Sbjct 322 ATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGCC 381

Query 127 AGTAA 131
      |||
Sbjct 382 AGTAA 386
  
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ แอบริเอ็นเอ V1.2 ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|GU371219.1| Pseudomonas sp. MZ-P4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1366

Score = 231 bits (125), Expect = 5e-58
Identities = 125/125 (100%), Gaps = 0/125 (0%)
Strand=Plus/Plus


Query 7 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC 66
      |||
Sbjct 262 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC 321

Query 67 ATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGCC 126
      |||
Sbjct 322 ATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGCC 381

Query 127 AGTAA 131
      |||
Sbjct 382 AGTAA 386
  
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ แอบริเอ็นเอ V3 ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  gb|GU474984.1| Bacillus subtilis subsp. subtilis strain A17 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
Length=900


Score = 191 bits (103), Expect = 6e-46
Identities = 103/103 (100%), Gaps = 0/103 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGA 60
      |||
Sbjct 302 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGA 361

Query 61 GTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAG 103
      |||
Sbjct 362 GTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAG 404
  
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ แบคทีเรียเอ T3 ที่ตัดได้จากการทำ DGGE

```

>  dbj|AB159767.1| Bacillus sp. A4-7-1-1 gene for 16S rRNA
Length=1511

Score = 215 bits (116), Expect = 5e-53
Identities = 116/116 (100%), Gaps = 0/116 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 23  GGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC 82
          |||
Sbjct 327  GGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC 386

Query 83  AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA 138
          |||
Sbjct 387  AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA 442

```



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจุฑากานต์ บุญมี เกิดวันศุกร์ที่ 29 เมษายน พ.ศ. 2526 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2549 และสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 63/214 หมู่ 2 ซอยอุดมเดช 4 ซ้าย ถนนสุขุมวิท ตำบลบางเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ 10270



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย