

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม  
ภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลั้กับขาดแคลน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม  
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Analysis of microorganisms that are responsible for polyhydroxyalkanoate  
production in mixed culture under feast/famine feeding condition

Miss Donhatai Sruamsiri



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Engineering Program in Environmental Engineering

Department of Environmental Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตโพลีไฮดรอกซี-  
แอลคาโนเอตในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมภายใต้  
สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลับกับขาดแคลน

โดย

นางสาวดลหทัย สรวมศิริ

สาขาวิชา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบญจพร สุวรรณศิลป์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร.ภริณดา ทยานุกูล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชญ รัชฎาวงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบญจพร สุวรรณศิลป์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.ภริณดา ทยานุกูล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปียากร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนาธิป ฝาริโน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน)

ดลหทัย สรวมศิริ : การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลักับขาดแคลน (Analysis of microorganisms that are responsible for polyhydroxyalkanoate production in mixed culture under feast/famine feeding condition) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.เบญจพร สุวรรณศิลป์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.ภริณดา พยานุกูล, 156 หน้า.

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชเอจากกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมโดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากโรงงานผลิตเครื่องดื่มจากผักและผลไม้ โดยทำการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน (3,000 mgCOD/l) ภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลักับขาดแคลนในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทปริมาตร 20 ลิตร เติมน้ำโดยกำหนดค่าอายุตะกอน (SRT) 10 วัน ค่าระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2 วัน ทำการเติมอากาศตลอดเวลา ผลการทดลองพบว่าตะกอนจุลินทรีย์สามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุด 32.3% gPHA/gMLSS (34.2% gPHA/gMLVSS) ในรอบการเดินระบบที่ 12 เมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing พบว่าในรอบที่มีการผลิตพีเอชเอสูงสุดจุลินทรีย์กลุ่มหลัก คือ ไฟลัม *Proteobacteria* (88.07% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) ประกอบด้วยคลาส *Alphaproteobacteria* (13.26% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) *Betaproteobacteria* (51.37% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) และ *Gammaproteobacteria* (23.44% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียทั้ง 3 คลาสใน *Proteobacteria* ด้วยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A และการย้อมจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI พบว่ากลุ่มแบคทีเรียในคลาสของ *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria* มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอคิดเป็นร้อยละ 1.7 และ 12 เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ ตามลำดับ นอกจากนี้ไม่พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียกลุ่ม *Gammaproteobacteria* ในงานวิจัยนี้ อีกทั้งยังมีกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชเออีกจำนวนมากที่ไม่สามารถระบุกลุ่มจุลินทรีย์ได้

ภาควิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5770414721 : MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING

KEYWORDS: POLYHYDROXYALKANOATE (PHA); MIXED CULTURES OF MICROORGANISMS; BIOPLASTIC; 16S RRNA GENE AMPLICON SEQUENCING; FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH); FEAST/FAMINE FEEDING; PHA STAINING

DONHATAI SRUAMSIRI: Analysis of microorganisms that are responsible for polyhydroxyalkanoate production in mixed culture under feast/famine feeding condition. ADVISOR: ASST. PROF.BENJAPORN SUWANNASILP, Ph.D., CO-ADVISOR: PARINDA THAYANUKUL, Ph.D., 156 pp.

This study investigated groups of microorganisms in mixed microbial cultures derived from the wastewater treatment plant of a fruit and vegetable factory which can accumulate polyhydroxyalkanoate (PHA). The mixed microbial cultures were enriched under feast and famine condition using a 20 L sequencing batch reactor (SBR). Synthetic wastewater containing acetate 3,000 mgCOD/l was used in this study. The SBR was operated under aerobic condition with the sludge retention time (SRT) of 10 days and the hydraulic retention time (HRT) of 2 days. The results show that the sludge enriched with acetate produced and accumulated a maximum PHA of 32.3 % gPHA/gMLSS (34.2 % gPHA/gMLVSS) after 4 hours in the 12<sup>th</sup> cycle of operation. From the 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis, the dominant group of microorganisms in the sludge with maximum PHA was *Proteobacteria* (88.07% of total number of sequences) consisting of *Alphaproteobacteria* (13.26% of total number of sequences), *Betaproteobacteria* (51.37% of total number of sequences), and *Gammaproteobacteria* (23.44% of total number of sequences). According to the results from Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) with PHA staining (Nile Blue A) and total microorganism staining (DAPI), among total PHA accumulating cells, 1.7 % belonged to *Alphaproteobacteria* and 12% belonged to *Betaproteobacteria*. However, none of *Gammaproteobacteria* was found to produce PHA. Majority of PHA accumulating cells were not yet identified.

Department: Environmental Engineering      Student's Signature .....

Field of Study: Environmental Engineering      Advisor's Signature .....

Academic Year: 2016      Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รหัสโครงการ CU-58-042-AM) และขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบญจพร สุวรรณศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ให้คำปรึกษา คำแนะนำทุกขั้นตอนในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มจนประสบความสำเร็จ ท่านคอยกระตุ้นและให้กำลังใจดิฉันเสมอมา กราบขอบพระคุณที่ท่านอบรมสั่งสอนดิฉัน รวมไปถึงการมี group meeting ให้ดิฉันได้พัฒนาตัวเองและฝ่าฟันอุปสรรคมาถึงจุดนี้ได้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ภริณดา ทยานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำเรื่องเทคนิคทางชีวโมเลกุล Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH) รวมไปถึงเทคนิคในการปรับแสงกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence ให้เหมาะสมกับภาพด้วย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล อาคารสี่ภาควิชา คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณคุณรามนรี เนตรวิเชียร (พี่เหม้ม) เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการอาคารสี่ภาควิชา คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้คำปรึกษาเรื่องการใช้เครื่องมือ Gas chromatography รวมไปถึงการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณคุณภัทรพร คุณาพงษ์กิติ (พี่ทราย) คุณกฤตยพงษ์ จันทระเดช (พี่อ้อม) นิสิตดุขุภัณฑ์ และคุณธารเพชร เจริญวุฒิพงษ์ (พี่เพชร) นิสิตมหาบัณฑิต ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอ เทคนิค PCR และเทคนิค FISH

ขอขอบคุณ ดร.จตุพล เหลียงสกุล (พี่อ้อม) เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำการใช้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence ระบบ confocal (Fluoview FV10i Olympus)

ขอขอบคุณบริษัท ทิปโก้ เอฟแอนด์บี จำกัด (อำเภอวังน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตะกอนจุลินทรีย์ และขอขอบคุณคุณไกรภพ ถึงแสง วิศวกรสิ่งแวดล้อมประจำโรงงาน ผู้ดำเนินการจัดการเรื่องขอความอนุเคราะห์ตะกอนจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือวิจัย

และสุดท้ายขอขอบคุณพ่อ แม่ พี่ น้อง และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจและอยู่เคียงข้างดิฉันเสมอมา รวมไปถึงเพื่อนทุก ๆ คน ที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จในครั้งนี้

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ .....	ฎ
สารบัญตาราง.....	ฏ
สารบัญแผนภาพ .....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำสำคัญ (Keyword) .....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.4 สมมติฐานของงานวิจัย.....	4
1.5 ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 เอกสารและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง .....	7
2.1 โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตหรือพีเอชเอ (Polyhydroxyalkanoate; PHA).....	7
2.2 โครงสร้างของพีเอชเอ (Structure of PHA) .....	8
2.2.1 กลุ่มโพลิเมอร์สายสั้น (Short-Chain-Length; SCL-PHAs).....	8
2.2.2 กลุ่มโพลิเมอร์สายกลาง (Medium-Chain-Length; MCL-PHAs).....	9
2.2.3 โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตชนิดโฮโมโพลิเมอร์ (Homopolymer) .....	9
2.2.4 โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตชนิดเฮเทอโรโพลิเมอร์ (Heteropolymer) .....	10
2.3 วิธีการผลิตพีเอชเอ (PHA production).....	10

2.3.1 การผลิตพีเอชเอโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ (Pure cultures of microorganisms).....	11
2.3.2 การผลิตพีเอชเอโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม (Mixed cultures of microorganisms).....	12
2.3.2.1 ระบบไร้อากาศสลับกับมีอากาศ (Anaerobic-aerobic process).....	12
2.3.2.2 ระบบมีอากาศเล็กน้อยสลับกับมีอากาศ (Microaerophilic-aerobic process).....	14
2.3.2.3 ระบบที่มีการให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน (Aerobic dynamic feeding process; ADF หรือ Feast and Famine feeding process).....	14
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพีเอชเอภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน.....	17
2.4.1 สารอาหารหรือสารตั้งต้น (Substrate).....	17
2.4.2 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio).....	19
2.4.3 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง หรือค่าพีเอช (pH).....	20
2.4.4 อุณหภูมิ (Temperature).....	20
2.4.5 ค่าอายุตะกอน (Sludge retention time: SRT).....	21
2.4.6 ค่าระยะเวลากักเก็บน้ำ (Hydraulic retention time: HRT).....	22
2.4.7 อัตราส่วนระหว่างอาหารต่อจุลินทรีย์ (F/M ratio).....	22
2.4.8 อัตราส่วนของระยะที่มีการให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน (Feast/Famine ratio หรือ F/F ratio).....	23
2.5 กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่พบในการผลิตพีเอชเอ.....	24
2.6 การนำพีเอชเอไปใช้ประโยชน์.....	25
2.7 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ในการเดินระบบ.....	26
2.8 เทคนิคทางชีวโมเลกุล.....	29



2.8.1 เทคนิค Polymerase Chain Reaction หรือ PCR.....	29
2.8.2 เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing (MiSeq, Illumina) .....	31
2.8.3 เทคนิค Fluorescence in situ Hybridization หรือ FISH.....	33
2.8.4 เทคนิคการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile blue A.....	38
2.8.5 เทคนิคการย้อมจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI.....	39
2.9 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	46
3.1 แผนการวิจัย .....	46
3.2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย .....	48
3.2.1 การวิจัยช่วงที่ 1 .....	48
3.2.2 การวิจัยช่วงที่ 2 .....	60
3.2.3 การวิจัยช่วงที่ 3 .....	65
3.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง .....	75
3.3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	75
3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	76
3.3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์.....	76
3.3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ซีไอดี .....	76
3.3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing (MiSeq, Illumina).....	77
3.3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH การย้อมสีพีเอชเอและย้อมสี DAPI.....	77
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....	79
4.1 การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท.....	79

4.1.1 การเดินระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลั้กับขาด แคลน.....	79
4.1.1.1 ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในระบบ (COD) .....	80
4.1.1.2 ความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ (MLSS) .....	81
4.1.1.3 ค่าพีเอช ค่าออกซิเจนละลาย อุณหภูมิ และค่า SV30 .....	82
4.1.2 การสะสมพีเอชเอในระหว่างรอบการเดินระบบ .....	85
4.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing.....	90
4.3 การวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับ การย้อมสีพีเอชเอและการย้อมสี DAPI.....	97
4.4 การคาดการณ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ในระดับลึกกว่าคลาสใน <i>Proteobacteria</i> และไฟลัมอื่น ๆ .....	106
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	114
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	114
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	116
รายการอ้างอิง .....	117
ภาคผนวก.....	130
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	156

## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1	การสะสมพีเอชบีใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ SEM ของ <i>Ralstonia eutropha</i> B5786	.....7
ภาพที่ 2	โครงสร้างของพีเอชเอโดยทั่วไป (Structure of PHA)	.....8
ภาพที่ 3	โครงสร้างของโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (Structure of PHB)	.....8
ภาพที่ 4	โครงสร้างของโพลีไฮดรอกซีวาเลอเรท (Structure of PHV)	.....9
ภาพที่ 5	โครงสร้างของโคโพลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)	..... 10
ภาพที่ 6	แผนภาพการใช้สารอาหารและความสามารถในการผลิต	..... 11
ภาพที่ 7	กระบวนการผลิตพีเอชเอในจุลินทรีย์กลุ่ม PAO/GAO	..... 13
ภาพที่ 8	ระบบบำบัดน้ำเสียแบบ EBPR	..... 13
ภาพที่ 9	กระบวนการผลิตพีเอชเอในระบบ Feast/Famine	..... 15
ภาพที่ 10	ถังปฏิกรณ์เพื่อผลิตพีเอชเอด้วยระบบ Feast/Famine แบบต่อเนื่อง	..... 16
ภาพที่ 11	แผนภาพแสดงการผลิตโพลิเมอร์จากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ	..... 17
ภาพที่ 12	ลักษณะการทำงานของระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท	..... 28
ภาพที่ 13	หลักการการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR	..... 30
ภาพที่ 14	การเตรียมตัวอย่างก่อนเข้า Illumina MiSeq system	..... 32
ภาพที่ 15	การเพิ่มจำนวนแบบ bridge ภายใน Illumina MiSeq system	..... 33
ภาพที่ 16	เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบระดับความเกี่ยวข้องกับ PCR และระดับการให้ข้อมูลในเชิงปริมาณ	..... 34
ภาพที่ 17	การติดสี fluorescence	..... 34
ภาพที่ 18	ขั้นตอนในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH	..... 36
ภาพที่ 19	การย้อมสีจุลินทรีย์	..... 38
ภาพที่ 20	ภาพรวมการดำเนินการวิจัยทั้งหมด	..... 46
ภาพที่ 21	ถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	..... 49

ภาพที่ 22	ขั้นตอนของการเดินระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทใน 1 รอบ.....	54
ภาพที่ 23	การเตรียมสารละลาย Internal Standard ในการสกัดพีเอชเอ.....	56
ภาพที่ 24	การแยกชั้นของสารละลายคลอโรฟอร์มในหลอดทดลอง (ขนาด 16*100 mm.).....	57
ภาพที่ 25	DNA ladder&marker ขนาด 100 คู่เบส (Vivantis).....	63
ภาพที่ 26	แผ่นสไลด์ที่ใช้ในการหากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH.....	67
ภาพที่ 27	ขั้นตอนการทำสไลด์ให้แห้งด้วยการทำ alcohol series ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ .....	68
ภาพที่ 28	ความเข้มข้นซีโอดีเมื่อเริ่มต้น กึ่งกลาง และท้ายรอบ .....	80
ภาพที่ 29	ความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ (MLSS) เมื่อเริ่มต้น กึ่งกลาง และท้ายรอบ ของทุกรอบการเดินระบบ .....	81
ภาพที่ 30	ค่าพีเอช ค่าออกซิเจนละลาย และอุณหภูมิ ในทุกรอบของการเดินระบบ .....	82
ภาพที่ 31	การตกตะกอนของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ในรอบที่ 1 12 และ 22 .....	84
ภาพที่ 32	สีของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ในรอบที่ 1 12 และ 22 .....	84
ภาพที่ 33	ความเข้มข้นซีโอดี MLSS และปริมาณพีเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 4 .....	86
ภาพที่ 34	ความเข้มข้นซีโอดี MLSS MLVSS และปริมาณพีเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 8....	86
ภาพที่ 35	ความเข้มข้นซีโอดี MLSS MLVSS และปริมาณพีเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 12..	87
ภาพที่ 36	ความเข้มข้นซีโอดี MLSS และปริมาณพีเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 15 .....	87
ภาพที่ 37	ความเข้มข้นซีโอดี MLSS MLVSS และปริมาณพีเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 22..	88
ภาพที่ 38	ความเข้มข้นซีโอดี MLSS MLVSS และปริมาณพีเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 25..	88
ภาพที่ 39	ผลการทำ PCR ของตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างที่สามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุด.....	90
ภาพที่ 40	เปอร์เซ็นต์จำนวนลำดับเบสในไฟลัมต่าง ๆ .....	91
ภาพที่ 41	ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียคลาส <i>Alphaproteobacteria</i> .....	98
ภาพที่ 42	ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียคลาส <i>Betaproteobacteria</i> .....	99
ภาพที่ 43	ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียและแบคทีเรียคลาส <i>Gammaproteobacteria</i> .....	99

ภาพที่ 44 ผลการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI ร่วมกับการย้อมสีพีเอช-เอด้วย Nile Blue A และบริเวณที่พบพีเอชเอ ..... 100

ภาพที่ 45 ผลการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI และผลการซ้อนทับกันระหว่างแบคทีเรีย คลาส *Alphaproteobacteria* กับพีเอชเอ ในบริเวณลูกศรสีขาวที่ปรากฏแสงสีส้ม ..... 101

ภาพที่ 46 ผลการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI และผลการซ้อนทับกันระหว่างแบคทีเรีย คลาส *Betaproteobacteria* กับพีเอชเอ ในบริเวณลูกศรสีขาวที่ปรากฏแสงสีส้ม ..... 102

ภาพที่ 47 ผลการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI และผลการวิเคราะห์แบคทีเรียคลาส *Gamma* *proteobacteria* กับพีเอชเอ ในบริเวณลูกศรสีขาวที่ปรากฏเฉพาะแสงสีเหลือง ..... 102

ภาพที่ 48 ภาพรวมงานวิจัยทั้งหมด..... 106

ภาพที่ 49 ภาพสรุปอย่างง่ายของผลที่ได้จากงานวิจัยนี้..... 116



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพีเอชเอ.....	23
ตารางที่ 2	Fluorochromes ที่นิยมใช้ในการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH..	35
ตารางที่ 3	งานวิจัยที่สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพีเอชเอในกลุ่ม จุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมได้.....	44
ตารางที่ 4	องค์ประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์ (3,000 mg/L) ที่ใช้ในการเดินระบบ .....	52
ตารางที่ 5	ขั้นตอนของการเดินระบบถึงปฏิกรณ์แบบกึ่งเทใน 1 รอบ .....	53
ตารางที่ 6	ค่าพารามิเตอร์และปริมาณน้ำตะกอนตัวอย่างที่เก็บในรอบทั่วไป.....	54
ตารางที่ 7	ค่าพารามิเตอร์ตัวอย่างน้ำและตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างที่เก็บโดยละเอียด.....	55
ตารางที่ 8	สภาวะเครื่อง GC-FID .....	58
ตารางที่ 9	Primer ที่ใช้ในการทดลอง .....	61
ตารางที่ 10	โปรแกรมอุณหภูมิที่เหมาะสมกับ primer F515 และ R806.....	62
ตารางที่ 11	องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ต่อ 1 ตัวอย่าง.....	62
ตารางที่ 12	สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR clean up ต่อ 1 ตัวอย่าง .....	63
ตารางที่ 13	สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Fixation ต่อ 1 รอบของตัวอย่าง .....	67
ตารางที่ 14	ชนิดของ probe และ primer ที่ต้องการศึกษาในไฟลัม <i>Proteobacteria</i> .....	68
ตารางที่ 15	องค์ประกอบของสารละลาย hybridization buffer ที่ความเข้มข้น %FA ต่าง ๆ	69
ตารางที่ 16	องค์ประกอบของสารละลาย washing buffer ที่สอดคล้องกับ %FA ของ สารละลาย hybridization buffer ที่ความเข้มข้น %FA ต่าง ๆ .....	72
ตารางที่ 17	การติดสี fluorescence ของ probe และสารย้อมสี.....	74
ตารางที่ 18	จำนวนไฟลัม (เปอร์เซ็นต์) ที่พบในตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่าง.....	91
ตารางที่ 19	แบคทีเรียในระดับไฟลัม คลาส ออร์เดอร์ แฟมิลี และจิ้นัส ที่พบในงานวิจัยนี้ .....	92

**ตารางที่ 20** เปอร์เซ็นต์จำนวนลำดับเบสในแฟมิลีและจีนัสที่พบใน *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมดที่พบในตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์..... 93

**ตารางที่ 21** ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ..... 95

**ตารางที่ 22** Probe ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย 3 คลาสใน *Proteobacteria* และสารย้อมสี..... 97

**ตารางที่ 23** ผลการวิเคราะห์และยืนยันถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A และเทคนิคอื่น ๆ..... 105

**ตารางที่ 24** แบคทีเรียที่ลึกกว่าระดับไฟลัมที่คาดการณ์ว่าน่าจะมีสามารถในการผลิตพีเอชเอในงานวิจัยนี้..... 112



## สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1	แผนการดำเนินการวิจัยทั้งหมด.....	47
แผนภาพที่ 2	แผนการดำเนินการวิจัยช่วงที่ 1 .....	48
แผนภาพที่ 3	ขั้นตอนในการสกัดพีเอชเอออกจากเซลล์จุลินทรีย์.....	59
แผนภาพที่ 4	แผนการดำเนินงานวิจัยช่วงที่ 2 .....	60
แผนภาพที่ 5	แผนการดำเนินงานวิจัยช่วงที่ 3 .....	65





# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันปัญหาขยะนับว่าเป็นปัญหาสำคัญที่ควรได้รับการจัดการแก้ไขโดยเฉพาะอย่างยิ่งขยะจำพวกพลาสติก เนื่องจากขยะพลาสติกไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ อีกทั้งปริมาณการใช้พลาสติกยังมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจึงก่อให้เกิดขยะพลาสติกจำนวนมากและส่งผลกระทบต่อตรงต่อการจัดการด้านสุขภาพสิ่งแวดล้อม เช่น การฝังกลบ เป็นต้น พลาสติกที่ใช้กันอยู่อย่างแพร่หลายนี้ส่วนใหญ่ทำมาจากสารปิโตรเคมีที่ใช้น้ำมันและก๊าซธรรมชาติเป็นวัตถุดิบหลักซึ่งเป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วหมดไป เพื่อต้องการลดผลกระทบต่อในระยะยาวพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) จึงเป็นวัสดุทางเลือกที่เข้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีและได้รับความสนใจ รวมไปถึงนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสำคัญและศึกษากันอย่างมากในปัจจุบัน

พลาสติกชีวภาพ คือ พลาสติกชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาอันสั้น โดยโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตหรือพีเอชเอ (Polyhydroxyalkanoate; PHA) เป็นพลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตขึ้นได้จากกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในธรรมชาติและมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน (polypropylene) ที่ทำมาจากปิโตรเลียม ในช่วงแรกนักวิจัยหลายท่านเริ่มศึกษาความสามารถในการผลิตพีเอชเอจากกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ เช่น *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* และ recombinant *Escherichia coli* เป็นต้น (Shi และคณะ, (1997); Lee และ Choi, (1998); Grothe และคณะ, (1999); Grothe และ Chisti, (2000); และ Chen, (2010)) ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวสามารถผลิตพีเอชเอได้อย่างแน่นอนและมีประสิทธิภาพ (Lee, (1996)) อย่างไรก็ตามการผลิตพีเอชเอโดยกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์นั้นยังมีข้อจำกัดหลายประการ อาทิ ค่าใช้จ่ายในการใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ความชำนาญของนักวิจัยในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์เฉพาะด้าน รวมไปถึงความปลอดภัยต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ แต่ด้านที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อมากที่สุด คือ ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงในการดำเนินการโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อและสารอาหารที่ใช้ในการศึกษา จึงทำให้พีเอชเอที่ผลิตได้นั้นมีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับพลาสติกที่ทำมาจากปิโตรเคมี

ด้วยเหตุนี้ Kleerebezem และ van Loosdrecht, (2007) จึงมีความคิดที่จะศึกษาการผลิตพีเอชเอโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมและใช้น้ำเสียเป็นสารอาหารเพื่อลดต้นทุนของการผลิตลง ซึ่งข้อดีของการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม คือ ไม่ต้องอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อจึงช่วยให้ประหยัดต้นทุนได้อย่างมาก อีกทั้งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังสามารถกระตุ้นให้มีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอ

ได้ในปริมาณใกล้เคียงกับกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยการเดินระบบแบบให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน (feast/famine condition) โดยพบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมถูกกระตุ้นให้สามารถสะสมโพลีไฮดรอกซีบิวทีเลตหรือพีเอชบี (polyhydroxybutyrate; PHB) ได้มากถึง 89 % โดยน้ำหนักแห้ง หลังจากเดินระบบ 7.6 ชั่วโมงและทำการเติมอะซิเตท (acetate) อย่างต่อเนื่อง (fed-batch) ภายใต้สภาวะให้อาหารมากเกินพอสลับกับขาดแคลน (Johnson และคณะ, (2009)) นอกจากนี้ Albuquerque และคณะ, (2010) พบว่าน้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลเมื่อนำมาผ่านกระบวนการหมักจะผลิตพีเอชเอได้มากถึง 75 % โดยน้ำหนักแห้ง จากผลดังกล่าวทำให้การศึกษาการผลิตพีเอชเอโดยกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมเริ่มเป็นที่นิยมในปัจจุบัน

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่น่าสงสัยว่าจุลินทรีย์กลุ่มใดที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม มีงานวิจัยของนักวิจัยหลายท่านที่ได้ศึกษาถึงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบแต่งงานวิจัยดังกล่าวยังไม่สามารถระบุได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มใดที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้จริง ๆ งานวิจัยที่ผ่านมาของ Dionisi และคณะ, (2005) พบว่าเมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชกับการผลิตและสะสมพีเอชเอในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทแล้วพบว่าค่าพีเอชระหว่าง 6.5 ถึง 9.5 จะทำให้อัตราการผลิตและสะสมพีเอชเอมีปริมาณสูงกว่า 50 % (on a COD basis) อีกทั้งได้ทำการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE พบจุลินทรีย์กลุ่ม *Methylobacteriaceae Flavobacterium* sp. Candidatus *Meganema perideroedes* และ *Thauera* sp. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักในระบบ แต่ในงานวิจัยดังกล่าวไม่ได้ระบุว่าจุลินทรีย์กลุ่มใดที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ นอกจากนี้ Oehmen และคณะ, (2014) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการผลิตและสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมเช่นกัน โดยพบว่าที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 จุลินทรีย์จะสามารถผลิตพีเอชเอได้มากถึง 57.5% และมีอัตราการสะสมพีเอชเอมากถึง  $0.27 \text{ Cmol PHA Cmol X}^{-1} \text{ h}^{-1}$  และเมื่อทำการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 พบ *Azoarcus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่น่าจะมีสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอได้ในปริมาณที่สูง แต่จากงานวิจัยดังกล่าวก็ไม่สามารถยืนยันได้ว่าจุลินทรีย์ที่พบในระบบจะมีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอได้ และในงานวิจัยของ Ciesielski และคณะ, (2008) ซึ่งทำการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมโดยใช้เทคนิค quantitative PCR (qPCR) ร่วมกับ DGGE และเทคนิค clone library ในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทพบ *Pseudomonas* sp. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในระบบแต่ยังไม่มีที่ยืนยันถึงความสามารถในการสะสมพีเอชเอในระบบ

อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยจำนวนน้อยมากที่จะสามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพีเอชเอได้ มีเพียงงานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) ที่ศึกษากลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) และ FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอพบจุลินทรีย์ *Plasticumulans*

*acidivorans* และ *Thauera selenatis* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพืเอชเอในระบบ นอกจากนี้ยังพบ *Thauera* sp. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักจากงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) ถึง  $41.1 \pm 2.2\%$  ในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทที่ใช้อะซิเตทเป็นสารอาหารและพบ *Amaricoccus* sp. มากถึง  $61.4 \pm 1.9\%$  ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในถังปฏิกรณ์เมื่อให้โพรพิโอเนตเป็นสารตั้งต้น โดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ร่วมกับเทคนิค FISH และการย้อมสีพืเอชเอ ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวสามารถระบุกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพืเอชเอได้อย่างชัดเจน อีกทั้งในงานของ Jiang และคณะ, (2012) ได้ทำการศึกษาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษ พบ *Plasticumulans acidivorans* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นมากถึง 56 % ของจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบ โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมในระบบนี้สามารถผลิตและสะสมพืเอชเอได้สูงถึง 77% โดยน้ำหนักแห้ง (P(HB-co-HV) (HB : HV- 86 : 14)) โดยการใช้เทคนิค DGGE FISH การย้อมสีพืเอชเอและ quantitative PCR (qPCR) ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เหล่านี้สามารถยืนยันได้ว่า *Plasticumulans acidivorans* เป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพืเอชเอได้ในระบบดังกล่าว

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าการศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพืเอชเอในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมนั้นมีอยู่อย่างจำกัดมากทั้งที่เป็นที่คาดการณ์ว่ายังมีจุลินทรีย์อีกหลากหลายกลุ่มที่มีความสามารถในการสะสมพืเอชเอในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเพื่อระบุถึงจุลินทรีย์ที่สามารถทำหน้าที่ผลิตและสะสมพืเอชเอจากกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมภายใต้สภาวะการเดินระบบแบบให้อาหารเกินพอสลับกับแบบขาดแคลนได้ โดยเลือกใช้เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing ร่วมกับเทคนิค FISH การย้อมสีพืเอชเอและการย้อมสี DAPI ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยเพิ่มความเข้าใจและพัฒนากระบวนการผลิตและสะสมพืเอชเอโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมต่อไป

## 1.2 คำสำคัญ (Keyword)

โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตหรือพืเอชเอ (Polyhydroxyalkanoate; PHA); กลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม (Mixed microbial cultures); พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics); 16S rRNA gene amplicon sequencing; FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization); การให้อาหารแบบเกินพอสลับกับขาดแคลน (feast/famine feeding)

### 1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 เพื่อจำแนกชนิดของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมภายใต้สภาวะที่มีการให้อาหารเกินพอสลั้กับขาดแคลนโดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing

1.3.2 เพื่อระบุกลุ่มจุลินทรีย์ในระดับคลาสของ *Proteobacteria* ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพีเอชเอในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม โดยใช้เทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A และการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI

1.3.3 เพื่อวิเคราะห์และคาดการณ์จุลินทรีย์ในระดับที่ลึกกว่าคลาสใน *Proteobacteria* ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอโดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing ร่วมกับเทคนิค FISH และการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A

### 1.4 สมมติฐานของงานวิจัย

#### แนวคิดสมมติฐานข้อที่ 1

งานวิจัยที่ผ่านมาของ Lemos และคณะ, (2008); Moita และ Lemos, (2008); Jiang และคณะ, (2011a); Ciggin และคณะ, (2011); Jiang และคณะ, (2012) และ Queiros และคณะ, (2014) เป็นงานวิจัยในภูมิภาคยุโรปที่ศึกษาความสามารถในการผลิตพีเอชเอของตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน เติบโตด้วยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลั้กับขาดแคลนที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้เทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* ในคลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* โดยงานวิจัยนี้ศึกษาความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียในคลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ซึ่งทำการเติบโตในระบบภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลั้กับขาดแคลนเช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมาในภูมิภาคยุโรป

#### สมมติฐานข้อที่ 1 ของงานวิจัยนี้

กลุ่มแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* มีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลั้กับขาดแคลนที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน

## แนวคิดสมมติฐานข้อที่ 2

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยในภูมิภาคเอเชียที่ต้องการศึกษาความสามารถในการผลิตพีเอชเอของตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำผักและผลไม้ โดยใช้เทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A ซึ่งตะกอนจุลินทรีย์ในงานวิจัยนี้เดินระบบด้วยแหล่งตะกอนจุลินทรีย์ที่แตกต่างจากงานวิจัยในภูมิภาคยุโรป จึงสันนิษฐานว่าน่าจะพบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่แตกต่างจากงานวิจัยในภูมิภาคยุโรป

### สมมติฐานข้อที่ 2 ของงานวิจัยนี้

กลุ่มแบคทีเรียที่พบและคาดว่ามีความสามารถในการผลิตพีเอชเอในงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาในภูมิภาคยุโรปที่เดินระบบด้วยตะกอนจุลินทรีย์ที่ต่างกัน

## 1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการภาคชีววิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อศึกษาถึงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม โดยมีขอบเขตของงานวิจัยดังนี้

1.5.1 ดำเนินการทดลองโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมซึ่งนำมาจากระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบตะกอนเร่งของโรงงานผลิตน้ำผักและผลไม้ (บริษัท ทิปโก้ เอฟแอนด์บี จำกัด)

1.5.2 ใช้ถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท (Sequencing batch reactor, SBR) จำนวน 1 ถัง ภายใต้สภาวะที่มีการเติมอากาศตลอดเวลา กำหนดค่าอายุตะกอน (SRT) 10 วัน ค่าระยะเวลากักเก็บน้ำ (HRT) 2 วัน และเดินระบบแบบให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน

1.5.3 ดำเนินการทดลองโดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอะซิเตทเป็นอาหารหลัก

1.5.4 ทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ค่าพีเอช ค่าดีโอ อุณหภูมิ ค่าซีไอดี ค่าเอ็มแอลเอสเอส ค่าเอ็มแอลวีเอสเอส และพีเอชเอ

1.5.5 ทำการจำแนกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing

1.5.6 ทำการระบุกลุ่มจุลินทรีย์ในระดับคลาสของ *Proteobacteria* ที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอโดยใช้เทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A และการย้อมจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI

1.5.7 ทำการวิเคราะห์และคาดการณ์จุลินทรีย์ในระดับที่ลึกกว่าคลาสใน *Proteobacteria* ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมฟิเอชเอโดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing ร่วมกับเทคนิค FISH และการย้อมสีฟิเอชเอด้วย Nile Blue A

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยช่วยให้ทราบและยืนยันถึงจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตและสะสมฟิเอชเอในระดับคลาสของไฟลัม *Proteobacteria* ในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมภายใต้สภาวะอาหารเกินพอสลั้กับขาดแคลน ซึ่งในปัจจุบันงานวิจัยที่สามารถยืนยันข้อมูลดังกล่าวยังมีอยู่น้อยทั้งที่ความสามารถในการสะสมฟิเอชเอมีในจุลินทรีย์หลากหลายกลุ่ม

1.6.2 ผลที่ได้จากการจำแนกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบสามารถนำไปวิเคราะห์และคาดการณ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตและสะสมฟิเอชเอในระดับที่ลึกลงไป ได้แก่ ออเดอร์ แฟมิลี จีโนส และสปีชีส์ได้เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับผลที่ได้จากการยืนยันความสามารถในการสะสมฟิเอชเอในระดับคลาสของไฟลัม *Proteobacteria*

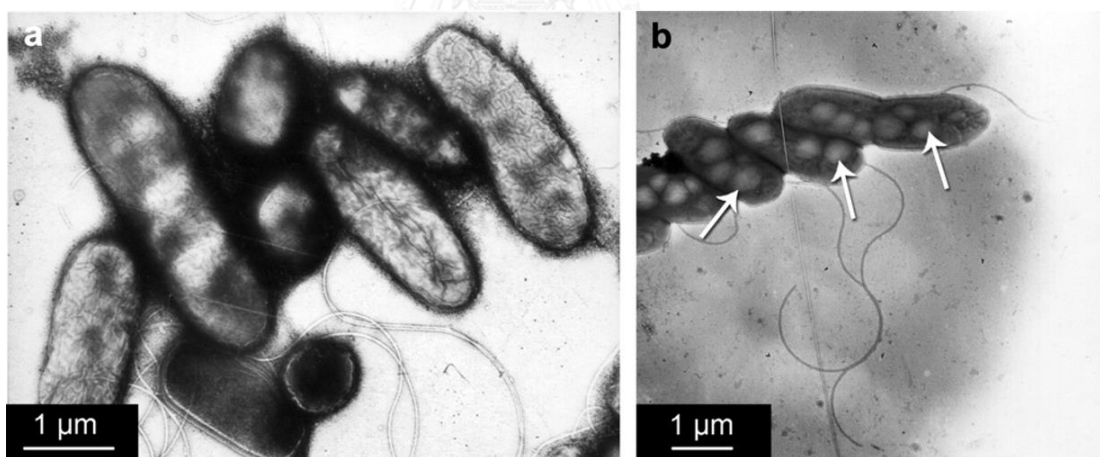
1.6.3 ข้อมูลที่ได้จากการยืนยันจุลินทรีย์ในระดับคลาสของไฟลัม *Proteobacteria* ที่มีความสามารถในการผลิตฟิเอชเอสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตฟิเอชเอในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมควบคู่ไปกับการบำบัดน้ำเสียได้ โดยถ้าพบคลาสของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตฟิเอชเอในตะกอนเริ่มต้นจะบ่งบอกความเป็นไปได้ในการนำตะกอนจุลินทรีย์ดังกล่าวมาเพิ่มมูลค่าด้วยการผลิตฟิเอชเอ

## บทที่ 2

### เอกสารและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตหรือพีเอชเอ (Polyhydroxyalkanoate; PHA)

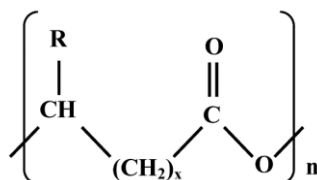
โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตหรือพีเอชเอ คือ พลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่งที่สังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยกลุ่มจุลินทรีย์ โดยโพลิเมอร์ชนิดนี้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน (polypropylene) ที่ทำมาจากปิโตรเลียมแต่แตกต่างกันตรงที่พีเอชเอสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชเอนี้มีความสามารถในการใช้สารอินทรีย์จำพวกกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Fatty Acid; VFA) เพื่อสังเคราะห์ให้เป็นพีเอชเอภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม (Anderson และ Dawes, (1990); Anderson และคณะ, (1990)) โดยพีเอชเอจะถูกเก็บสะสมไว้ในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในระดับโมเลกุลต่อไป ซึ่งพีเอชเอแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ๆ คือ พีเอชบี และพีเอชวี ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างการสะสมพีเอชบีในรูปของเม็ดแกรนูลในเซลล์ของจุลินทรีย์



ภาพที่ 1 การสะสมพีเอชบีในเซลล์ของจุลินทรีย์แบบ SEM ของ *Ralstonia eutropha* B5786 ในระยะเวลาต่าง ๆ a.) เซลล์จุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมงที่ยังไม่มีการสะสมพีเอชบี b.) เซลล์จุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 40 ชั่วโมงที่มีการสะสมพีเอชบี 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง  
ที่มา : Volova และคณะ, (2013)

## 2.2 โครงสร้างของพีเอชเอ (Structure of PHA)

มีการค้นพบกลุ่มจุลินทรีย์มากกว่า 300 ชนิดที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ในรูปของ 3-hydroxy fatty acids ซึ่งชนิดของพีเอชเอที่ผลิตได้นั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ในการเดินระบบ (Anderson และคณะ, (1990); Dias และคณะ, (2006)) โครงสร้างของพีเอชเอโดยทั่วไปแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างของพีเอชเอโดยทั่วไป (Structure of PHA)

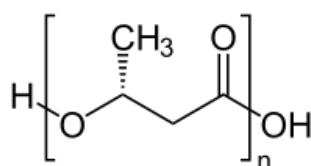
ที่มา : [http://www.mdpi.com/polymers/polymers-05-](http://www.mdpi.com/polymers/polymers-05-00001/article_deploy/html/images/polymers-05-00001-g004-1024.png)

00001/article\_deploy/html/images/polymers-05-00001-g004-1024.png

โดยทั่วไปพีเอชเอสามารถแบ่งตามความยาวของโพลิเมอร์ออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มโพลิเมอร์สายสั้น และกลุ่มโพลิเมอร์สายกลาง (Witholt และ Kessler, (1999); Do Young Kim และคณะ, (2007))

### 2.2.1 กลุ่มโพลิเมอร์สายสั้น (Short-Chain-Length; SCL-PHAs)

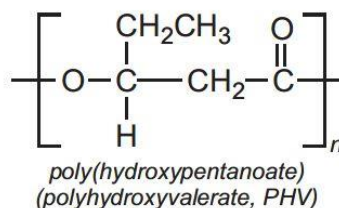
กลุ่มโพลิเมอร์สายสั้น คือ โพลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนจำนวน 4-5 อะตอมเป็นแกนหลัก เช่น โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือพีเอชบี (Polyhydroxybutyrate; PHB) โพลีไฮดรอกซีวาเลอเรตหรือพีเอชวี (Polyhydroxyvalerate; PHV) เป็นต้น ตัวอย่างโครงสร้างของพีเอชบีและพีเอชวี แสดงดังภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ



ภาพที่ 3 โครงสร้างของโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (Structure of PHB)

ที่มา : [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8d/Poly-\(R\)-3-](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8d/Poly-(R)-3-hydroxybutyrat.svg/200px-Poly-(R)-3-hydroxybutyrat.svg.png)  
hydroxybutyrat.svg/200px-Poly-(R)-3-hydroxybutyrat.svg.png





ภาพที่ 4 โครงสร้างของโพลีไฮดรอกซีวาเลอเรท (Structure of PHV)

ที่มา : [http://www.essentialchemicalindustry.org/images/stories/540\\_DegradablePlastics/DegradablePlastics\\_03.JPG](http://www.essentialchemicalindustry.org/images/stories/540_DegradablePlastics/DegradablePlastics_03.JPG)

## 2.2.2 กลุ่มโพลีเมอร์สายกลาง (Medium-Chain-Length; MCL-PHAs)

กลุ่มโพลีเมอร์สายกลาง คือ โพลีเมอร์กลุ่มหนึ่งที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนจำนวน 6-14 อะตอมเป็นแกนหลัก และอาจมีองค์ประกอบของวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มาจากจุลินทรีย์บางชนิด (Witholt และ Kessler, (1999); Do Young Kim และคณะ, (2007))

คุณสมบัติเด่นของกลุ่มโพลีเมอร์สายกลาง คือ มีความเป็นผลึกต่ำ (low crystallinity) และมีอุณหภูมิในการหลอมเหลวต่ำ (low melting temperature) จึงทำให้โพลีเมอร์ชนิดนี้มีความยืดหยุ่นสูงและสามารถเปลี่ยนรูปได้ง่ายกว่ากลุ่มโพลีเมอร์สายสั้น (Do Young Kim และคณะ, (2007))

นอกจากนี้พีเอชเอยังสามารถแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ได้ 2 ประเภทหลัก ๆ คือ โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตชนิดโฮโมโพลีเมอร์ (Homopolymer) และโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตชนิดเฮเทอโรโพลีเมอร์ (Heteropolymer)

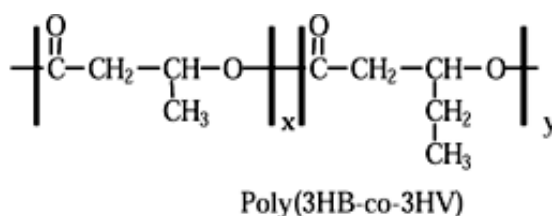
## 2.2.3 โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตชนิดโฮโมโพลีเมอร์ (Homopolymer)

คือ โพลีเมอร์ชนิดหนึ่งที่สังเคราะห์มาจากจุลินทรีย์และมีส่วนประกอบของโมเลกุลชนิดเดียวกันหรือที่เรียกว่า โมโนเมอร์ (monomer) เช่น พีเอชบี พีเอชวี เป็นต้น

ส่วนใหญ่พีเอชเอที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์นั้นจะเป็นชนิดพีเอชบี ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพของโพลีเมอร์ชนิดนี้ คือ ไม่มีความยืดหยุ่นจึงทำให้เปราะและแตกง่าย (Do Young Kim และคณะ, (2007)) ตัวอย่างโครงสร้างของพีเอชบีและพีเอชวี ดังแสดงในภาพที่ 3 และภาพที่ 4 ตามลำดับ

### 2.2.4 โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตชนิดเฮเทอโรโพลิเมอร์ (Heteropolymer)

คือ โพลีเมอร์ชนิดที่มีองค์ประกอบของโมเลกุลต่างชนิดกันมาเชื่อมกันเป็นโพลิเมอร์ หรือที่รู้จักในชื่อโคโพลิเมอร์ (copolymer) ซึ่งจะประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิด เช่น poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB:3HV)] เป็นต้น ตัวอย่างโครงสร้างของโคโพลิเมอร์แสดงดังภาพที่ 5



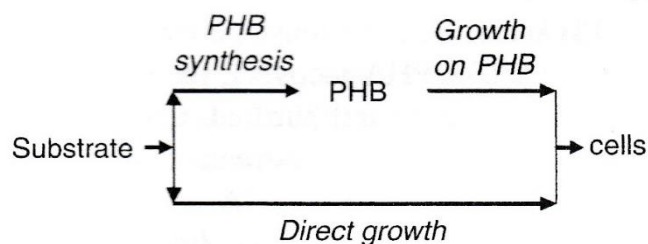
ภาพที่ 5 โครงสร้างของโคโพลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

ที่มา : <http://www.scielo.br/img/fbpe/jbchs/v10n2/a04sch01.gif>

โพลิเมอร์ชนิดโคโพลิเมอร์นี้จะมีขนาดยืดหยุ่นมากกว่าโพลิเมอร์ซึ่งเป็นโฮโมโพลิเมอร์และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโพลิโพรพิลีน (polypropylene) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์มาจากปิโตรเคมี ด้วยเหตุนี้จึงทำให้โคโพลิเมอร์เป็นที่นิยมและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Do Young Kim และคณะ, (2007))

### 2.3 วิธีการผลิตพีเอชเอ (PHA production)

การสังเคราะห์หรือผลิตพีเอชเอเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยในสภาวะปกติการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะเริ่มจากการเปลี่ยนสารอินทรีย์ภายนอกเซลล์ให้เป็นสารอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและสร้างส่วนประกอบภายในเซลล์ (Direct growth) (Bengtsson และคณะ, (2008a)) ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอที่แตกต่างกันออกไป (Kumar และคณะ, (2004)) ภาพที่ 6 แสดงการใช้อาหารและความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์



**ภาพที่ 6** แผนภาพการใช้สารอาหารและความสามารถในการผลิต และสะสมพีเอชบีของจุลินทรีย์  
ที่มา : Etienne และคณะ, (2012)

ในขั้นตอนของการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้อยู่ในรูปของพีเอชเอนั้นจำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ถือได้ว่ามีบทบาทสำคัญต่อการผลิตและสะสมพีเอชเออย่างมาก ทั้งนี้ลักษณะของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการศึกษาการผลิตและสะสมพีเอชเอ นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทหลัก ๆ คือ

### 2.3.1 การผลิตพีเอชเอโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ (Pure cultures of microorganisms)

เป็นการนำเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์มาใช้ในการผลิตและสะสมพีเอชเอ ตัวอย่างกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* และ recombinant *Escherichia coli* เป็นต้น (Shi และคณะ, (1997); Lee และ Choi, (1998); Grothe และคณะ, (1999); Grothe และ Chisti, (2000); และ Chen, (2010)) จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์เหล่านี้สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้อย่างแน่นอนประมาณ 18% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น (Qi และ Rehm, (2001)) และในงานวิจัยของ Taroncher-Oldenburg และคณะ, (2000) พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของ *Synechocystis* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์เช่นกันปริมาณ 12.3% โดยน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Marchessault, (1996) พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์สามารถผลิตพีเอชเอได้มากถึง 90% โดยน้ำหนักแห้งในอุตสาหกรรมการผลิตพีเอชเอ อย่างไรก็ตาม Choi และ Lee, (1997) และ Reis และคณะ, (2003) พบว่าการที่ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์จะทำให้ราคาของพีเอชเอที่ผลิตได้สูงกว่าราคาพลาสติกที่ผลิตมาจากปิโตรเคมี เนื่องมาจากการใช้สารตั้งต้นที่มีต้นทุนสูงและต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Sterile process) (€9/กิโลกรัมพีเอชเอ ต่อ €1/กิโลกรัมพลาสติก ; Biby, 2002 Degradable plastics: <http://www.icma.com/info/polymer>)

เพื่อให้ราคาของพีเอชเอถูกลง นักวิจัยหลายท่านจึงเริ่มศึกษาการผลิตและสะสมพีเอชเอโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมและริเริ่มใช้น้ำเสียเป็นสารตั้งต้นกันมากขึ้นเนื่องจากมีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่จำนวนมากและราคาถูก (Kleerebezem และ van Loosdrecht, (2007)) อีกทั้งถือเป็นการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้อีกทางหนึ่งด้วย

### 2.3.2 การผลิตพีเอชเอโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม (Mixed cultures of microorganisms)

เมื่อไม่นานมานี้มีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาวิธีการผลิตพีเอชเอโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม ทั้งนี้เพราะวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อ อีกทั้งยังสามารถใช้น้ำเสียเป็นสารตั้งต้นได้อีกด้วย (Kleerebezem และ van Loosdrecht, (2007)) จึงมีการคาดการณ์ว่าจะสามารถทำให้ราคาของพีเอชเอถูกลงจากเดิมได้ ถ้าใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูกและใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม (Meesters และคณะ, (1998))

การใช้น้ำเสียเป็นสารตั้งต้นนอกจากจะได้สารอาหารให้จุลินทรีย์ในราคาถูกเพื่อผลิตพีเอชเอแล้วยังสามารถผนวกรวมกับระบบบำบัดน้ำเสียได้อีกด้วย ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเริ่มเป็นที่สนใจในปัจจุบันและเริ่มมีการวิจัยค้นคว้ากันอย่างกว้างขวาง

วิธีการผลิตพีเอชเอโดยเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม สามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธีหลัก ๆ ดังนี้ (Salehizadeh และ Van Loosdrecht, (2004))

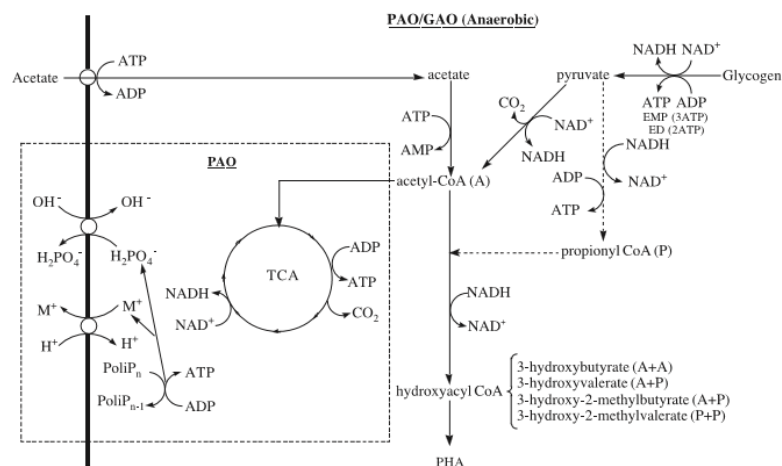
#### 2.3.2.1 ระบบไร้อากาศสลับกับมีอากาศ (Anaerobic-aerobic process)

ในการเติมอากาศจะเกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งก่อให้เกิดพลังงานสำหรับใช้ในการเจริญเติบโต แต่เมื่อเข้าสู่สภาวะแบบไร้อากาศจุลินทรีย์ในระบบจะทำการผลิตพีเอชเอขึ้นโดยกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมกลุ่มหลัก 2 กลุ่มในระบบ คือ กลุ่ม Polyphosphate-accumulating organisms (PAO) และ กลุ่ม Glycogen-accumulating organisms (GAO) ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มนี้นิยมใช้เพื่อบำบัดฟอสฟอรัสในระบบบำบัดน้ำเสีย

- กลุ่ม PAO เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางถึงความสามารถในการผลิตและสะสมโพลีเมอร์ได้ เช่น ไกลโคเจน พีเอชเอ และโพลีฟอสเฟต โดยจุลินทรีย์กลุ่มเหล่านี้จะเปลี่ยนสารตั้งต้นภายนอกเซลล์ให้อยู่ในรูปของโพลี-พี (poly-P) หรือพีเอชเอได้

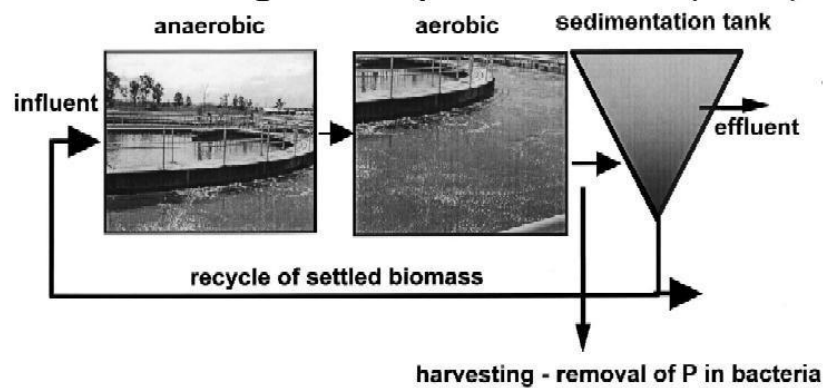
- กลุ่ม GAO เป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอได้เช่นกันโดยใช้สารอาหารจากภายนอกเซลล์และจากไกลโคเจนภายในเซลล์ ถือได้ว่าเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการแข่งขันในการใช้สารอาหารกับกลุ่ม PAO

นอกจากนี้จุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มยังสามารถใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตและสะสมเป็นพีเอชเอได้ เนื่องจากทั้ง PAO และ GAO มีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน (metabolic pathway) ที่คล้ายกัน โดยมีกระบวนการการผลิตพีเอชเอ ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 กระบวนการผลิตพีเอชเอในจุลินทรีย์กลุ่ม PAO/GAO  
ที่มา : Salehizadeh และ Van Loosdrecht, (2004)

### Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR)



ภาพที่ 8 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Enhanced Biological Phosphate Removal process; EBPR  
ที่มา : Blackall และคณะ, (2002)

เนื่องจากในระบบไร้อากาศสลักับมีอากาศเป็นกระบวนการที่สามารถกำจัดฟอสฟอรัสออกจากน้ำเสียในระบบบำบัดน้ำเสียได้ ดังภาพที่ 8 จึงเป็นที่รู้จักกันในชื่อ “Enhanced Biological Phosphate Removal process หรือ EBPR” แต่ปริมาณฟิเอชเอที่จุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสมได้ในระบบนี้ค่อนข้างต่ำ คือ มีค่าประมาณ 20% โดยน้ำหนักแห้ง (Satoh และคณะ, (1996)) ในงานวิจัยของเฉลิมราช วันทวิน และ อรรณพ ฤทธิปัญญาวงศ์, (2545) พบว่าปริมาณการผลิตและสะสมฟิเอชเอของจุลินทรีย์มีค่า 19.8% โดยน้ำหนัก เมื่อใช้อะซิเตทเป็นสารอาหารภายใต้สภาวะไร้อากาศสลักับมีอากาศ

### 2.3.2.2 ระบบมีอากาศเล็กน้อยสลักับมีอากาศ (Microaerophilic-aerobic process)

ต่อมาในปี 1998, Satoh และคณะ, (1998) ได้ทำการศึกษาเพื่อต้องการเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตและสะสมฟิเอชเอ โดยการจำกัดปริมาณการให้ออกซิเจนในระบบไร้อากาศเพื่อที่เซลล์จะได้ออกซิเจนโมเลกุลของสารตั้งต้นเพื่อมาใช้เป็นพลังงานภายในเซลล์ พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสมฟิเอชเอได้มากถึง 62% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อเทียบกับระบบไร้อากาศสลักับมีอากาศ อีกทั้งยังพบว่าในการจำกัดปริมาณออกซิเจนจะช่วยส่งเสริมให้ผลิตฟิเอชเอในระบบได้มากกว่าการเดินระบบแบบไร้อากาศด้วย (Ueno และคณะ, (1993)) จึงเป็นที่มาของระบบมีอากาศเล็กน้อยสลักับมีอากาศ (Microaerophilic-aerobic process)

การควบคุมเรื่องการให้ออกซิเจนในระบบจึงเป็นเรื่องสำคัญ เนื่องจากถ้าในระบบมีปริมาณออกซิเจนมากเกินไป จุลินทรีย์จะใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตและสร้างไกลโคเจน แต่ถ้าในระบบมีออกซิเจนในปริมาณที่พอเหมาะ ก็จะทำให้จุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะผลิตและสะสมฟิเอชเอแทนการสร้างเซลล์ (Ueno และคณะ, (1993))

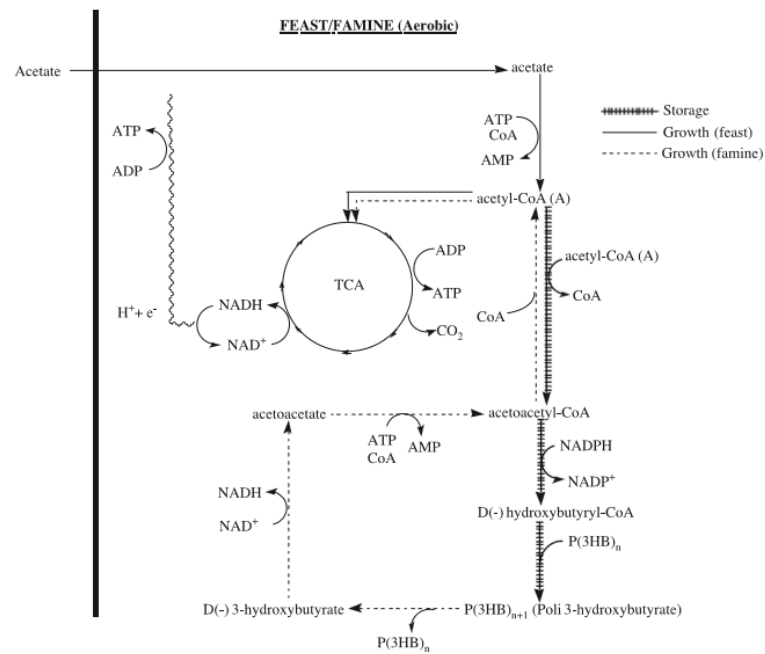
### 2.3.2.3 ระบบที่มีการให้อาหารเกินพอสลักับขาดแคลน (Aerobic dynamic feeding process; ADF หรือ Feast and Famine feeding process)

ระบบที่มีการให้อาหารเกินพอสลักับขาดแคลน (Aerobic dynamic feeding processing; ADF) หรือ ระบบ feast/famine feeding เป็นระบบที่ใช้อากาศอีกกระบวนการหนึ่ง ซึ่งเป็นที่นิยมมากในการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (culture selection) ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมฟิเอชเอได้ (Dionisi และคณะ, (2006); Lemos และคณะ, (2006); และ Serafim และคณะ, (2006)) โดยจุลินทรีย์จะเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ตามลำดับต่อไปนี้ (Salehizadeh และ Van Loosdrecht, (2004))

- **ระยะที่มีการให้อาหารเกินพอ (Feast)** ระยะนี้จุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารอาหารจากภายนอกเซลล์ให้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนภายในเซลล์ โดยสารอาหารที่นิยมใช้ศึกษาจะเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนต เป็นต้น และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ดังนั้นจุลินทรีย์จะทำการสังเคราะห์พีเอชเอขึ้นในระยะนี้

- หลังจากทีสารอาหารภายนอกเซลล์หมดลงจะเข้าสู่**ระยะขาดแคลนอาหาร (Famine)** ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะดึงพีเอชเอที่สะสมไว้ในเซลล์ออกมาใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อให้มีชีวิตรอด (Salehizadeh และ Van Loosdrecht, (2004)) นับเป็นการเดินระบบ 1 cycle และวนกลับมาที่ระยะ feast อีกครั้งเพื่อเข้าสู่ cycle ที่

2



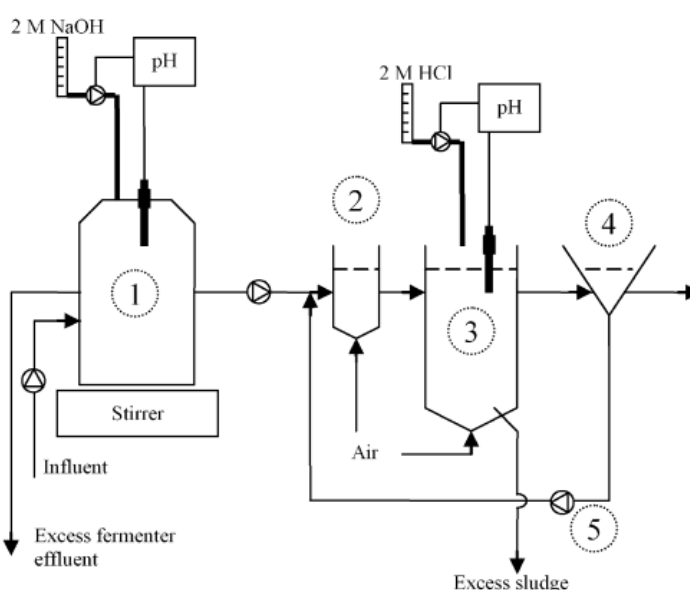
ภาพที่ 9 กระบวนการผลิตพีเอชเอในระบบ Feast/Famine

ที่มา : Salehizadeh และ Van Loosdrecht, (2004)

กระบวนการผลิตและสะสมพีเอชเอในระบบ feast/famine feeding แสดงดังภาพที่ 9 เปรียบเสมือนระบบที่คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอให้เจริญเติบโตมากขึ้นในระบบ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้จะขาดแคลนอาหารและไม่

สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะ famine ดังนั้นเมื่อทำการเดินระบบด้วยการให้อาหารแบบเกินพอสลับกับขาดแคลนอย่างต่อเนื่อง จุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตและสะสมพืเอชเอได้จะค่อย ๆ มีจำนวนลดลง ในขณะที่จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมพืเอชเอได้จะค่อย ๆ เพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้น

ในการศึกษาการผลิตและสะสมพืเอชเอด้วยการเดินระบบแบบ feast/famine feeding นี้ทำให้นักวิจัยจำนวนไม่น้อยเกิดความสนใจและหันมาศึกษากันอย่างจริงจัง โดยเริ่มศึกษาตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานกระดาษ ผลปรากฏว่าสามารถผลิตและสะสมพืเอชเอได้มากถึง 48% โดยน้ำหนัก (Bengtsson และคณะ, (2008)) เมื่อใช้การเดินระบบ Feast/Famine feeding แบบต่อเนื่อง ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ถังปฏิกรณ์เพื่อผลิตพืเอชเอด้วยระบบ Feast/Famine แบบต่อเนื่อง

1. ถังหมักแบบไร้อากาศ
2. ถังคัดเลือกพันธุ์
3. ถังปฏิกรณ์หลัก
4. ถังตกตะกอน
5. บั้มวนตะกอนกลับ

ที่มา : Bengtsson และคณะ, (2008)

นอกจากนี้ Johnson และคณะ, (2009) ยังพบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมมีความสามารถสะสมพืเอชเอได้มากถึง 89% โดยน้ำหนักแห้ง หลังจากเดินระบบเป็นเวลา 7.6 ชั่วโมง เมื่อทำการเติมอะซิเตทอย่างต่อเนื่อง (fed-batch) และจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมที่ใช้แลคเตทเป็นสารอาหารยังสามารถสะสมพืเอชเอได้มากถึง 90% โดยน้ำหนักแห้ง ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องเช่นกัน (Johnson และคณะ, (2009), Jiang และคณะ, (2011a)) รวมไปถึง Khumwanich และคณะ, (2014) ได้ทำการศึกษาตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียประเภท



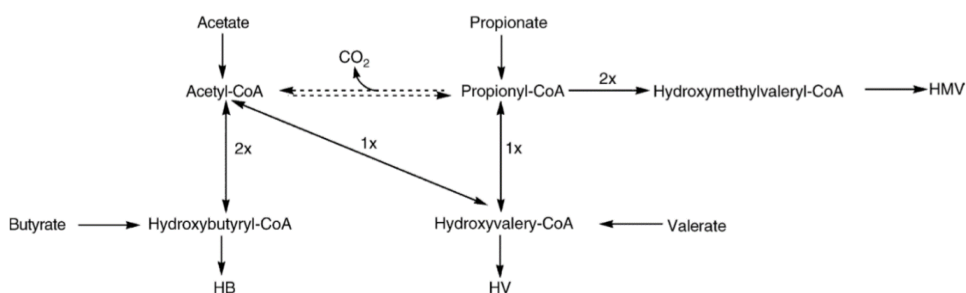
ต่าง ๆ 3 ประเภท พบว่าเมื่อใช้อะซิเตทเป็นแหล่งอาหารหลักในระบบส่งผลให้ตะกอนจุลินทรีย์ที่มาจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำผักและผลไม้สามารถผลิตพีเอชบีได้มากถึง 51.82% โดยน้ำหนัก เมื่อเดินระบบแบบ feast/famine feeding เป็นระยะเวลา 12 วัน

ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นนี้ ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาการผลิตพีเอชเอด้วยการเดินระบบภายใต้สภาวะแบบ feast/famine feeding เนื่องจากระบบนี้สามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตพีเอชเอได้ในปริมาณมากซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ อีกทั้งยังเป็นการคัดเลือกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ได้ดีอีกด้วย ถึงแม้ว่าระบบดังกล่าวจะเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตพีเอชเอได้ แต่จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ค่อนข้างจะอ่อนไหวง่าย ดังนั้นปัจจัยในการเดินระบบภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลับกับขาดแคลนจึงจำเป็นต้องควบคุมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตด้วย โดยปัจจัยในการเดินระบบที่ส่งผลต่อการผลิตพีเอชเอในงานวิจัยนี้แสดงในตารางที่ 1

## 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพีเอชเอภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน

### 2.4.1 สารอาหารหรือสารตั้งต้น (Substrate)

สารอาหารหรือสารตั้งต้นนับเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของจุลินทรีย์โดยจุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งมีปริมาณสารอินทรีย์เป็นจำนวนมากและเป็นแหล่งอาหารชั้นดีของจุลินทรีย์ Satoh และคณะ, (1998), Jiang และคณะ, (2011a) และ Jiang และคณะ, (2011c) พบว่าธรรมชาติของสารอาหารจะส่งผลโดยตรงต่อองค์ประกอบหลัก (final product) ของพีเอชเอได้ ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แผนภาพแสดงการผลิตโพลิเมอร์จากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ

เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนต บิวทิเรต และวาเลอเลต

ที่มา : Lemos และคณะ, (2006)

สารตั้งต้นที่ได้ศึกษามีอยู่ด้วยกันหลายชนิดแต่เมื่อแบ่งตามผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์ผลิตได้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

### 1. โมโนเมอร์ (monomer) หรือโฮโมโพลิเมอร์ (homopolymer)

มีหลายงานวิจัยที่นิยมใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้น เช่น ในงานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) และ Jiang และคณะ, (2011c) พบว่าเมื่อใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้นจุลินทรีย์ในระบบสามารถผลิตพีเอชบีได้ และเมื่อใช้แลคเตทเป็นสารตั้งต้นก็ได้ผลิตภัณฑ์เป็นพีเอชบีเช่นกัน (Jiang และคณะ, (2011a))

นอกจากนี้สารอาหารต่างชนิดกันยังส่งผลโดยตรงต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในระบบที่ต่างกันด้วย ในงานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) เมื่อเดินระบบโดยใช้น้ำเสียชนิดอะซิเตทเป็นสารอาหารพบ *Plasticumulans acidivorans* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักซึ่งมีความสามารถผลิตพีเอชบีได้ 88% โดยน้ำหนัก ส่วนถึงปฏิกรณ์ที่ใช้แลคเตทเป็นสารอาหารปรากฏว่าพบจุลินทรีย์กลุ่ม *novel gammaproteobacterium* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชบีได้มากถึง 90% โดยน้ำหนักแห้ง และพบ *Thauera selenatis* อยู่ในถังเดียวกัน นอกจากนี้เมื่อใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้นยังพบ *Thauera spp.* ในงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008), Dionisi และคณะ, (2005), และ Dionisi และคณะ, (2006) อีกด้วย อีกทั้งในงานวิจัยของ Woraittinun และ Suwannasilp, (2017) เมื่อเดินระบบโดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์ที่มาจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำผักและผลไม้พบ *Hyphomonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Nitratireductor*, และ *Agrobacterium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ 5 กลุ่มหลักที่พบในระบบเมื่อให้อะซิเตทเป็นสารอาหาร

### 2. โคโพลิเมอร์ (copolymer)

การใช้สารอาหารหลายชนิดผสมกันเป็นสารตั้งต้นโดยทั่วไปจะมีจุดประสงค์เพื่อผลิตโคโพลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบของโมโนเมอร์แตกต่างกันเพื่อการปรับปรุงคุณสมบัติทางเชิงกลของพีเอชเอที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ (Woraittinun และ Suwannasilp, (2017)) อีกทั้ง Lemos และคณะ, (2006) ทำการศึกษาชนิดของพีเอชเอกับสารตั้งต้นชนิดโพรพิโอเนต พบว่าเมื่อใช้โพรพิโอเนตจุลินทรีย์จะสร้างโพลิเมอร์ชนิดเอชบีและเอชวี P(HV/HB) ส่วนในงานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) พบว่าเมื่อใช้โพรพิโอเนตเป็นสารตั้งต้นสามารถผลิตเป็นพีเอชวีได้เช่นกัน นอกจากนี้เมื่อใช้โพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวยังสามารถผลิตโคโพลิเมอร์ได้ โดยจุลินทรีย์จะผลิตและสะสมพีเอชเอได้สูงสุดในรอบการเดินระบบที่ 27 โดยปริมาณพีเอชเอร้อยละ 12.65 โดยน้ำหนักแห้ง (% gPHA/gMLSS) คิดเป็นสัดส่วนของเอชบีโมโนเมอร์และเอชวีโมโนเมอร์ร้อยละ 57.62 และ 42.38 โดยโมล ตามลำดับ (Woraittinun และ Suwannasilp, (2017))

สารตั้งต้นที่งานวิจัยนี้เลือกใช้ คือ อะซิเตท ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประเภทระเหยง่ายและคาดว่าพีเอชเอที่จุลินทรีย์จะผลิตได้จะเป็นชนิดพีเอชบี

#### 2.4.2 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)

ในกระบวนการผลิตพีเอชเอนอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แล้ว ยังพบว่าแหล่งไนโตรเจนก็ส่งผลเช่นเดียวกัน โดยแหล่งไนโตรเจนอาจอยู่ในรูปของแอมโมเนียซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโตและอาจมีผลต่อการผลิตและสะสมพีเอชเอได้เช่นกัน (Johnson และคณะ, (2010a))

ในงานวิจัยของ Serafim และคณะ, (2004) ทำการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ความเข้มข้นของอะซิเตทในช่วง 15-180 Cmmol/l และความเข้มข้นของแอมโมเนียในช่วง 0-2.8 Nmmol/l ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำจุลินทรีย์จะสามารถผลิตและสะสมพีเอชบีได้สูงที่สุดถึง 67.58% โดยน้ำหนักเมื่อใช้ความเข้มข้นของอะซิเตทที่ 180 Cmmol/l

นอกจากนี้ Johnson และคณะ, (2010a) พบว่าเมื่อจำกัดแหล่งคาร์บอนของสารตั้งต้นโดยค่า C/N อยู่ในช่วง 6-13.2 Cmol/Nmol อัตราการใช้อะซิเตทของจุลินทรีย์จะมีค่าสูงขึ้น (high acetate uptake rates) และจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์จะมีปริมาณพีเอชเอพื้นฐานสูงมากขึ้นด้วย (higher baseline PHA contents) แต่ในถังปฏิกรณ์ที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนโดยอัตราส่วน C/N อยู่ในช่วง 15-24 Cmol/Nmol พบว่าจะส่งผลต่อความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอสูงสุดของจุลินทรีย์ซึ่งจะมีค่าสูงขึ้น (Higher maximal PHA storage capacities) กล่าวคือถ้าค่า C/N สูงขึ้นจะส่งผลให้ความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์ดีขึ้นด้วย

ต่อมา Johnson และคณะ, (2010b) ได้ทำการทดลองโดยแบ่งถังปฏิกรณ์ออกเป็น 3 ถังประกอบด้วย ถังที่ 1 เตินระบบแบบไม่เติมแอมโมเนีย (ammonium starvation) ถังที่ 2 เตินระบบแบบจำกัดแอมโมเนีย (ammonium limitation) และถังที่ 3 เตินระบบแบบให้แอมโมเนียมากเกินไป (ammonium excess) พบว่าในถังที่ 1 จุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสมพีเอชบีได้มากถึง 89% โดยน้ำหนัก เมื่อเดินระบบแบบ fed-batch เป็นเวลา 7.6 ชั่วโมง

กล่าวคือ เมื่อเดินระบบด้วยอัตราส่วน C/N ที่มีค่ามาก จุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะผลิตและสะสมพีเอชเอได้ดีขึ้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนจำพวกแอมโมเนียมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการสร้างเซลล์ของจุลินทรีย์และการกำหนดค่า C/N นี้ มักนิยมใช้ในการเดินระบบแบบ fed-batch มากกว่าแบบ batch และงานวิจัยนี้เดินระบบถึงปฏิกรณ์แบบกึ่งเท ดังนั้นจึงไม่ได้กำหนดค่า C/N

### 2.4.3 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง หรือค่าพีเอช (pH)

ค่าพีเอชนับได้ว่าเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญอีกค่าหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมระบบ เนื่องจากพีเอชจะส่งผลโดยตรงต่อการผลิตและสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์ (Liu และคณะ, (2011)) สารตั้งต้นที่ใช้ในการวิจัยส่วนใหญ่จะเป็นกรดอินทรีย์ประเภทระเหยง่ายที่เกิดจากกระบวนการหมักซึ่งจะมีฤทธิ์เป็นกรดและทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง การควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 8.0-9.0 จะช่วยกระตุ้นการสร้างพีเอชเอในระบบ (Chua และคณะ, (2003)) นอกจากนี้ Liu และคณะ, (2011) พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเริ่มต้นระบบซึ่งจุลินทรีย์จะสามารถทำงานได้ดีคือที่พีเอชเท่ากับ 7 ยิ่งไปกว่านั้นในงานวิจัยของ Dionisi และคณะ, (2005) พบว่าจุลินทรีย์จะสามารถผลิตและสะสมโพลิเมอร์ได้สูงถึง 70-80% เมื่อควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.5-8.5

แต่จากงานวิจัยของ Serafim และคณะ, (2004) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและการผลิตพีเอชปีภายใต้สภาวะการให้อาหารมากเกินไปสลับกับขาดแคลน พบว่าเมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอช จุลินทรีย์ในระบบจะสามารถผลิตและสะสมพีเอชปีได้สูงกว่าจุลินทรีย์ในถังที่มีการควบคุมพีเอชไว้ที่ 7.0 กล่าวคือ เมื่อไม่มีการควบคุมพีเอช จุลินทรีย์จะใช้สารตั้งต้นปริมาณแค่ 12% เพื่อเป็นพลังงานและสารตั้งต้นที่เหลือปริมาณ 88% ถูกใช้เพื่อการเจริญเติบโตและสะสมเป็นพีเอชปี ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ที่ควบคุมพีเอชไว้ที่ 7.0 พบว่าสารตั้งต้นที่ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานปริมาณมากถึง 44% ในขณะที่ปริมาณ 56% ของสารตั้งต้นที่เหลืออยู่ถูกเปลี่ยนและสะสมเป็นพีเอชปีเพื่อการเจริญเติบโตภายในเซลล์ จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะส่งผลโดยตรงต่อชนิดของจุลินทรีย์และปริมาณโพลิเมอร์ที่ผลิตได้

ในภาคอุตสาหกรรมนิยมใช้การปรับค่าพีเอชในการปรับปรุงคุณภาพของโคโพลิเมอร์ให้ดีขึ้นได้ อีกทั้งยังสามารถบำบัดกรดโพธิโอเนตในน้ำเสียได้อีกด้วย โดยอาศัยการปรับพีเอชจาก 5.5 ให้เป็น 9.5 เพื่อเปลี่ยนกรดโพธิโอเนตให้เป็นเอชวีแทน และปริมาณเอชวีที่ผลิตได้เพิ่มจาก 10% เป็น 30% โดยน้ำหนักแห้ง (Dionisi และคณะ, (2005))

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกควบคุมค่าพีเอชของระบบไว้ที่ 6.5-9.5

### 2.4.4 อุณหภูมิ (Temperature)

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยจะส่งผลโดยตรงต่อการผลิตและสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเร่งให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของจุลินทรีย์เกิดได้เร็วขึ้นกว่าเดิมและการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมินี้ยังเป็นอีกวิธีที่จะเพิ่มความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (Johnson และคณะ, (2010a))

Jiang และคณะ, (2011b) พบว่าอุณหภูมิตที่เปลี่ยนไปยังส่งผลต่อกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มเด่นที่พบด้วย โดยจากศึกษาถึงปฏิกรณ์แบบกึ่งเทจจำนวน 2 ถึง คือ ถึงปฏิกรณ์ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 และ 30 องศาเซลเซียส พบกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มเด่น คือ *Zoogloea* sp. และ *Plasticumulans acidivorans* ตามลำดับ และปริมาณพีเอชบีที่จุลินทรีย์ผลิตและสะสมได้ของทั้งสองถึงที่ปริมาณมากกว่า 75% โดยน้ำหนักแห้ง และเมื่อทำการทดลองสลับอุณหภูมิของถึงปฏิกรณ์ทั้งสองถึงในระยะเวลาอันสั้น พบว่าอุณหภูมิตส่งผลต่อ *Plasticumulans acidivorans* มากกว่า *Zoogloea* sp. และพีเอชบีที่ผลิตได้มีคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร

จะเห็นได้ว่าในแต่ละพื้นที่ที่มีอุณหภูมิตแตกต่างกันจะส่งผลกระทบต่อทั้งความหลากหลายทางชีวภาพและความสามารถในการผลิตโพลิเมอร์ของจุลินทรีย์ที่ต่างกันด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะเดินระบบโดยเลือกอุณหภูมิตที่ใช้เป็นอุณหภูมิตห้องซึ่งมีอุณหภูมิตประมาณ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส และคาดว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่พบอาจจะแตกต่างกับงานวิจัยในภูมิภาคเขตนหนาว

#### 2.4.5 ค่าอายุตะกอน (Sludge retention time: SRT)

ค่าอายุตะกอนในระบบ คือ ระยะเวลาที่เก็บและหมุนเวียนตะกอนในระบบ ค่าอายุตะกอนจึงส่งผลโดยตรงต่อการผลิตและสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์ด้วย มีงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษากการเปรียบเทียบระหว่างค่าอายุตะกอนกับความสามารถในการสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์ โดยพบว่าจุลินทรีย์แบบตะกอนเร่งที่อายุตะกอน 3 วัน จะมีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอได้ดีกว่าจุลินทรีย์แบบตะกอนเร่งที่อายุตะกอนเวลา 10 วัน เนื่องจากที่อายุตะกอนต่ำอาจจะมีเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ดีกว่าที่อายุตะกอนสูง อีกทั้งอายุตะกอนสูงจะมีปริมาณชีวมวลเฉื่อย (inert biomass) ซึ่งอาจส่งผลทำให้การสะสมพีเอชเอได้ในปริมาณที่ต่ำ (Chua และคณะ, (2003)) นอกจากนี้ Jiang และคณะ, (2011a) ทำการศึกษาค่าอายุตะกอนที่ 1 วันต่อการผลิตพีเอชบี พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มเด่นสามารถผลิตพีเอชบีได้มากถึง 88% โดยน้ำหนักแห้งด้วยการเดินระบบแบบให้อาหารมากเกินไปสลับกับขาดแคลนและใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้น

ในทางกลับกันงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) พบว่าจุลินทรีย์ที่อายุตะกอน 1 วันจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าจุลินทรีย์ที่อายุตะกอน 10 แต่ปริมาณพีเอชบีที่ผลิตและสะสมได้นั้นมีค่าน้อยกว่าจุลินทรีย์อายุตะกอน 10 วัน ถึง 4 เท่า นอกจากนี้งานวิจัยของเศารยา กิจพ่อค้า, (2557) ทำการศึกษาผลของอายุตะกอนต่อการผลิตและสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมที่เดินระบบแบบให้อาหารมากเกินไปสลับกับขาดแคลนและใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้นในถึงปฏิกรณ์แบบกึ่งเทจโดยศึกษาอายุตะกอนที่ 3 5 10 และ 20 วัน ตามลำดับ พบว่าที่อายุตะกอน 10 วัน จุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ดีที่สุด คือ 62.2% gPHA/gMLSS และในการเดินระบบด้วยค่าอายุ

ตะกอนที่แตกต่างกันนี้จะส่งผลให้เกิดการคัดเลือกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบซึ่งความหลากหลายของจุลินทรีย์จะแตกต่างกันออกไปแต่ความสามารถในการสะสมฟิเอชเอมีปริมาณใกล้เคียงกัน

เนื่องจากงานวิจัยนี้เดินระบบด้วยตะกอนจุลินทรีย์ที่มาจากระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำผักและผลไม้แหล่งเดียวกันกับงานวิจัยของเศารยา กิจพ้อคำ, (2557) ที่พบความสามารถในการผลิตและสะสมฟิเอชเอของจุลินทรีย์มากถึง 62.2% gPHA/gMLSS เมื่อเดินระบบที่อายุตะกอน 10 วัน ดังนั้นจากงานวิจัยนี้จึงเลือกเดินระบบด้วยค่าอายุตะกอนที่ 10 วัน

#### 2.4.6 ค่าระยะเวลาที่กักเก็บน้ำ (Hydraulic retention time: HRT)

คือ ระยะเวลาเฉลี่ยที่น้ำเสียอยู่ในระบบซึ่งเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญมากสำหรับกระบวนการบำบัดทางชีวภาพเนื่องจากเป็นระยะเวลาที่จุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์ในระบบ ดังนั้นระยะเวลาที่กักเก็บน้ำเสียจะต้องมากพอและเหมาะสมกับการบำบัดสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นแต่ละชนิด ในงานวิจัยของ Woraittinun และ Suwannasilp, (2017) พบว่าเมื่อเดินระบบด้วยค่าระยะเวลาที่กักเก็บน้ำที่ 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ตะกอนจุลินทรีย์ในระบบใช้สารอินทรีย์ได้ดีกว่าที่ระยะเวลาที่กักเก็บน้ำที่ 24 ชั่วโมง จึงทำให้ค่าซีโอดีลดลงและเข้าสู่ระยะขาดแคลนอาหาร

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการให้ระยะเวลาที่จุลินทรีย์ขาดแคลนอาหารนาน ๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาที่กักเก็บน้ำที่ 48 ชั่วโมง หรือ 2 วัน

#### 2.4.7 อัตราส่วนระหว่างอาหารต่อจุลินทรีย์ (F/M ratio)

งานวิจัยของ Liu และคณะ, (2008) พบว่าเมื่ออัตราส่วนของอาหารต่อจุลินทรีย์มีค่าสูงขึ้น จุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะผลิตและสะสมฟิเอชเอได้มากขึ้น เนื่องจากจะส่งผลให้อัตราการใช้สารอาหารในระยที่มีการให้อาหารเกินพอสูงขึ้น จึงเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์จะสามารถผลิตและสะสมฟิเอชเอได้มากขึ้นด้วย ซึ่งงานวิจัยของเศารยา กิจพ้อคำ, (2557) พบความสามารถในการผลิตฟิเอชเอของจุลินทรีย์มากถึง 62.2% gPHA/gMLSS เมื่อเดินระบบด้วยอัตราส่วน F/M เท่ากับ 1 เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Woraittinun และ Suwannasilp, (2017) ที่เดินระบบด้วยอัตราส่วน F/M เท่ากับ 1 และปริมาณฟิเอชเอที่จุลินทรีย์ผลิตได้ 44.78% โดยน้ำหนักแห้ง

การเดินระบบของงานวิจัยนี้เดินระบบด้วยตะกอนจุลินทรีย์ที่มาจากแหล่งเดียวกันกับงานวิจัยของเศารยา กิจพ้อคำ, (2557) และงานวิจัยของ Woraittinun และ Suwannasilp, (2017) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเดินระบบด้วยค่าอัตราส่วน F/M เท่ากับ 1 เพื่อต้องการให้จุลินทรีย์ในระบบใช้สารอาหารได้หมดและแน่ใจว่าจุลินทรีย์จะเข้าสู่ระยะขาดแคลนอาหาร

#### 2.4.8 อัตราส่วนของระยะที่มีการให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน (Feast/Famine ratio หรือ F/F ratio)

ในการเดินระบบแบบให้อาหารเกินพอ (Feast phase) สลับกับขาดแคลน (Famine phase) จะนิยมเดินระบบโดยกำหนดให้เวลาในระยะ feast อยู่ในช่วงที่สั้น ๆ และกำหนดให้ช่วงเวลาในระยะ famine อยู่ในช่วงยาว ๆ สาเหตุที่เดินระบบแบบนี้เพราะต้องการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมพืเอชเอได้ในระบบ กลุ่มที่สามารถผลิตและสะสมพืเอชเอได้จะค่อย ๆ เพิ่มจำนวนขึ้นในแต่ละรอบ ในขณะที่กลุ่มอื่น ๆ จะค่อย ๆ ลดจำนวนลง อัตราส่วนระหว่าง feast/famine (F/F) ยังมีค่าน้อยยังมีแนวโน้มที่จะเพิ่มความสามารถในการผลิตและสะสมพืเอชเอที่สูงขึ้น ซึ่งในงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสมพืเอชเอได้ 27.9% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อเดินระบบด้วยอัตราส่วน F/F ในช่วง 0.14-0.20 งานวิจัยของ Albuquerque และคณะ, (2010) พบว่าที่อัตราส่วน F/F ในช่วง 0.21-1.1 จะส่งผลให้จุลินทรีย์ในระบบสามารถผลิตพืเอชเอได้สูงสุด 74.6% เมื่อใช้สารอินทรีย์ระเหยง่ายจากกระบวนการหมักกากน้ำตาลแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) พบว่าที่อัตราส่วน F/F เท่ากับ 0.06 จุลินทรีย์สามารถผลิตพืเอชเอได้ 52% โดยน้ำหนักแห้งในระบบแบบกึ่งเทและสะสมพืเอชเอได้สูงสุด 88% โดยน้ำหนักแห้งในระบบถึงปฏิกรณ์แบบ fed-batch และในงานวิจัยของ Moita และ Lemos, (2012) พบความสามารถในการผลิตพืเอชเอ 9.2% g/g โดยน้ำหนักแห้งเมื่อเดินระบบด้วย F/F ในช่วง 0.09-0.20

ในการเดินระบบของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกเดินระบบกำหนดค่าอัตราส่วนระหว่าง feast/famine (F/F) อยู่ในช่วง 0.06-0.20 ซึ่งเป็นช่วงคาดว่าจุลินทรีย์จะสามารถผลิตพืเอชเอได้สูงสุด

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพืเอชเอภายใต้เดินระบบแบบให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน

ปัจจัยที่ใช้ในการเดินระบบ	งานวิจัยนี้เลือกใช้	หน่วย
1. สารอาหาร	อะซิเตท	3,000 mgCOD/L
2. ค่า pH	6.5-9.5	
3. อุณหภูมิ	27-30	องศาเซลเซียส
4. ค่า SRT	10	วัน
5. ค่า HRT	2	วัน
6. ค่า F/M ratio	1	
7. ค่า F/F ratio	0.06-0.20	

## 2.5 กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่พบในการผลิตพีเอชเอ

การเดินระบบด้วยปัจจัยที่แตกต่างกันนอกจากจะส่งผลโดยตรงต่อการผลิตพีเอชเอของจุลินทรีย์แล้ว ปัจจัยดังกล่าวยังส่งผลต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่พบซึ่งเป็นหัวใจของระบบอีกด้วย ในงานวิจัยของ Woraittinun และ Suwannasilp, (2017) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพีเอชเอของตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตน้ำผักและผลไม้ภายใต้สภาวะการให้อาหารเกินพอสลักับขนาดแคลนพบว่าเมื่อเดินระบบด้วยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนพบแบคทีเรียซึ่งอยู่ในคลาส *Alphaproteobacteria* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักในระบบที่มีความสามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ 44.78% gPHA/gMLSS นอกจากนี้งานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) เมื่อเติมอะซิเตทเป็นสารอาหารยังสามารถพบ *Plasticumulans acidivorans* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในระบบซึ่งอยู่ในคลาส *Gammaproteobacteria* อีกด้วยและแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวสามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้มากถึง 90% โดยน้ำหนักแห้ง ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้นสามารถพบ *Thauera spp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria* อีกด้วย (Lemos และคณะ, (2008), Dionisi และคณะ, (2005), และ Dionisi และคณะ, (2006)) แต่เมื่อเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมในระบบด้วยแลคเตทพบ *Thauera selenatis* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักซึ่งอยู่ในคลาส *Betaproteobacteria* และพบแบคทีเรียกลุ่ม novel *Gammaproteobacteria* ในถึงเดียวกันได้เช่นกัน (Jiang และ คณะ, (2011a)) ยิ่งไปกว่านั้นพบแบคทีเรียทั้งคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* อาศัยอยู่ร่วมกันในระบบที่ใช้โพพิโอเนตเป็นสารอาหาร (Woraittinun และ Suwannasilp, (2017)) จะเห็นได้ว่าสารอาหารเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญและมีผลต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่พบในระบบ

จากงานวิจัยข้างต้นที่กล่าวถึงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับสารอาหารเป็นปัจจัยหลัก ดังนั้นเมื่องานวิจัยนี้เลือกใช้อะซิเตทเป็นสารอาหารหลักก็มีแนวโน้มที่จะพบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่อยู่ Domain Bacteria Phylum *Proteobacteria* จำนวน 3 class ด้วยกัน คือ

1. Class *Alphaproteobacteria*
2. Class *Betaproteobacteria* และ
3. Class *Gammaproteobacteria*



## 2.6 การนำพีเอชเอไปใช้ประโยชน์

ปัญหาขยะจำพวกพลาสติกเป็นปัญหาสำคัญที่ควรได้รับการจัดการแก้ไข เนื่องจากขยะพลาสติกไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ อีกทั้งปริมาณการใช้พลาสติกยังมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดขยะพลาสติกจำนวนมาก พลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) จึงเป็นวัสดุอีกทางเลือกหนึ่งที่นักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสำคัญและศึกษาในปัจจุบัน โดยพลาสติกชีวภาพที่ผลิตได้สามารถนำไปต่อยอดได้หลายทาง สามารถแบ่งออกได้เป็นด้านต่าง ๆ ดังนี้

### ● ด้านอุตสาหกรรม

พลาสติกชีวภาพนับว่าเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่อุตสาหกรรมสามารถนำไปใช้ได้ เพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยการนำพีเอชเอไปผลิตเม็ดพลาสติกและขึ้นรูปเป็นถุงพลาสติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมประเภทการบรรจุ หีบห่อ เช่น ถุงพลาสติก ขวดพลาสติก ภาชนะใส่อาหาร เนื่องจากขนาดรูพรุนของถุงพลาสติกชีวภาพประเภทโพลีแลคติกแอซิดหรือพีแอลเอมีรูพรุนขนาดเล็กกว่าพลาสติกที่มาจากปิโตรเคมี ดังนั้นการใช้พลาสติกชีวภาพบรรจุอาหารจะช่วยป้องกันเชื้อโรคและอากาศที่จะเข้าไปสัมผัสกับอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าพลาสติกชนิดอื่น (Salehizadeh และ Van Loosdrecht, (2004))

### ● ด้านการแพทย์

ข้อได้เปรียบของพลาสติกชีวภาพคือสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ทางธรรมชาติและไม่เกิดพิษต่อสิ่งแวดล้อม จากบทความของศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, (2547) พบว่าทางการแพทย์นำข้อดีของพีเอชเอมาประยุกต์ใช้กับวัสดุประเภทที่ต้องฝังเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย เช่น วัสดุค้ำจุนและช่วยประสานกระดูกในทางการแพทย์ออร์โธพีดิกส์ หรือวัสดุในงานผ่าตัด เช่น ไหมเย็บแผลแบบไหมละลายและผ้าตาข่ายสำหรับรองแผล อีกทั้งยังสามารถผลิตแคปซูลบรรจุยาเพื่อใช้ควบคุมการปล่อยตัวยาให้มีประสิทธิภาพสูงสุด (ธนาวดี ลีจากภักย์, (2549))

### ● ด้านการเกษตร

ในปัจจุบันนักเทคโนโลยีการเกษตรยังนำพีเอชเอไปใช้ประโยชน์ได้ด้วย เช่น การใช้พีเอชเอเป็นวัสดุเคลือบเมล็ดพันธุ์พืช (seed encapsulation) เพื่อรักษาคุณภาพเมล็ดพันธุ์ หรือใช้เป็นวัสดุเคลือบเม็ดปุ๋ยเคมี หรือสารกำจัดศัตรูพืช ที่ช่วยให้สารเคมีเหล่านั้นเกิดการกระจายตัวอย่างช้าๆ ในระยะเวลาที่ต้องการซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการให้ปุ๋ยแก่พืช (ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, (2547)) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์นำถุงพลาสติกชีวภาพไปใช้ในการเพาะกล้าไม้ด้วย เพื่อที่เวลานำกล้าไม้ไป

ปลุกกลดินสามารถปลุกลงไปทั้งถุงพลาสติกได้เลยโดยไม่ต้องถอดถุงออกซึ่งช่วยลดการเกิดขยะได้อีกทางหนึ่ง

## 2.7 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ในการเดินระบบ

ในงานวิจัยนี้นักวิจัยหลายท่าน เช่น Serafim และคณะ, (2006); Lemos และคณะ, (2008); Johnson และคณะ, (2010a); Jiang และคณะ, (2011a) และ Khumwanich และคณะ, (2014) เป็นต้น นิยมเลือกใช้ระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท (Sequencing Batch Reactor; SBR) เพื่อนำมาคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมพืเอชเอภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลับกับขาดแคลนเนื่องจากสามารถเดินระบบได้อย่างครบถ้วนสมบูรณ์ในถังเดียว อีกทั้งมีโอกาสน้อยที่จุลินทรีย์จะหลุดออกจากระบบได้

ถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทสามารถนำมาใช้เป็นระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพได้ โดยทำหน้าที่เป็นทั้งถังเติมอากาศเพื่อให้จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ เป็นถังตกตะกอนซึ่งทำหน้าที่แยกตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำใส และเป็นถังพักเพื่อตั้งตะกอนจุลินทรีย์ออกในถังเดียวกัน การทำงานของถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทจะเป็นวัฏจักรช่วงเวลาจึงสามารถปรับเปลี่ยนการทำงานให้เข้ากับลักษณะของน้ำเสียได้ หลักการทำงานของถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทมีลำดับการทำงาน 5 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 12 (ขวัญเนตร สมบัติสมภพ, (2551))

### ขั้นตอนที่ 1 การเติมน้ำเสีย (Fill)

เป็นกระบวนการรับน้ำเสียเข้ามาในถังปฏิกรณ์ซึ่งมีจุลินทรีย์อยู่ในถัง ถือเป็นารเริ่มต้นการเดินระบบโดยปริมาตรน้ำเสียที่เติมเริ่มต้นอาจจะมีปริมาตรประมาณร้อยละ 25 ของปริมาตรถังซึ่งเป็นปริมาตรน้ำเสียที่เหลืออยู่ในช่วงสุดท้ายของช่วงพัก (Idle) ในระหว่างการเติมน้ำเสียอาจมีการเติมอากาศหรือไม่ก็ได้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ว่าต้องการบำบัดสารประเภทใด

### ขั้นตอนที่ 2 การบำบัด (React)

เป็นช่วงการเกิดปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์ โดยในช่วงนี้จะมีการเติมอากาศให้แก่ระบบเพื่อบำบัดสารอินทรีย์ในน้ำเสีย และระยะเวลาที่ใช้สั้นขึ้นกับอัตราการย่อยสลายของสารอินทรีย์

### ขั้นตอนที่ 3 การตกตะกอน (Settle)

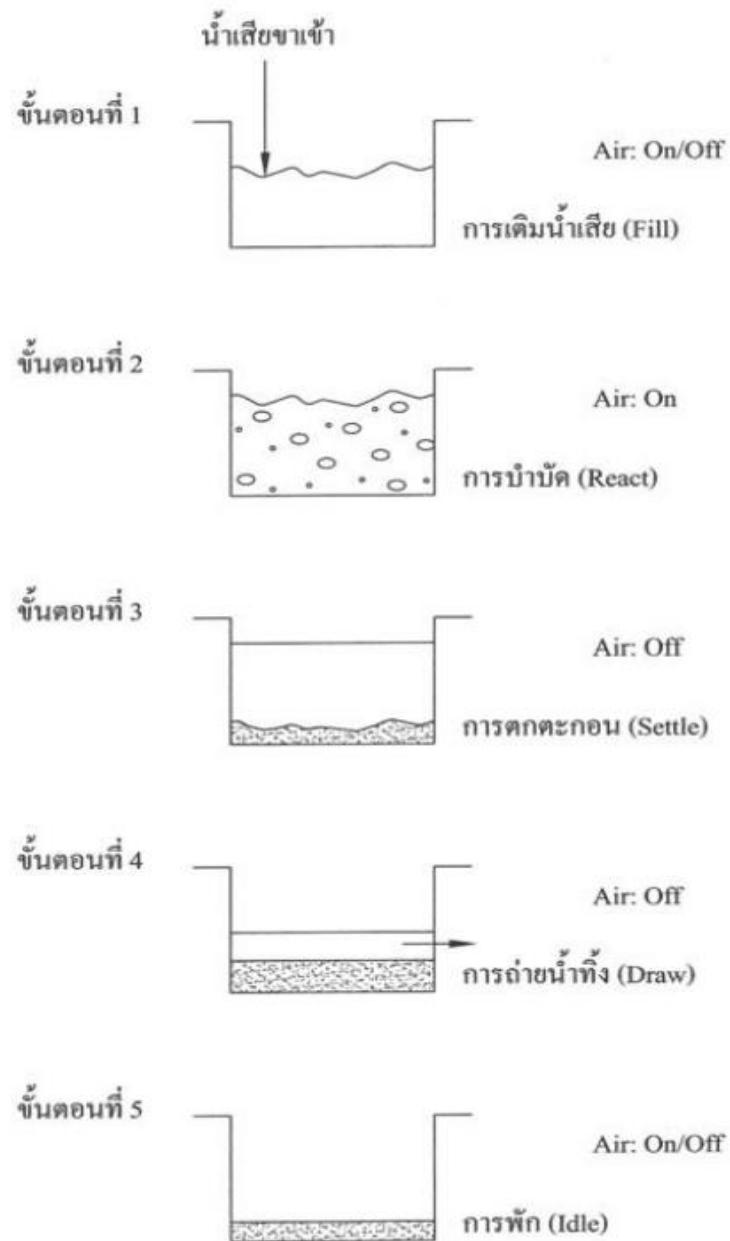
ในกระบวนการนี้จะหยุดการเติมอากาศเพื่อให้ตะกอนจุลินทรีย์ตกตะกอนและแยกชั้น ตะกอนจุลินทรีย์ออกจากน้ำเสียที่บำบัดแล้ว การตกตะกอนในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทนี้จะมีประสิทธิภาพมากกว่าในระบบตะกอนเร่งแบบต่อเนื่อง เนื่องจากน้ำเสียจะอยู่ในสภาพนิ่งอย่างสมบูรณ์และไม่ถูกรบกวนจากการไหลของน้ำหรือสภาวะอื่นๆ จึงมีโอกาสน้อยที่จุลินทรีย์ในถังจะหลุดออกไปจากถังปฏิกรณ์

### ขั้นตอนที่ 4 การถ่ายน้ำทิ้ง (Draw)

เป็นขั้นตอนที่ต่อจากการตกตะกอนซึ่งยังคงหยุดการเติมอากาศ การถ่ายน้ำทิ้งถือว่าเป็นช่วงเวลาที่มีการระบายน้ำใสที่ผ่านการบำบัดแล้วออกจากถัง เพื่อให้ส่วนของน้ำใสไหลออกจากระบบ โดยอาจใช้ฟันทูลอยดูดน้ำหรือฝายปรับระดับก็ได้

### ขั้นตอนที่ 5 การพัก (Idle)

ช่วงเวลานี้เป็นช่วงเวลาที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่ระบายน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วออกจากถังปฏิกรณ์และก่อนที่จะเติมน้ำเสียเข้าถังใหม่อีกครั้ง จุดประสงค์ของการพัก คือ เพื่อเว้นช่วงเวลาสำหรับถังปฏิกรณ์แรกให้มีช่วงการเติมน้ำเสียที่สมบูรณ์ ก่อนที่น้ำเสียจะเข้าสู่ถังอื่นต่อไป บางครั้งจึงถูกละเว้นเนื่องจากช่วงพักไม่ใช่ช่วงเวลาที่สำคัญ



ภาพที่ 12 ลักษณะการทำงานของระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท  
ที่มา : ขวัญเนตร สมบัติสมภพ, (2551)

## 2.8 เทคนิคทางชีวโมเลกุล

การวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น การตรวจสอบรหัสทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถช่วยวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมและระบบต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่มีปัจจัยรบกวนจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ เทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นกลุ่มเป้าหมาย

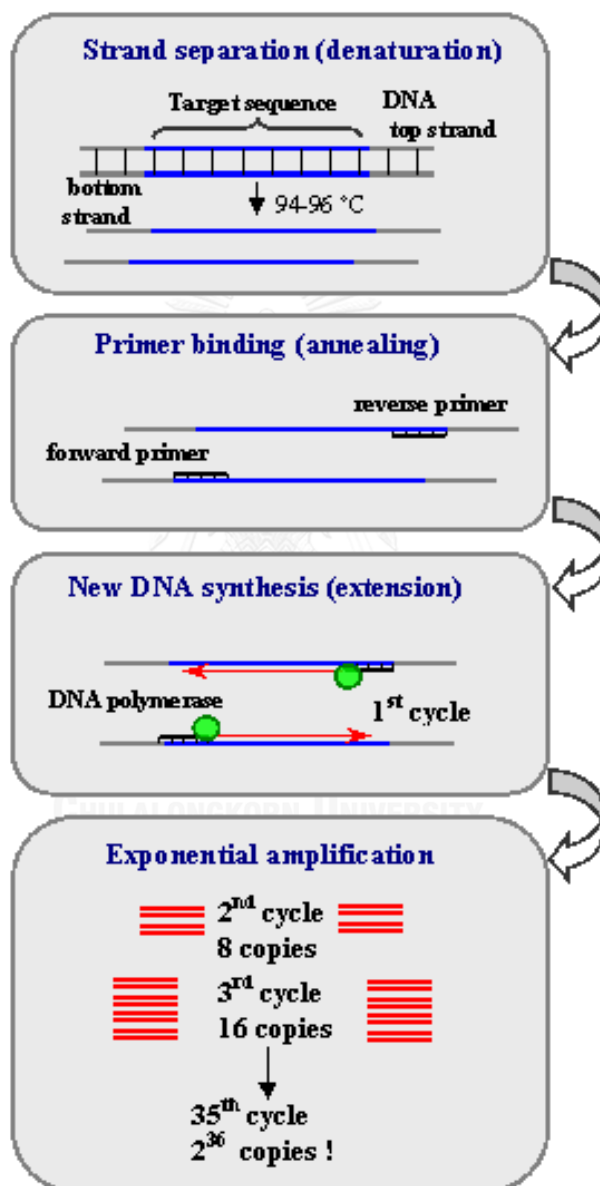
### 2.8.1 เทคนิค Polymerase Chain Reaction หรือ PCR

เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาให้มากขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ เทคนิคนี้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องและเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันในด้านเทคนิคทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เนื่องจากมีขั้นตอนการทำงานที่ไม่ซับซ้อนและใช้ระยะเวลาสั้น อีกทั้งไม่ต้องทำให้ดีเอ็นเอสายนั้นบริสุทธิ์ก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้ แต่ในการเพิ่มจำนวนจะต้องอาศัยเอนไซม์และไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอนั้น ๆ เข้ามาช่วย (วีระพงศ์ ลุติตานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว, (2551))

หลักการในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR จะเป็นปฏิกิริยาต่อเนื่อง เกิดขึ้นเป็นลูกโซ่สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการ 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้ ดังแสดงในภาพที่ 13

1. **ขั้นตอน Denaturation** เป็นขั้นตอนแรกของการทำ PCR โดยจะเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นถึง 90-95 องศาเซลเซียส เพื่อแยกดีเอ็นเอแม่แบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวและพร้อมสำหรับขั้นตอนต่อไป
2. **ขั้นตอน Annealing** เป็นขั้นตอนของการลดอุณหภูมิลงมาอยู่ที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่ที่เข้ากับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้
3. **ขั้นตอน Primer extension** เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ตามดีเอ็นเอต้นแบบโดยสังเคราะห์จากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' จะต้องอาศัยไพรเมอร์และ DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามเทคนิค PCR ที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ขั้นตอนนับว่าเป็น 1 รอบ และจะเกิดอีกหลายรอบจนปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นพอที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อได้ โดยจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนแบบเรขาคณิต ( $2^n$ ) ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยา 10 รอบจะได้จำนวนดีเอ็นเอมากถึง ( $2^{10}$ ) 1024 ดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 หลักการการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

ที่มา : [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/assets/probe/images/pcr\\_principle1.gif](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/assets/probe/images/pcr_principle1.gif)

## 2.8.2 เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing (MiSeq, Illumina)

ปัจจุบันเครื่องมือและเทคโนโลยีได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องและ Illumina MiSeq system เป็นอีกหนึ่งเครื่องมือรูปแบบใหม่ (Next Generation Sequencing) ที่ใช้เพื่อค้นหากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นกลุ่มเป้าหมายได้และสามารถเพิ่มจำนวน sequencing ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้นโดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสก่อน ในการศึกษาถึงยีนและลำดับพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมาก ๆ อย่างเช่น จุลินทรีย์ มักจะนิยมศึกษาโดยใช้ 16S rRNA gene เนื่องจากเป็นยีนที่กำหนดองค์ประกอบพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตในระดับโรโบโซม และเป็นยีนที่สามารถใช้ในการจำแนกประเภทของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

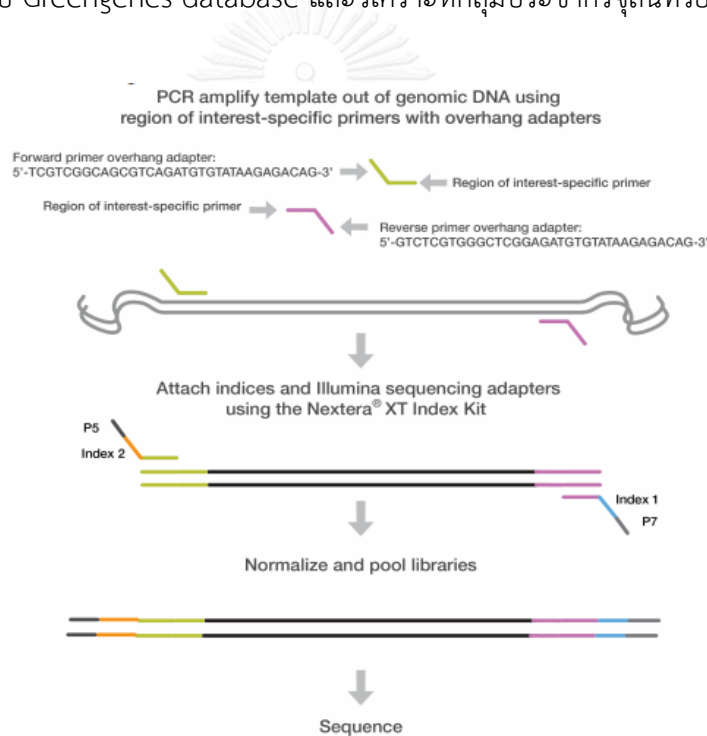
การวิเคราะห์หากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing ด้วย Illumina MiSeq system มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์หากลุ่มประชากรเป้าหมายดังต่อไปนี้ (16S preparation guide: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) และ Woraittinun และ Suwannasilp, (2017)) ดังแสดงในภาพที่ 14

1. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ
2. เพิ่มจำนวน 16S rRNA gene บริเวณ v4 region ด้วย primer F515 และ R806 โดยใช้เทคนิค PCR
3. ทำ PCR clean up ด้วย Ampure XP Beads เพื่อล้างไพรเมอร์ที่เหลืออยู่ซึ่งไม่ได้จับบนดีเอ็นเอออก
4. ติด Index จำเพาะสำหรับแต่ละตัวอย่างและติด Illumina sequencing adapters ด้วยการ ทำ PCR จำนวนรอบต่ำ (8 รอบ)
5. ทำ PCR clean up อีกครั้ง เพื่อล้างไพรเมอร์ออก
6. ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันก่อนที่จะรวมตัวอย่างเข้าด้วยกัน
7. นำตัวอย่างเข้าเครื่องเพื่อ sequencing หาลำดับเบส ซึ่งหลักการ sequencing ภายในของ Illumina MiSeq system คือ การนำตัวอย่างที่ติด Index จำเพาะมาสร้างกลุ่มดีเอ็นเอโดยการเพิ่มจำนวนแบบสะพานโค้ง อีกทั้งอาศัย adapter ที่มีลำดับเบสตรงกันกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดย adapter ในที่นี้จะทำหน้าที่คล้ายกับไพรเมอร์ในกระบวนการ PCR ซึ่งเป็นตัวช่วยในการเข้าจับเพื่อสังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอสายใหม่โดยจะต้องอาศัยกรดนิวคลีอิกไทด์ หลังจากเกิดสายดีเอ็นเอแบบสะพานโค้งแล้ว

สายดีเอ็นเอดังกล่าวจะถูกแยกออกเป็นสายเดี่ยวเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ต่อไปและดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ในแต่ละกลุ่มจะมีประมาณ 1,000 ชุด ดังภาพที่ 15

หลังจากนั้นเมื่อได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาแล้ว ทำการเติมนิวคลีโอไทด์และ DNA polymerase เพื่อทำการสังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งการที่นิวคลีโอไทด์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในแต่ละกลุ่มจะทำให้สีที่แสดงออกมามีสีที่แตกต่างกันออกไป หลังจากนั้นเติม reversible terminator เพื่อหยุดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ ผลการปลดปล่อยสารเรืองแสงที่ได้จากนิวคลีโอไทด์แต่ละกลุ่มจะถูกบันทึกไว้ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ เมื่อบันทึกแล้วเครื่องจะทำการล้างนิวคลีโอไทด์และ terminator ออกจากเซลล์ก่อนที่จะเติมนิวคลีโอไทด์และ DNA polymerase ชุดใหม่เพื่อสังเคราะห์สายใหม่ต่อไป

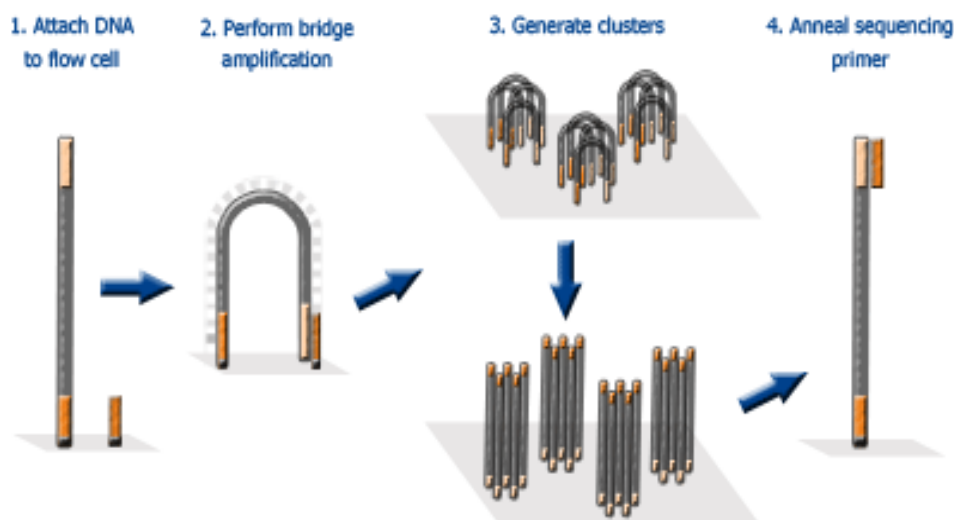
8. นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของจุลินทรีย์ (taxonomic classification) โดยเปรียบเทียบกับ Greengenes database และวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์



ภาพที่ 14 การเตรียมตัวอย่างก่อนเข้า Illumina MiSeq system

ที่มา : [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)





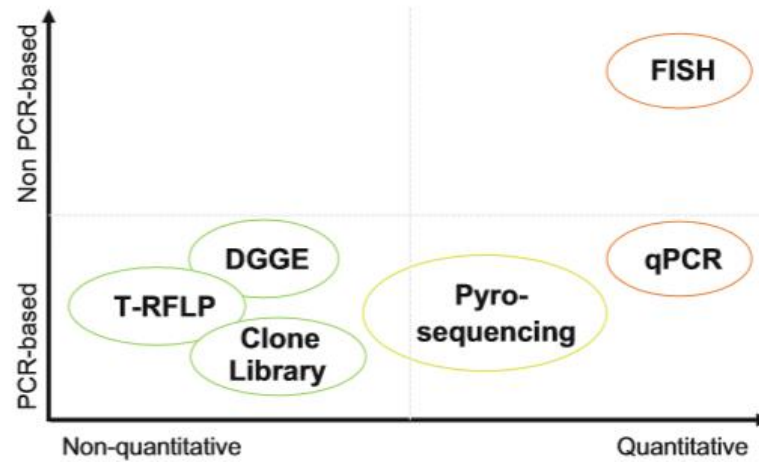
ภาพที่ 15 การเพิ่มจำนวนแบบ bridge ภายใน Illumina MiSeq system

1. Adapter เข้าจับที่ดีเอ็นเอต้นแบบ
2. เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบสะพานโค้ง
3. ดีเอ็นเอแบบสะพานโค้งเพิ่มจำนวนแล้วแยกออกเป็นสายเดี่ยวและ
4. พร้อมเป็นแม่แบบเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป

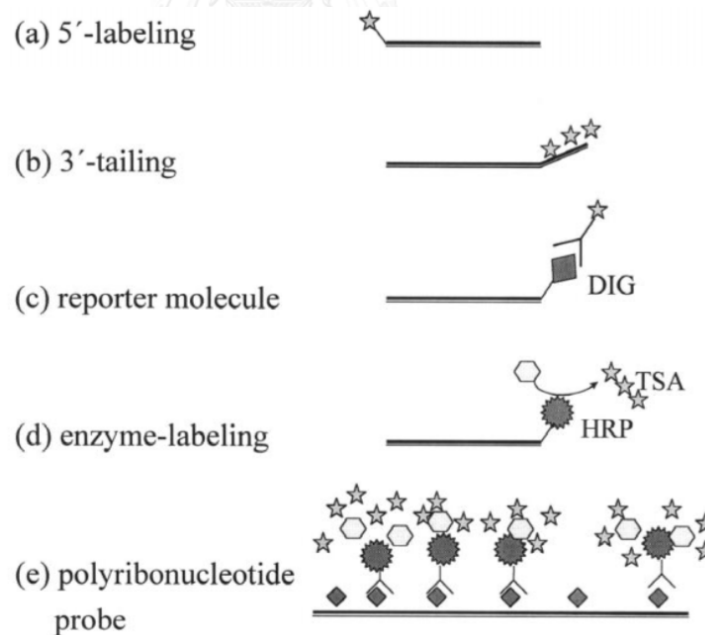
ที่มา : <https://www.eurofinngenomics.eu/media/112021/faq9.1.gif>

### 2.8.3 เทคนิค Fluorescence in situ Hybridization หรือ FISH

เทคนิค FISH เริ่มใช้ตั้งแต่ปี 1989 และกลายเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างกว้าง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ตรวจวัดกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ได้อย่างง่ายเพียงแค่อาศัย probe ชนิด fluorescence หรือสารเรืองแสงเข้าไปจับกับ rRNA ของกลุ่มเป้าหมาย ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สามารถทำได้โดยไม่ต้องแยกหรือคัดเลือกรหัสพันธุกรรมออกจากกันและไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอด้วย FISH สามารถตรวจวัดกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีชีวิตได้ จุลินทรีย์ที่ตรวจพบโดย FISH จะสามารถระบุตำแหน่งและบอกถึงปริมาณของกลุ่มจุลินทรีย์ได้โดยไม่ต้องอาศัยการทำ PCR ดังแสดงในภาพที่ 16 ซึ่งเปรียบเทียบเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบระดับความเกี่ยวข้องกับ PCR และระดับการให้ข้อมูลในเชิงปริมาณ



ภาพที่ 16 เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบระดับความเกี่ยวข้องกับ PCR และระดับการให้ข้อมูลในเชิงปริมาณ  
ที่มา : Queirós และคณะ, (2015)



ภาพที่ 17 การติดสี fluorescence  
รูป a-b การติดสีโดยตรง (Direct fluorescent labeling)  
และรูป c-e การติดสีโดยอ้อม (Indirect fluorescent labeling)  
ที่มา : Moter และ Göbel, (2000)

ในปัจจุบันเริ่มมีการปรับใช้เทคนิค FISH เพื่อใช้ศึกษาวิวัฒนาการ ระบบนิเวศ และสิ่งแวดล้อมของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์กันมากขึ้น โดยนำส่วนของ 16S rRNA gene ของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เป้าหมายที่ต้องการศึกษามาติดฉลากด้วยสารสี fluorescence ซึ่งเป็นชนิด oligonucleotide probe ที่มีความยาวประมาณ 15 ถึง 30 base pair (bp) ด้วยความยาวของ probe สายสั้นนี้จะทำให้ probe สามารถเข้าถึงกลุ่มเป้าหมายได้โดยง่าย อีกทั้งในการเลือกชนิดของ probe ยังต้องคำนึงถึงความจำเพาะของสาร การทำปฏิกิริยา และการซึมผ่านของสารเข้าสู่เซลล์ด้วย

ในการติดฉลากสีสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งแบ่งออกได้เป็น การติดสีโดยตรง (Direct fluorescent labeling) และการติดสีโดยอ้อม (Indirect fluorescent labeling) ซึ่งวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือ การติดสีโดยตรง เนื่องจากเป็นวิธีที่เร็วที่สุด ง่ายที่สุด และใช้งบน้อยที่สุด (Moter และ Göbel, (2000)) ดังแสดงในภาพที่ 17

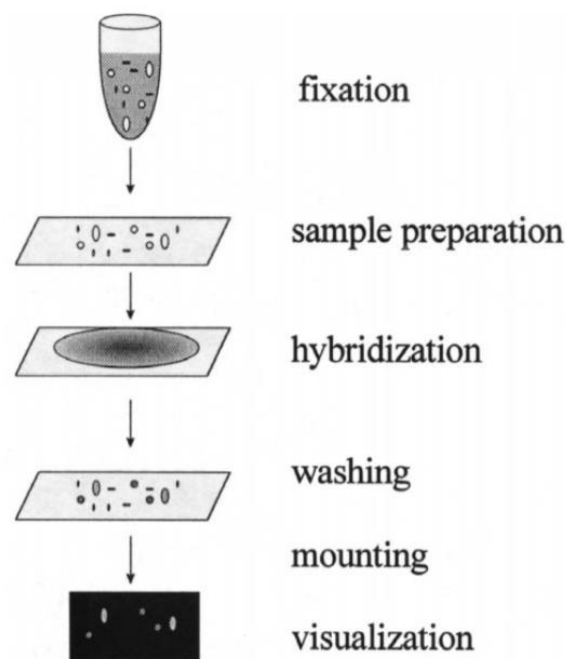
นอกจากนี้สี fluorescence ที่ใช้ในการติดฉลากก็มีส่วนสำคัญ เรียกว่า fluorochromes ซึ่งในการติดฉลากด้วย fluorochromes ที่มีความยาวคลื่นต่างกันจะสามารถตรวจวัดกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ต้องการได้มากกว่า 2 ชนิด โดยต้องอาศัย multibandpass filter และควรเลือกใช้สีที่เป็นแบบ sharp emission peak เพื่อป้องกันการซ้อนทับกันของสีเมื่อใช้ fluorochromes มากกว่า 1 ชนิด (Moter และ Göbel, (2000)) สีย้อมที่นิยมใช้ในเทคนิค FISH เพื่อศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** Fluorochromes ที่นิยมใช้ในการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH

Fluorochrome	Wavelength <sup>a</sup>		Color
	Excitation (nm)	Emission (nm)	
AMCA	351	450	Blue
Fluorescein–isothiocyanate (FITC)	492	528	Green
5-(–6-)carboxyfluorescein–N-hydroxysuccinimide-ester (FluoX™)	488	520	Green
Tetramethyl–rhodamine–isothiocyanate (TRITC)	557	576	Red
Texas Red <sup>†</sup>	578	600	Red
Cyanine Dyes			
Cy3™	550	570	Orange/red
Cy5™	651	674	Infrared

<sup>a</sup> Wavelengths may vary slightly depending on the respective manufacturer. Emission spectra might change in different solvents or sample conditions (Cullander, 1999).

ที่มา : Cullander, (1999)



ภาพที่ 18 ขั้นตอนในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH

ที่มา : Moter และ Göbel, (2000)

ขั้นตอนในการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค FISH สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้ (Moter และ Göbel, (2000)) แสดงในภาพที่ 18

### 1. Sample collection and fixation of the specimen

ในขั้นตอนของการ fixation นับได้ว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากของเทคนิค FISH เนื่องจากจะส่งผลโดยตรงต่อค่าที่จะอ่านได้ในขั้นตอนสุดท้าย ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการเก็บตัวอย่างและเตรียมความพร้อมของเซลล์จุลินทรีย์ก่อนที่จะทำการ hybridization จุดประสงค์เพื่อต้องการหยุดการเจริญเติบโตหรือการย่อยสลายของจุลินทรีย์โดยนิยมใช้สารเคมีจำพวก แอลดีไฮด์ (aldehydes) เอทานอล (ethanol) หรือเมทานอล (methanol) เข้าทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อให้ fluorescence probe สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ อีกทั้งยังเป็นการป้องกันการสลายตัวของ 16S rRNA อีกด้วย

ในการ fixation นี้ส่วนมากจะใช้ 3-4% formaldehyde หรือ paraformaldehyde ที่แช่เย็นสำหรับจุลินทรีย์แกรมลบและจะใช้ 50% ethanol หรือ ethanol/formalin (9:1 v/v) สำหรับจุลินทรีย์แกรมบวก ระยะเวลาที่ใช้ในการ fixation จะขึ้นอยู่กับแต่ละชนิดของกลุ่มเป้าหมาย ถ้า

ตัวอย่างตะกอนเป็นสไลด์หรือแผ่นฟิล์มที่เป็น floc จะนิยม fix ไว้ที่ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วยสาร 1x Phosphate-buffered Saline (1xPBS) และใช้ 1:1 PBS/EtOH เพื่อรักษาสภาพของจุลินทรีย์จากนั้นจึงเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ต่อไป

ในขั้นตอนการ fixation ด้วย 4% formaldehyde และการเก็บตัวอย่างด้วยเอทานอลจะสามารถหยุดการเจริญเติบโตครอบคลุมทั้งจุลินทรีย์แกรมลบและแกรมบวก

## **2. Specimen preparation and pretreatment**

ในการเตรียมตัวอย่างบนแผ่นสไลด์แนะนำให้ทำความสะอาดแผ่นสไลด์ก่อนแล้วเคลือบแผ่นสไลด์ด้วย coating agent เช่น gelatin poly-L-lysine silanating agents homogenization หรือ cryo-sections เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้จุลินทรีย์เกาะบนแผ่นสไลด์ได้ดียิ่งขึ้น ในกรณีที่จุลินทรีย์เป็นเซลล์แบบแขวนลอยให้ทำการตรึงจุลินทรีย์ในเซลล์ที่แขวนลอยนั้นด้วย 4% paraformaldehyde ก่อน ล้างด้วย 1xPBS แล้วหยดตัวอย่างนั้นลงบนแผ่นสไลด์ที่มีสาร coating agent รอให้แห้ง หลังจากนั้นจุ่มแผ่นสไลด์ดังกล่าวในเอทานอลที่ความเข้มข้น 50% 80% และ 100% ที่ความเข้มข้นละ 3 นาที ตามลำดับ เพื่อเอาน้ำออกจากเซลล์ ในบางกรณีที่เป็นจุลินทรีย์แกรมบวกอาจจำเป็นต้องเติม lysosome lysostaphin หรือ enzyme mixture เพื่อเปิดชั้น peptidoglycan

## **3. Hybridization with the respective probes**

การ hybridization นับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดสำหรับเทคนิค FISH ซึ่งจะต้องทำภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิเหมาะสมเพื่อให้ probe สามารถเข้าจับกับ rRNA ได้ โดยจะใส่ preheated hybridization buffer เพื่อทำให้ fluorescence probe เข้าจับกับ rRNA ได้อย่างสมบูรณ์ ปัจจัยที่ส่งผลต่อการ hybridization คือ เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ formamide และอุณหภูมิที่ใช้ hybridization โดย formamide จะทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลงจึงส่งผลให้อุณหภูมิของการหลอมเหลวต่ำลง

ในการ hybridization จะต้องทำในที่มืดที่อุณหภูมิระหว่าง 37-50 °C โดยระยะเวลาที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 30 นาทีถึงหลายชั่วโมง ในกรณีที่ทำการ hybridization มากกว่า 1 probe ให้เริ่ม hybridize ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ formamide ที่สูงกว่าก่อน

## **4. Washing**

เมื่อเสร็จขั้นตอนของการ hybridization แล้วให้นำแผ่นสไลด์ออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัด probe ที่ไม่ได้จับกับ rRNA ออก แล้วล้างด้วย washing buffer ที่มีความเข้มข้นของ

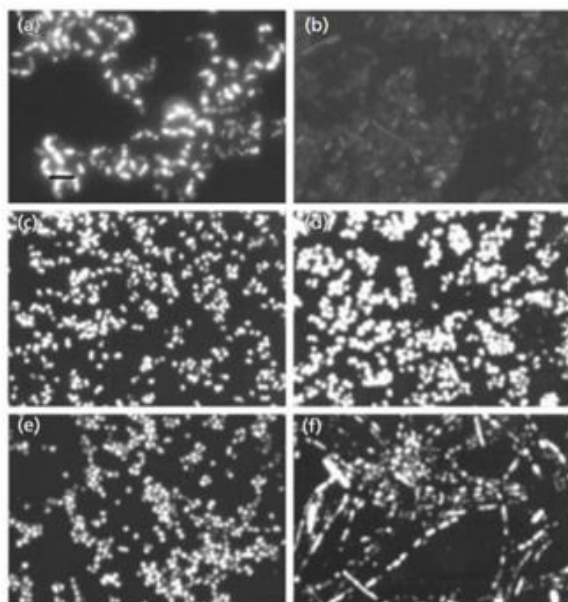
formamide เท่ากับตอน hybridization หลังจากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำสไลด์ดังกล่าวออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นอีกครั้ง ผึ่งให้แห้งก่อนเข้าสู่ขั้นตอนต่อไป

## 5. Mounting, Visualization and documentation

คือ ขั้นตอนของการหยุดสารละลาย slow-fade หรือ anti-fade ลงไปเพื่อป้องกันการสลายตัวของสี หลังจากนั้นปิดด้วย cover slide ทำการล๊อคแผ่นสไลด์กับ cover slide ด้วยน้ำยาทาเล็บ รอให้แห้ง เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

### 2.8.4 เทคนิคการย้อมสีฟิเอชเอด้วย Nile blue A

Nile blue A เป็นสีย้อมแบบ fluorescence ประเภทออกซาซีน (oxazine) ที่สามารถละลายน้ำได้และมีคุณสมบัติพิเศษต่างจากสีย้อมทั่วไป คือ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง fluorescence ที่ความยาวคลื่นประมาณ 360-460 นาโนเมตร จะสามารถเรืองแสงสีส้มได้ (visible light) ในงานวิจัยส่วนใหญ่จะนิยมใช้ Nile blue A เพื่องานทางชีววิทยาและงานทางเนื้อเยื่อทางกายวิภาคศาสตร์ เนื่องจากสีดังกล่าวสามารถย้อมได้ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว (Sheu และคณะ, (2000) เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ต่อจากเทคนิค FISH (post-stain) เพื่อย้อมสี granule ของฟิเอชเอในเซลล์ของจุลินทรีย์ ภาพที่ 19 แสดงการย้อมสีจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ด้วย Nile blue A



ภาพที่ 19 การย้อมสีจุลินทรีย์  
ด้วย Nile blue A

(a.) ภาพ positive control  
(b.) ภาพ negative control  
และ (c.) (d.) (e.) (f.) ภาพตัวอย่างจุลินทรีย์  
ที่มา : Sheu และคณะ, (2000)

### 2.8.5 เทคนิคการย้อมจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI

DAPI หรือที่รู้จักในชื่อ 4',6-diamidino-2-phenylindole เป็นสีแบบ fluorescence ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการย้อมสีแบคทีเรียและอาร์เคีย โดย DAPI จะเข้าไปจับบริเวณดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded) ของสิ่งมีชีวิต จึงทำให้ DAPI สามารถย้อมได้ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้วโดยจะผ่านเข้าไปทางผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Kapuscinski, (1995)) เมื่อนำเซลล์ที่ย้อมด้วยสี DAPI ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence ที่ความยาวคลื่น 358-461 นาโนเมตร จะให้แสงที่ครามหรือน้ำเงิน

ดังนั้นงานนี้จึงใช้เทคนิคการย้อมสี DAPI เพื่อวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบร่วมกับเทคนิค FISH

## 2.9 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาขยะที่เกิดขึ้นในปัจจุบันนับว่าเป็นปัญหาที่ต้องหาหนทางแก้ไขอย่างเร่งด่วนโดยเฉพาะขยะประเภทพลาสติก อีกทั้งปริมาณการใช้ถุงพลาสติกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงก่อให้เกิดขยะพลาสติกจำนวนมากและส่งผลโดยตรงต่อการจัดการด้านสุขภาพสิ่งแวดล้อม เช่น การฝังกลบ เป็นต้น เนื่องจากขยะพลาสติกที่พบส่วนใหญ่ผลิตมาจากปิโตรเคมีภัณฑ์ซึ่งใช้น้ำมันและก๊าซธรรมชาติเป็นวัตถุดิบหลัก การใช้ทรัพยากรดังกล่าวเป็นการใช้ทรัพยากรที่ใช้แล้วหมดไปและขยะที่เกิดขึ้นไม่สามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติ เพื่อแก้ปัญหาและลดผลกระทบของสิ่งแวดล้อมในระยะยาว พลาสติกชีวภาพ (bioplastics) จึงเป็นวัสดุทางเลือกที่ใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีและได้รับความสนใจมากในปัจจุบันและนักวิจัยหลายท่านหันมาศึกษาพลาสติกทางเลือกกันมากขึ้น

โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตหรือพีเอชเอ คือ พลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ในระยะเวลายันสั้น พีเอชเอจะถูกกระตุ้นและเก็บสะสมไว้ในเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน ในช่วงแรกของการศึกษา นักวิจัยหลายท่านเริ่มศึกษาจากกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ ยกตัวอย่างเช่น *Ralstonia eutropha* และ *Alcaligenes latus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียใน Class *Betaproteobacteria* นอกจากนี้ยังศึกษา *Azotobacter vinelandii* และ *Pseudomonas oleovorans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน Class *Grammaproteobacteria* อีกด้วยและ recombinant *Escherichia coli* เป็นต้น (Shi และคณะ, (1997); Lee และ Choi, (1998); Grothe และ คณะ, (1999); Grothe และ Chisti, (2000); และ Chen, (2010)) ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้รับรองได้ว่าสามารถผลิตพีเอชเอได้อย่างแน่นอนและมีประสิทธิภาพ (Lee, (1996)) แต่ข้อดีของการผลิตพีเอชเอด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ คือ

พลาสติกที่ได้มีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับพลาสติกที่มาจากปิโตรเคมี เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์จะต้องอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง อีกทั้งแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นมีราคาสูงด้วยเช่นกัน ด้วยเหตุนี้ Kleerebezem และ van Loosdrecht, (2007) จึงริเริ่มที่จะศึกษาการผลิตพีเอชเอโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมและใช้น้ำเสียเป็นสารอาหารของจุลินทรีย์แทนเพื่อลดต้นทุนของการผลิตพีเอชเอลง ข้อดีของการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม คือ ไม่ต้องอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อจึงช่วยให้ประหยัดต้นทุนได้อย่างมาก อีกทั้งถ้าเดินระบบแบบให้อาหารเกินพอสลักับขาดแคลนจะช่วยกระตุ้นให้จุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมมีความสามารถในการผลิตพีเอชเอได้ในปริมาณใกล้เคียงกับกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ พีเอชเอที่ถูกระดมในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นสามารถสะสมได้ในปริมาณมากและอาจสูงที่สุดถึง 92% โดยน้ำหนักแห้งได้ ด้วยการเดินระบบแบบให้อาหารเกินพอสลักับขาดแคลน (Johnson และคณะ, (2009), Albuquerque และคณะ, (2010), Jiang และคณะ, (2011a))

ในการเดินระบบนิยมเลือกเดินระบบด้วยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทเพื่อใช้คัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอ เนื่องจากถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทนี้สามารถเดินระบบได้อย่างครบถ้วนสมบูรณ์ในถังเดียว อีกทั้งจุลินทรีย์มีโอกาที่จะหลุดออกจากระบบได้น้อย ซึ่งนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่สำคัญต่าง ๆ ในการเดินระบบแบบนี้เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์ในระบบสามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ในปริมาณที่สูงที่สุด โดยเริ่มจากการใช้สารตั้งต้นหรือสารอาหารที่ต่างชนิดกันจะส่งผลต่อชนิดของพีเอชเอที่ผลิตได้แตกต่างกัน (Sato และคณะ, (1998), Jiang และคณะ, (2011a) และ Jiang และคณะ, (2011c)) โดยหากใช้อะซิเตทและแลคเตทเป็นสารอาหารจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นพีเอชบี (Lemos และคณะ, (2008), Jiang และคณะ, (2011a), Dionisi และคณะ, (2005), และ Dionisi และคณะ, (2006)) ส่วนถ้าใช้โพรพิโอเนทเป็นสารตั้งต้นจะพบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นโคโพลิเมอร์ของเอชบีและเอชวี P(HV/HB) (Lemos และคณะ, (2006), Woraittinun และ Suwannasilp, (2017)) หรือพีเอชวี (Jiang และคณะ, (2011a))

นอกจากแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แล้ว ยังพบว่าแหล่งไนโตรเจนก็ส่งผลเช่นเดียวกัน โดยแหล่งไนโตรเจนอาจอยู่ในรูปของแอมโมเนียซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโตและส่งผลต่อการผลิตพีเอชเอ (Johnson และคณะ, (2010a)) โดยพบว่าในถังปฏิกรณ์แบบไม่เติมแอมโมเนีย จุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสมพีเอชบีได้มากถึง 89% โดยน้ำหนักแห้ง โดยเดินระบบแบบ fed-batch เป็นเวลา 7.6 ชั่วโมง (Johnson และคณะ, (2010b)) และควบคุมค่า pH ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 9.5 (Dionisi และคณะ, (2005)) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยอาจส่งผลโดยตรงต่อการสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ได้ ซึ่งในการเดินระบบด้วยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทพบว่าที่อายุตะกอน 10 วัน จุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ดีที่สุด คือ 62.2% gPHA/gMLSS (เศารยา กิจพ้อคำ, (2557)) อีกทั้งงานวิจัยของ Liu



และคณะ, (2008) พบว่าจุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะผลิตพีเอชเอได้มากขึ้น ถ้าอัตราส่วนระหว่างอาหารกับจุลินทรีย์ (F/M ratio) มีค่าสูง เนื่องจากเพิ่มอัตราการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ให้สูงขึ้นในระยะที่มีการให้อาหารเกินพอ จึงเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์จะสามารถผลิตและสะสมพีเอชเอไว้ในเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างระยะให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน (F/F ratio) ยิ่งมีค่าน้อยจะยิ่งส่งผลให้จุลินทรีย์เพิ่มความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอได้สูงขึ้นอีกทางหนึ่งด้วย (Albuquerque และคณะ, (2010)) โดยงานวิจัยนี้กำหนดอัตราส่วน F/F อยู่ในช่วง 0.06-0.20 (สรุปในตารางที่ 1)

จุลินทรีย์นับได้ว่าเป็นหัวใจหลักของการผลิตและสะสมพีเอชเอในระบบซึ่งปัจจัยที่สำคัญในการเดินระบบนั้นส่งผลโดยตรงต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่พบ หากเปลี่ยนชนิดของสารตั้งต้นหรือสารอาหารย่อมส่งผลทำให้กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่พบเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมด้วย ตัวอย่างเช่นงานวิจัยที่ผ่านมาพบ *Plasticumulans acidivorans* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในระบบซึ่งอยู่ในคลาส *Gammaproteobacteria* ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้มากถึง 88% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อใช้น้ำเสียชนิดอะซิเตทเป็นสารตั้งต้นและยังพบ *Thauera selenatis* (แบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria*) และ novel *gammaproteobacterium* (แบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria*) ในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทที่ใช้แลคเตทเป็นสารอาหาร (Jiang และคณะ, (2011a)) นอกจากนี้เมื่อใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้นสามารถพบ *Thauera spp.* อีกด้วย (Lemos และคณะ, (2008), Dionisi และคณะ, (2005), และ Dionisi และคณะ, (2006)) และการที่อุณหภูมิของการเดินระบบเปลี่ยนไปก็ส่งผลต่อกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มเด่นที่พบด้วย เช่น ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส พบกลุ่มจุลินทรีย์เด่น คือ *Zoogloea sp.* (แบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria*) และ *Plasticumulans acidivorans* ตามลำดับ (Jiang และคณะ, (2011b)) อีกทั้งการเดินระบบด้วยค่าอายุตะกอนที่แตกต่างกันนี้จะทำให้เกิดการคัดเลือกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบและพบจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไปได้เช่นกัน (เศารยา กิจพ้อคำ, (2557))

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่น่าสนใจว่าจุลินทรีย์กลุ่มใดกันแน่ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม เนื่องจากตะกอนที่นำมาศึกษาเป็นตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมและไม่ทราบชนิดจุลินทรีย์ที่แน่ชัดจึงเป็นเหตุให้นักวิจัยหลายท่านต้องการที่จะศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบกันมากขึ้น งานวิจัยที่ผ่านมาของ Dionisi และคณะ, (2005) พบว่าที่ค่าพีเอชระหว่าง 6.5 ถึง 9.5 จะทำให้อัตราการผลิตพีเอชเอมีปริมาณสูงกว่า 50% (on a COD basis) อีกทั้งได้ทำการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) พบ จุ ลิน ท รี ย ์ ก ลุ่ ม *Methylobacteriaceae* (แบ ค ที ร ี ย ค ล า ส *Alphaproteobacteria*) *Flavobacterium sp.* (แบคทีเรียคลาส *Flavobacteriia*) *Candidatus Meganema perideroedes* (แบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria*) และ *Thauera sp.* เป็น

จุลินทรีย์กลุ่มหลักในระบบ แต่ในงานวิจัยดังกล่าวไม่สามารถระบุได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มใดที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้ นอกจากนี้ Oehmen และคณะ, (2014) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการผลิตพีเอชเอของจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมพบว่าที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 จุลินทรีย์สามารถผลิตพีเอชเอได้มากถึง 57.5% และมีอัตราการสะสมพีเอชเอมากถึง  $0.27 \text{ Cmol PHA Cmol X}^{-1} \text{ h}^{-1}$  และเมื่อทำการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 พบ *Azoarcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักคลาส *Betaproteobacteria* ในระบบที่น่าจะสามารถผลิตพีเอชเอได้ในปริมาณที่สูง อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวไม่สามารถยืนยันได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวนั้นทำหน้าที่ผลิตและสะสมพีเอชเออย่างแท้จริงในระบบ อีกทั้งงานวิจัยที่ผ่านมาของ Ciesielski และคณะ, (2008) ทำการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมโดยใช้เทคนิค Real Time-PCR (RT-PCR) ร่วมกับ DGGE และเทคนิค clone library ในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทป *Pseudomonas sp.* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักซึ่งจัดอยู่ในคลาส *Gammaproteobacteria* แต่ยังไม่มีการยืนยันถึงความสามารถและบทบาทของจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวในการผลิตและสะสมพีเอชเอในระบบเช่นกัน

มีงานวิจัยจำนวนน้อยที่สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพีเอชเอในกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมได้ ได้แก่ 1. งานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) ที่ศึกษากลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE และ FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอ พบจุลินทรีย์ *Plasticicumulans acidivorans* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในคลาส *Gammaproteobacteria* ที่ใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน และ *Thauera selenatis* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักคลาส *Betaproteobacteria* พบในสารตั้งต้นชนิดแลคเตทซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ทำหน้าที่ผลิตพีเอชเอในระบบ 2. งานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) พบ *Thauera sp.* (แบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria*) เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักถึง 41.1% ในถังปฏิกรณ์ซึ่งให้อะซิเตทเป็นสารอาหารและพบ *Amaricoccus sp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* มากถึง 61.4% เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในถังปฏิกรณ์ที่ให้โพธิโอเนตเป็นสารตั้งต้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ร่วมกับเทคนิค FISH และการย้อมสีพีเอชเอพบว่าจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวสามารถสะสมพีเอชเอได้ในระบบ นอกจากนี้ในงานของ 3. Jiang และคณะ, (2012) ได้ทำการศึกษาน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษพบ *Plasticicumulans acidivorans* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นมากถึง 56% ของจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบ โดยการใช้เทคนิค DGGE FISH การย้อมสีพีเอชเอและ quantitative PCR (qPCR) พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถผลิตพีเอชเอได้โดยระบบดังกล่าวสามารถสะสมโคพอลิเมอร์ได้สูงถึง 77% โดยน้ำหนักแห้ง (P(HB-co-HV) (HB : HV- 86 : 14)) เป็นต้น ซึ่งสามารถสรุปได้ในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าการที่นักวิจัยจะสามารถระบุกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมพีเอชเอในระบบได้นั้น จะต้องอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่น ๆ เข้ามาช่วย ซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจ 3 เทคนิค ได้แก่ 1. เทคนิค 16S rRNA gene

amplicon sequencing (MiSeq, Illumina) 2. เทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟิออซอด้วย Nile blue A และ 3. การย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI

เทคนิค MiSeq, Illumina เป็นเทคนิครูปแบบใหม่ (Next Generation Sequencing) ที่สามารถเพิ่มจำนวน sequence ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสก่อน โดยในงานวิจัยจะใช้เทคนิคนี้เพื่อวิเคราะห์หากกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบจากตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม และเลือกใช้เทคนิค FISH เพื่อทำการระบุกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมฟิออซอได้ในระบบโดยอาศัยหลักการที่ probe แบบ fluorescence ซึ่งเป็นสารเรืองแสงเข้าไปจับกับ 16s rRNA ที่เป็นกลุ่มเป้าหมาย โดยในงานวิจัยนี้จะมุ่งเป้าหมายไปที่กลุ่มประชากรแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* คลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมา (Serafim และคณะ, (2006), Lemos และคณะ, (2008), Çuğgin และคณะ, (2011), Jiang และคณะ, (2011a), Jiang และคณะ, (2012), Moita และ Lemos, (2012), Oshiki และคณะ, (2013) และ Queirós และคณะ, (2014)) พบว่าแบคทีเรีย 3 กลุ่มหลักเหล่านี้มีความสามารถในการผลิตและสะสมฟิออซอได้อย่างมีประสิทธิภาพ และทำการย้อมสีฟิออซอด้วย Nile Blue A ซึ่งเป็นสีแบบ fluorescence อีกชนิดหนึ่งเพื่อดูฟิออซอภายในเซลล์ของจุลินทรีย์และย้อมสี DAPI เพื่อดูกลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระบบ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลการซ้อนทับกันของแสง fluorescence เพื่อระบุกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตและสะสมฟิออซอได้ในระบบ กล่าวคือ บริเวณที่มีการซ้อนทับกันของ FISH probe ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ศึกษากับบริเวณที่ย้อมติดฟิออซอจะสื่อถึงความสามารถในการผลิตฟิออซอของจุลินทรีย์กลุ่มนั้น จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing (MiSeq, Illumina) ซึ่งจะช่วยให้สามารถวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ในระดับที่ลึกลงไปกว่าระดับคลาสซึ่งมีแนวโน้มว่าทำหน้าที่ผลิตและสะสมฟิออซอภายในระบบ

ตารางที่ 3 งานวิจัยที่สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมฟิเออเอในกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมได้

อ้างอิง	เทคนิคทางชีวโมเลกุล	จุลินทรีย์ที่พบ	วิธีผลิตฟิเออเอ	สารตั้งต้น	ที่มาตะกอน	ปริมาณฟิเออเอ	HRT (วัน)	SRT (วัน)	pH	Temp.	Operation Time	F/F		
													ปัจจัยในการเดินระบบ	
Lemos และคณะ (2008)	Cell sorting RT-PCR FISH และ Nile Blue A	Azoarcus (23.3%) Amaricoccus (28.8%) Thauera (41.1%)	Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP	27.9%	1	1	8.0- 9.2	22 องศา เซลเซียส	101 วัน	0.14		
		10						8.0- 9.2	22 องศา เซลเซียส	4 ปี	-			
		10						8.0- 9.2	22 องศา เซลเซียส	4 ปี	0.20			
Ciggin และคณะ (2011)	FISH DAPI และ Nile Blue A	Azoarcus (3.9%) Amaricoccus (61.4%) Thauera (1.9%)	Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP	141 mgCOD /L	4 ชม.	2	6.5- 7.5	25 องศา เซลเซียส	35 วัน	0.23		
		2						6.5- 7.5	25 องศา เซลเซียส	35 วัน	- 1.67			
Jiang และคณะ (2011a)	DGGE FISH และ Nile Blue A	<i>Plasticumulans acidivorans</i>	Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP	88% wt	1	1	7	30 องศา เซลเซียส	4 ปี	0.06		
		<i>Thauera</i>											4 เดือน	0.13
		<i>the novel Gammaproteobacteria</i>											1 เดือน	0.05
		<i>P. acidivorans</i> และ <i>Thauera</i>											3 เดือน	A 0.05 L 0.13

ตารางที่ 3 งานวิจัยที่สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมฟิเอชเอในกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมได้ (ต่อ)

อ้างอิง	เทคนิคทางชีวโมเลกุล	จุลินทรีย์ที่พบ	ปัจจัยในการเดินระบบ									
			วิธีผลิตฟิเอชเอ	สารตั้งต้น	ที่มาตะกอน	ปริมาณฟิเอชเอ	HRT (วัน)	SRT (วัน)	pH	Temp.	Operation Time	F/F
Jiang และคณะ (2012)	DGGE FISH และ Nile Blue A	<i>Plasticumulans acidivorans</i>	Feast/ Famine	Fermented paper mill wastewater	WWTP	77%	2	2	7	30	5 เดือน	
Moita และ Lemos (2012)	FISH และ Nile Blue A	<i>Thauera, Amaricoccus, Zoogloea</i>	Feast/ Famine	bio-oil from chicken bed fast pyrolysis	WWTP	9.2% g/g น้ำหนักแห้ง	1	10	7.2	23 - 25 องศาเซลเซียส	167 วัน	0.09 -0.2
Oshiki และคณะ (2013)	16S rRNA gene clone library FISH DAPI และ Nile Blue A	<i>Alphaproteobacteria Betaproteobacteria</i>	ไม่มีการกระตุ้น	อะซิเตท	WWTP	29-64%	-	-	8.0 - 8.2	22 องศาเซลเซียส	-	-
Queiros และคณะ (2014)	FISH และ Nile Blue A	<i>Alphaproteobacteria (72.7%) (Paracoccus, Deftluvicoccus) Betaproteobacteria (11.1%) Gammaproteobacteria (10.3%)</i>	Feast/ Famine	hardwood spent sulfite liquor	WWTP	67.6%	1	5	7	อุณหภูมิห้อง	67 วัน	

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

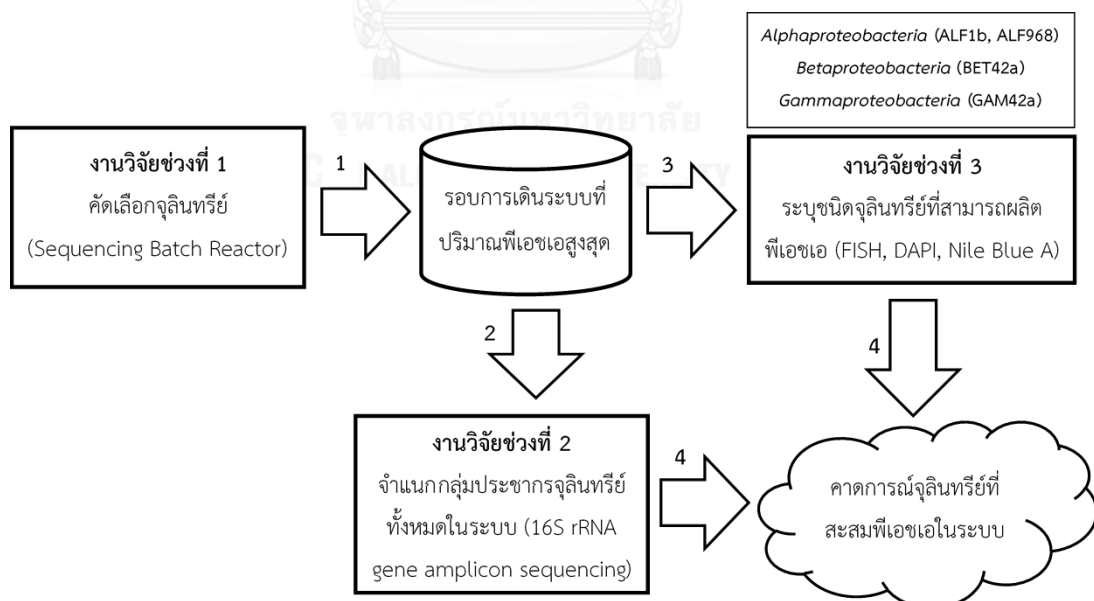
### 3.1 แผนการวิจัย

งานวิจัยนี้เลือกเดินระบบโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะที่มีการให้อาหารเกินพอ สลับกับขาดแคลน เนื่องจากมีโอกาสน้อยที่ตะกอนจุลินทรีย์หลุดออกไปพร้อมกับน้ำเสีย อีกทั้ง ทำการศึกษาพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของระบบ เช่น COD MLSS MLVSS SV30 อุณหภูมิ และปริมาณ พีเอชเอ รวมไปถึงระบุกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ ซึ่งขั้นตอนและวิธีการ ดำเนินงานวิจัยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 และภาพที่ 20 ต่อไปนี้

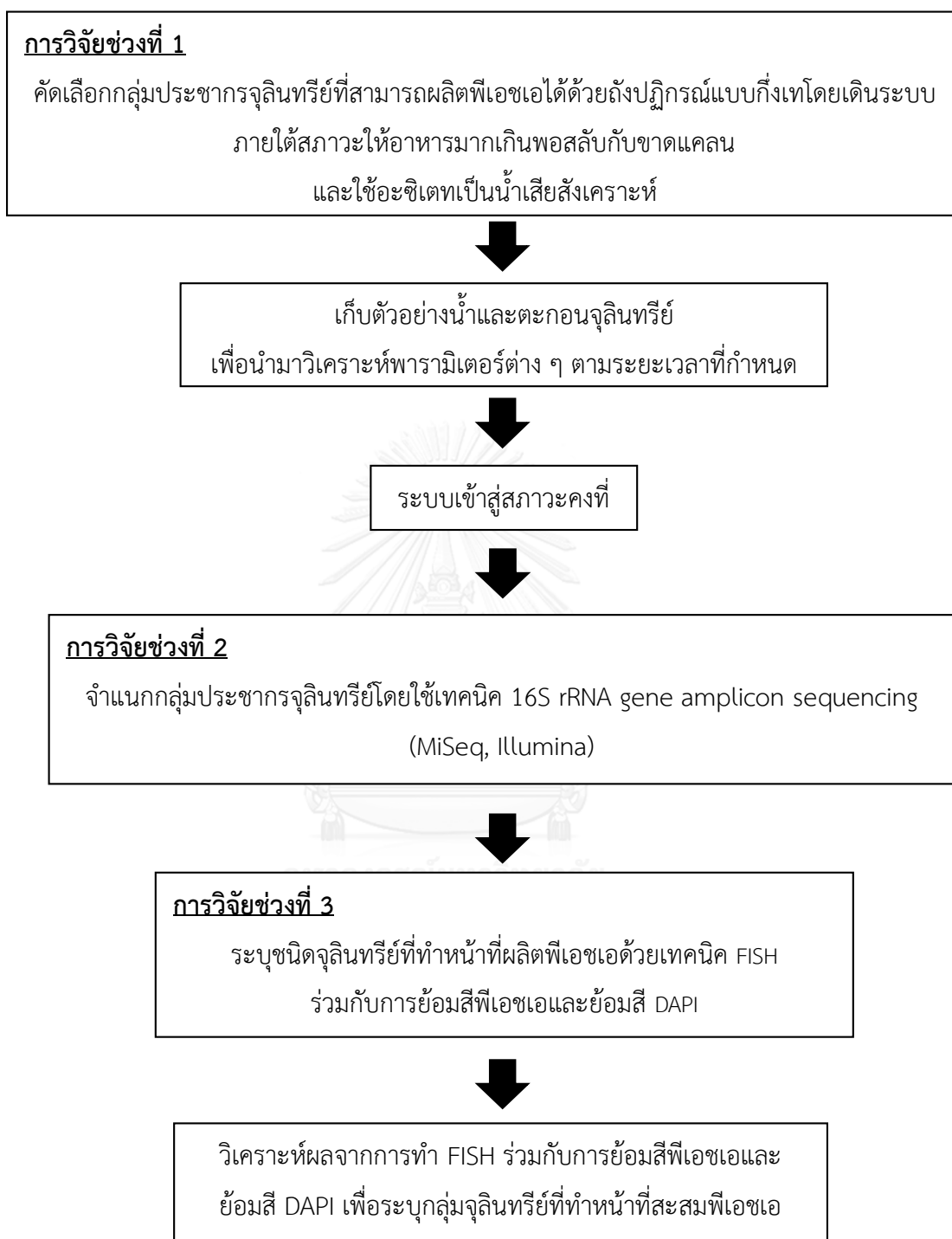
**การวิจัยช่วงที่ 1** คัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ในระบบโดยถังปฏิกรณ์ แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลับกับขาดแคลน

**การวิจัยช่วงที่ 2** จำแนกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทโดยใช้ เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing

**การวิจัยช่วงที่ 3** ระบุชนิดจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตพีเอชเอภายในระบบด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอและการย้อมสี DAPI



ภาพที่ 20 ภาพรวมการดำเนินการวิจัยทั้งหมด

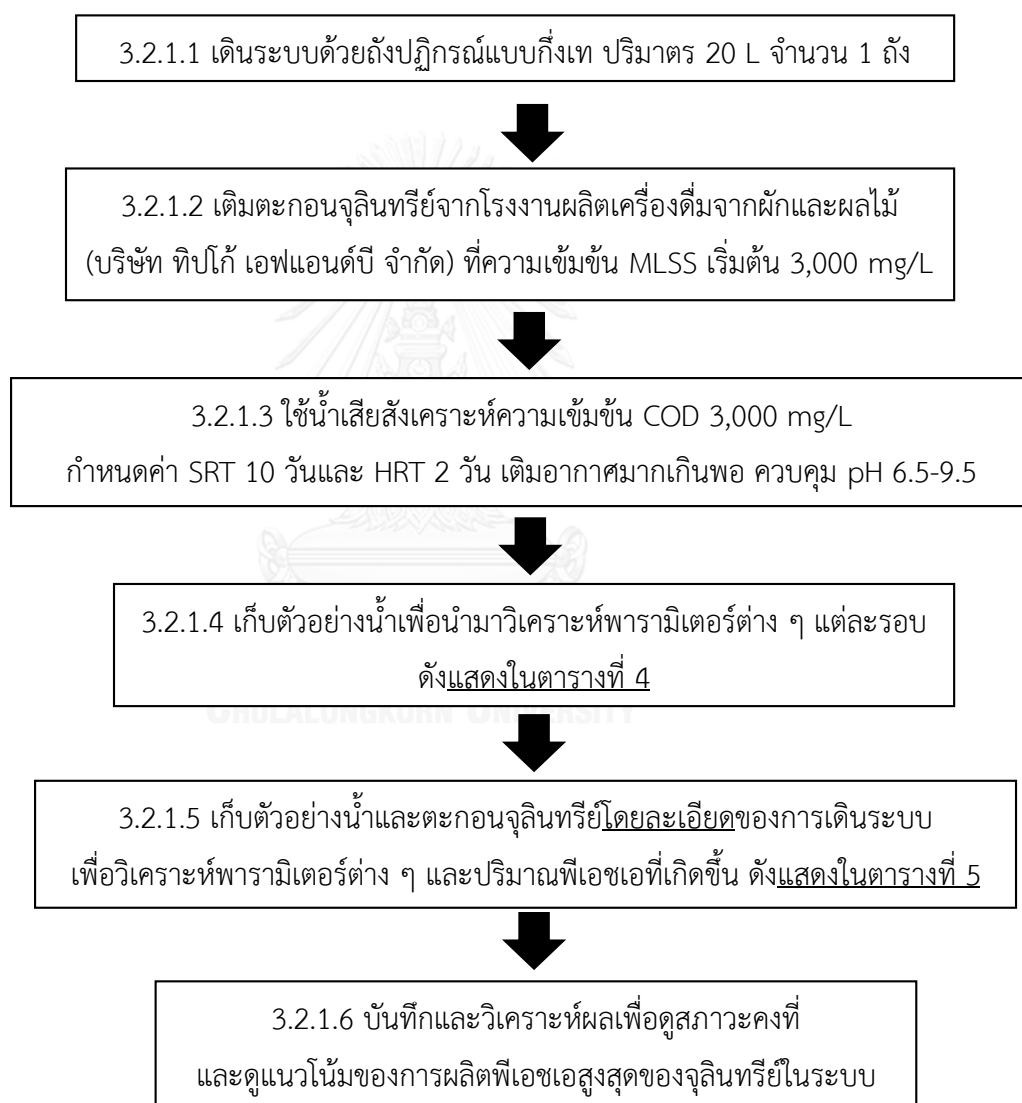


แผนภาพที่ 1 แผนการดำเนินการวิจัยทั้งหมด

### 3.2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

ในขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งการทดลองออกได้เป็น 3 ช่วงดังนี้

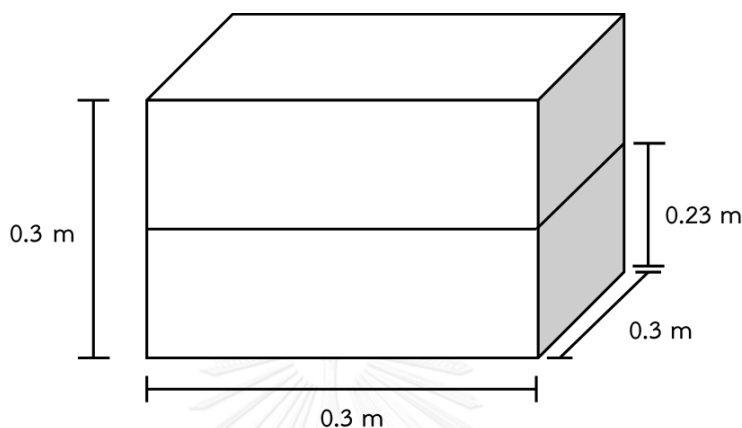
**3.2.1 การวิจัยช่วงที่ 1** คัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ในระบบโดยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลักับขาดแคลน ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการ ดังแผนภาพที่ 2 ต่อไปนี้



แผนภาพที่ 2 แผนการดำเนินการวิจัยช่วงที่ 1



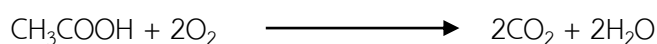
3.2.1.1 เริ่มต้นการเดินระบบด้วยการเตรียมถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทซึ่งทำด้วยแก้วใสรูปทรงสี่เหลี่ยมขนาดกว้าง 0.3 เมตร ยาว 0.3 เมตร สูง 0.23 เมตร เพื่อให้ปริมาตรน้ำที่ใช้ในการวิจัย ปริมาตร 20 L เพื่อทำการคัดเลือกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอ ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย  
ขนาดกว้าง 0.3 เมตร ยาว 0.3 เมตร สูง 0.23 เมตร

3.2.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อศึกษาการผลิตพีเอชเอในระบบนำมาจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบ SBR จากโรงงานผลิตเครื่องดื่มน้ำผักและผลไม้ บริษัท ทิปโก้ เอฟแอนด์บี จำกัด โดยจุลินทรีย์ที่นำมาวิจัยกำหนดค่า MLSS เริ่มต้นที่ 3,000 mg/L

3.2.1.3 น้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้มีองค์ประกอบของอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยสามารถคำนวณค่าซีไอเริ่มต้น (3,000 mgCOD/L) ได้จากสมการต่อไปนี้



กรดอะซิติก	1	mole	ทำปฏิกิริยาพอดีกับออกซิเจน	2	mole
กรดอะซิติก	60	g	ทำปฏิกิริยาพอดีกับออกซิเจน	64	g
ต้องใช้ กรดอะซิติก	X	mg/L	เพื่อให้ น้ำเสียสังเคราะห์มีค่าซีไอ	3,000	mg/L

$$X_{\text{CH}_3\text{COOH}} = \frac{3000 \times 60}{64} \text{ mg/L}$$

$$X_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 2,812.5 \text{ mg/L}$$

ดังนั้น ต้องใช้ความเข้มข้น  $\text{CH}_3\text{COOH}$  2,812.5 mg/L เพื่อให้น้ำเสียสังเคราะห์มีค่าซีโอดีเป็นไปตามที่กำหนด

แต่ ธาตุอาหารที่ใช้จริง คือ  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 136.08 g/mole (ข้างขวดสารเคมี) สมการด้านล่างนี้ คือ \* สมการแสดงการคำนวณจำนวน  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ที่ใช้ในการวิจัยเพื่อให้น้ำเสียสังเคราะห์มีค่า 3,000 mg/L

$$\begin{aligned} \text{mole CH}_3\text{COOH} &= \text{mole CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O} \\ \frac{\text{g CH}_3\text{COOH}}{m_{\text{CH}_3\text{COOH}}} &= \frac{\text{g CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}}{m_{\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}}} \\ \frac{2,812.5 \text{ mg/L}}{60 \text{ g/mole}} &= \frac{\text{g CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}}{136.08 \text{ g/mole}} \\ \text{g CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O} &= \frac{2,812.5 \text{ mg/L} \times 136.08 \text{ g/mole}}{60 \text{ g/mole}} \\ \text{g CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O} &= 6,378.75 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

ดังนั้น จำนวน  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ที่ใช้จึงมีค่าเท่ากับ 6,378.75 mg/L เพื่อให้ซีโอดีมีค่าตามที่ต้องการ

นอกจากนี้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสยังถือเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมในระบบอีกด้วย ซึ่งอัตราส่วนที่ใช้โดยทั่วไปในระบบ คือ COD : N : P อยู่ที่ 150 : 5 : 1 และถ้าในงานวิจัยนี้กำหนดค่าซีโอดีไว้ที่ 3,000 mg/L ดังนั้น อัตราส่วน COD : N : P ที่ใช้ในระบบจะมีค่าอยู่ที่ 3000 : 100 : 20 ตามลำดับ

**\*\* การคำนวณสารไนโตรเจนที่ใช้เป็นธาตุอาหารในระบบ**

จากสาร $\text{NH}_4\text{Cl}$	มีมวลโมเลกุล	53.49	g/mole	มี N อยู่	14	gN/mole
จะต้องเติม	$\text{NH}_4\text{Cl}$ จำนวน	X	mg/L	เพื่อให้ มี N	100	mgN/L

$$X_{\text{NH}_4\text{Cl}} = \frac{100 \text{ mgN/L} \times 53.49 \text{ g/mole}}{14 \text{ gN/mole}}$$

$$X_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 382.07 \text{ mg/L}$$

ดังนั้น จำนวน  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ที่ใช้จึงมีค่าเท่ากับ 382.07 mg/L เพื่อให้ไนโตรเจนมีค่าตามอัตราส่วนที่กำหนด

**\*\*\* การคำนวณสารฟอสฟอรัสที่ใช้เป็นธาตุอาหารในระบบ**

จากสาร $\text{KH}_2\text{PO}_4$	มีมวลโมเลกุล	136.09	g/mole	มี P อยู่	31	gP/mole
จะต้องเติม	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ จำนวน	X	mg/L	เพื่อให้ มี P	20	mgP/L

$$X_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = \frac{20 \text{ mgP/L} \times 136.09 \text{ g/mole}}{31 \text{ gP/mole}}$$

$$X_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 87.8 \text{ mg/L}$$

ดังนั้น จำนวน  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ที่ใช้จึงมีค่าเท่ากับ 87.8 mg/L เพื่อให้ฟอสฟอรัสมีค่าตามอัตราส่วนที่กำหนด

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของน้ำเสียสังเคราะห์ (3,000 mg/L) ที่ใช้ในการเดินระบบ

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (mg/L)	ความเข้มข้น (g/20L)
ธาตุอาหารหลัก		
CH <sub>3</sub> COONa.3H <sub>2</sub> O	6,378.75*	127.575
NH <sub>4</sub> Cl	382.07**	7.64
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	87.8***	1.756
MgSO <sub>4</sub>	500	10
ธาตุอาหารรอง		
FeCl <sub>3</sub>	10	0.2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4	0.08
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2	0.04
MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.3	0.006
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2	0.04
CaCl <sub>2</sub>	10	0.2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2	0.04
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	8	0.16
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2	0.04
บัฟเฟอร์และสารอื่นๆ		
NaHCO <sub>3</sub>	840	16.8
Thiourea	20	0.4

ที่มา : (Khumwanich และคณะ, (2014))

ในการเดินระบบด้วยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทณี ปัจจัยที่สำคัญอีกส่วนหนึ่ง คือ ค่าอายุตะกอน (SRT) และค่าระยะเวลาเก็บกักน้ำ (HRT) ซึ่งในระบบจะกำหนดไว้ที่ 10 วัน และ 2 วัน ตามลำดับ โดยคำนวณปริมาณการทิ้งตะกอนจุลินทรีย์ในแต่ละวันได้ ดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{อายุตะกอน (SRT)} &= \frac{\text{น้ำหนักรวมของจุลินทรีย์ในถังเติมอากาศ}}{\text{น้ำหนักรวมของจุลินทรีย์ที่ออกจากถังเติมอากาศต่อวัน}} \\
 &= \frac{V \text{ (L)} \times \text{MLSS (mg/L)}}{Q_w \text{ (L/day)} \times \text{MLSS (mg/L)}}
 \end{aligned}$$

$$10 \text{ day} = \frac{20}{Q_w} \text{ L}$$

$$Q_w = 2 \text{ L/day}$$

**ดังนั้น** ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ที่จำเป็นต้องทิ้งออกจากระบบเพื่อควบคุมค่า SRT ไว้ที่ 10 วัน คือ 2 L/d

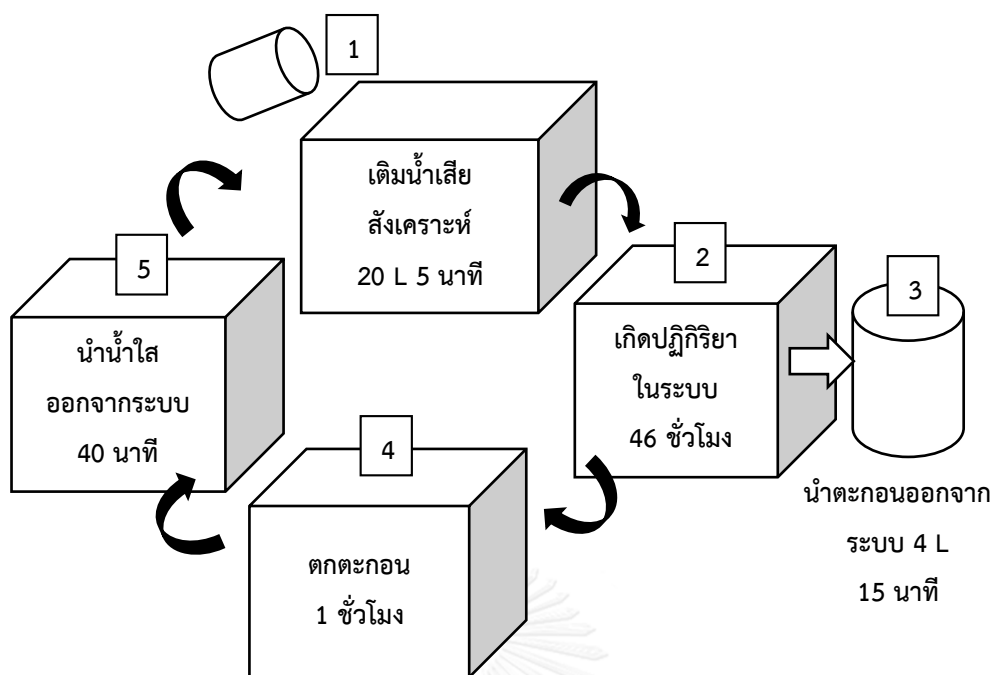
โดยที่ V คือ ปริมาตรน้ำเสียในระบบ (L)  
 MLSS คือ ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบ (mg/L)  
 $Q_w$  คือ ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ที่ทิ้งออกจากระบบ (L/day)

ในขั้นตอนของการเดินระบบจะเติมอากาศด้วยเครื่องเติมอากาศผ่านทางหัวทรายในปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) ที่มากเกินไปเพื่อป้องกันสภาวะไร้ออกซิเจน ควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5-9.5 ด้วยเครื่องควบคุมพีเอชอัตโนมัติ (pH controller)

การเดินระบบด้วยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทในแต่ละรอบของงานวิจัยนี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 22

**ตารางที่ 5** ขั้นตอนของการเดินระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทใน 1 รอบ ที่ SRT 10 วัน และ HRT 2 วัน

ขั้นตอนการเดินระบบ	ระยะเวลาที่ใช้ประมาณ
1. เติมน้ำเสียสังเคราะห์ 20 L ลงในถังปฏิกรณ์	5 นาที
2. เกิดปฏิกิริยาในระบบและเติมอากาศมากเกินไป	46 ชั่วโมง
3. นำตะกอนออกจากระบบ 4 L	15 นาที
4. ตกตะกอนจุลินทรีย์โดยการหยุดเครื่องเติมอากาศเพื่อแยกจุลินทรีย์และน้ำใสออกจากกัน	1 ชั่วโมง
5. นำน้ำใสออกจากระบบจนครบตามปริมาตรและวนกลับไปเริ่มเติมน้ำเสียสังเคราะห์เข้าระบบอีกครั้ง	40 นาที



ภาพที่ 22 ขั้นตอนของการเดินระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทใน 1 รอบ ที่ SRT 10 วัน และ HRT 2 วัน

3.2.1.4 เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำมาวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ แต่ละรอบทั่วไป ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าพารามิเตอร์และปริมาณน้ำตะกอนตัวอย่างที่เก็บเพื่อวิเคราะห์ตัวอย่างในรอบทั่วไป

พารามิเตอร์ที่ตรวจวัด	ปริมาณตัวอย่างน้ำตะกอนที่เก็บในแต่ละรอบ (ml)			วิธีวิเคราะห์
	เริ่มต้นรอบ (ชั่วโมงที่ 0)	กลางรอบ (ชั่วโมงที่ 24)	ท้ายรอบ (ชั่วโมงที่ 48)	
pH	-	-	-	pH meter
DO	-	-	-	DO meter
อุณหภูมิ	-	-	-	Thermometer
COD	30	30	30	รีฟลักซ์แบบปิด (Close reflux)
MLSS	30	30	30	Gravimetric method
รวมปริมาณน้ำตะกอน ตัวอย่างในแต่ละรอบ (X)	60	60	60	X = 180 ml
ปริมาณน้ำตะกอนที่ต้องนำ ออกจากระบบ (4000-X)	4,000-180 = 3,820 ml			

3.2.1.5 เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนจุลินทรีย์โดยละเอียดของการเดินระบบเพื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ และปริมาณพีเอชเอที่เกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 7

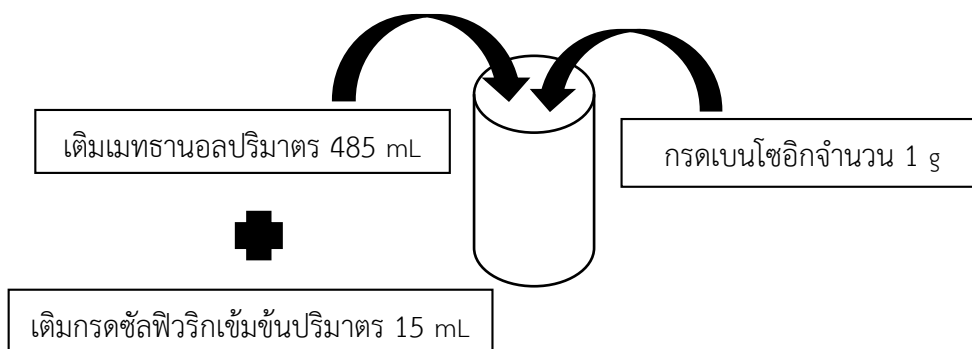
**ตารางที่ 7** ค่าพารามิเตอร์ตัวอย่างน้ำและตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างที่เก็บโดยละเอียดเพื่อวิเคราะห์ตัวอย่าง

พารามิเตอร์ที่ตรวจวัด	ปริมาณตัวอย่างน้ำตะกอนที่เก็บในแต่ละรอบ (ml)										วิธีวิเคราะห์	หมายเหตุ
	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr	10 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr		
pH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pH meter	ปรับด้วย HCl 0.1 M pH controller
DO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DO meter	
อุณหภูมิ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Thermometer	
SV30	1 L										กรวย Imhoff	ใส่คืน
COD	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	รีฟลักซ์แบบปิด (Close reflux)	หยด H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
MLSS และ MLVSS	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	Gravimetric method	กรองด้วย 10 mL 3 ซ้ำ
PHA	320	320	320	320	320	320	320	320	320	320	GC-FID	อบแห้ง 80°C 24 hr.
กลุ่มประชากรจุลินทรีย์	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	เทคนิค Miseq	Centrifuge ที่ -20 °C
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	เทคนิค FISH	Fix 4% Paraformaldehyde ที่ -20 °C
รวมปริมาณน้ำตะกอน												
ตัวอย่างในแต่ละรอบ (X)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	X = 4,000 ml	
ปริมาณน้ำตะกอนที่ต้องนำ	4,000-4,000 = 0 ml											
ออกจากระบบ (4000-X)												

3.2.1.6 หลังจากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณพีเอชเอจากตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลา โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายและตรวจวัดพีเอชเอด้วยเครื่อง Gas chromatography ชนิด Flame Ionization detector (GC-FID) บันทึกค่าที่ได้และสร้างกราฟเพื่อดูสถานะคงที่และแนวโน้มของการผลิตพีเอชเอสูงสุดของจุลินทรีย์ในระบบ โดยมีขั้นตอนละเอียดดังนี้

#### 3.2.1.6.1 การเตรียมสารละลาย Internal Standard (IS)

เตรียมสารละลาย IS ที่ความเข้มข้น 3% กรดซัลฟิวริกในเมทานอลที่มีกรดเบนโซอิก 2 g/L เริ่มจากชั่งกรดเบนโซอิกจำนวน 1 g แล้วละลายในเมทานอลปริมาตร 485 mL ลงในขวดแก้วที่มีฝาปิด จากนั้นจึงค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 15 mL ลงไป ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน สารนี้สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งการเตรียมสาร IS สามารถเตรียมได้ ดังแสดงในภาพที่ 23 ต่อไปนี้



ภาพที่ 23 การเตรียมสารละลาย Internal Standard ในการสกัดพีเอชเอ

### 3.2.1.6.2 การเตรียมตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ก่อนสกัดพีเอชเอ

นำตัวอย่างที่เก็บแต่ละช่วงเวลามาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกตะกอนจุลินทรีย์และน้ำใสออกจากกัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

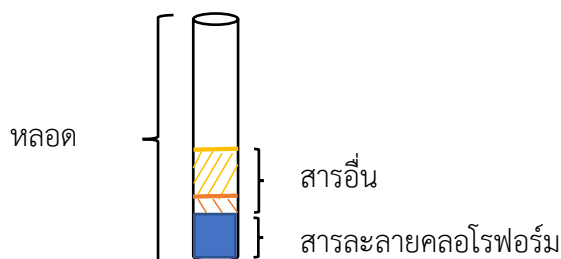
### 3.2.1.6.3 การสกัดพีเอชเอออกจากเซลล์จุลินทรีย์

ในการสกัดพีเอชเอให้นำตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ที่อบแล้วมาบดละเอียด จากนั้นชั่งน้ำหนักตะกอนประมาณ 20 mg ใส่ในหลอดตัวอย่าง (ขนาด 16\*100 mm.) แล้วปิดฝาหลอดตัวอย่างและ Internal Standard ปริมาตรอย่างละ 2 mL ลงไป ปิดฝาให้แน่น (ทำในตู้ดูดควันเนื่องจากคลอโรฟอร์มเป็นสารอันตราย) นำหลอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงต้มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เปื่อย ซึ่งในระหว่างการทำต้มที่ทุก ๆ ระยะเวลา 30 นาที จะต้องนำหลอดตัวอย่างออกมาเขย่าด้วย vortex เป็นเวลาหลอดละ 3 นาที เพื่อให้พีเอชเอที่อยู่ในเซลล์ละลายออกมาอยู่กับสารละลายคลอโรฟอร์ม ทำจนครบระยะเวลาต้ม 3 ชั่วโมงและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อหลอดตัวอย่างเย็นลงแล้วให้เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 mL ลงไป ปิดฝาให้แน่นก่อนนำไป vortex เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้สารละลายคลอโรฟอร์มแยกชั้นออกจากสารอื่น ๆ ซึ่งสารละลายคลอโรฟอร์มจะอยู่ชั้นล่างสุดของหลอดทดลอง (ภาพที่ 24) จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายคลอโรฟอร์มออกมาใส่ขวด vial ปริมาตรประมาณ 1 mL ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID ต่อไป

หากยังไม่ได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID ขวด vial ดังกล่าวสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานพีเอชเอก็ทำเช่นเดียวกันกับตัวอย่างโดยใช้สาร poly(3-hydroxybutyric acid-3-hydroxyvaleric



acid) ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma-Aldrich ที่มีอัตราส่วนของ PHB : PHV เท่ากับ 88 : 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้น 5 g/L ซึ่งขั้นตอนในการสกัดพีเอชเอออกจากเซลล์จุลินทรีย์สามารถอธิบายได้ดังแผนภาพที่ 3



**ภาพที่ 24** การแยกชั้นของสารละลายคลอโรฟอร์มในหลอดทดลอง (ขนาด 16\*100 mm.)

#### 3.2.1.6.4 วิเคราะห์ปริมาณพีเอชเอด้วยเครื่อง GC-FID

นำตัวอย่างที่สกัดไว้ในขวด vial (ขนาด 2 mL) เข้าวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID โดยเครื่องจะฉีดตัวอย่างปริมาตร 1  $\mu$ L เข้าเครื่องและใช้สภาวะการวิเคราะห์ตามวิธีของอัมทิกา เมืองวงษ์, (2553) ดังตารางที่ 8 และวิเคราะห์หาปริมาณพีเอชเอด้วยพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานพีเอชเอความเข้มข้น 5 g/L ได้จากสมการต่อไปนี้

จากกราฟสารละลายมาตรฐานพีเอชเอ  $Y = aX$

โดยที่ Y คือ พื้นที่ใต้กราฟพีเอชเอ/พื้นที่ใต้กราฟของ IS

X คือ ความเข้มข้นของพีเอชเอ (g/L) เท่ากับ  $Y/a$

a คือ ความชันของกราฟสารละลายมาตรฐาน

จากนั้น นำค่า X (g/L) ที่คำนวณได้จากสมการ ไปคำนวณเทียบกับตัวอย่างดังสมการนี้

ในสารละลายคลอโรฟอร์มปริมาตร 1000 mL มีปริมาณพีเอชเออยู่ X g

ถ้าสารละลายคลอโรฟอร์ม 2 mL จะมีปริมาณพีเอชเออยู่ M g

$$\text{ดังนั้น} \quad M = \frac{2X}{1000} \text{ g ในคลอโรฟอร์ม 2 mL}$$

$$\text{หาปริมาณพีเอชเอ ได้จาก } K = \frac{M}{P} \quad (\text{gPHA/gMLSS})$$

หาปริมาณพีเอชเอ (%gPHA/gMLSS)

$$K (\text{\%gPHA/gMLSS}) = \frac{M}{P} \times 100$$

โดยที่ K คือ ปริมาณพีเอชเอ (gPHA/gMLSS)

M คือ กรัมของพีเอชเอ (gPHA) ในคลอโรฟอร์ม 2 mL

P คือ น้ำหนักของตะกอนจุลินทรีย์ที่ซึ่งมาตอนสกัด (gMLSS)

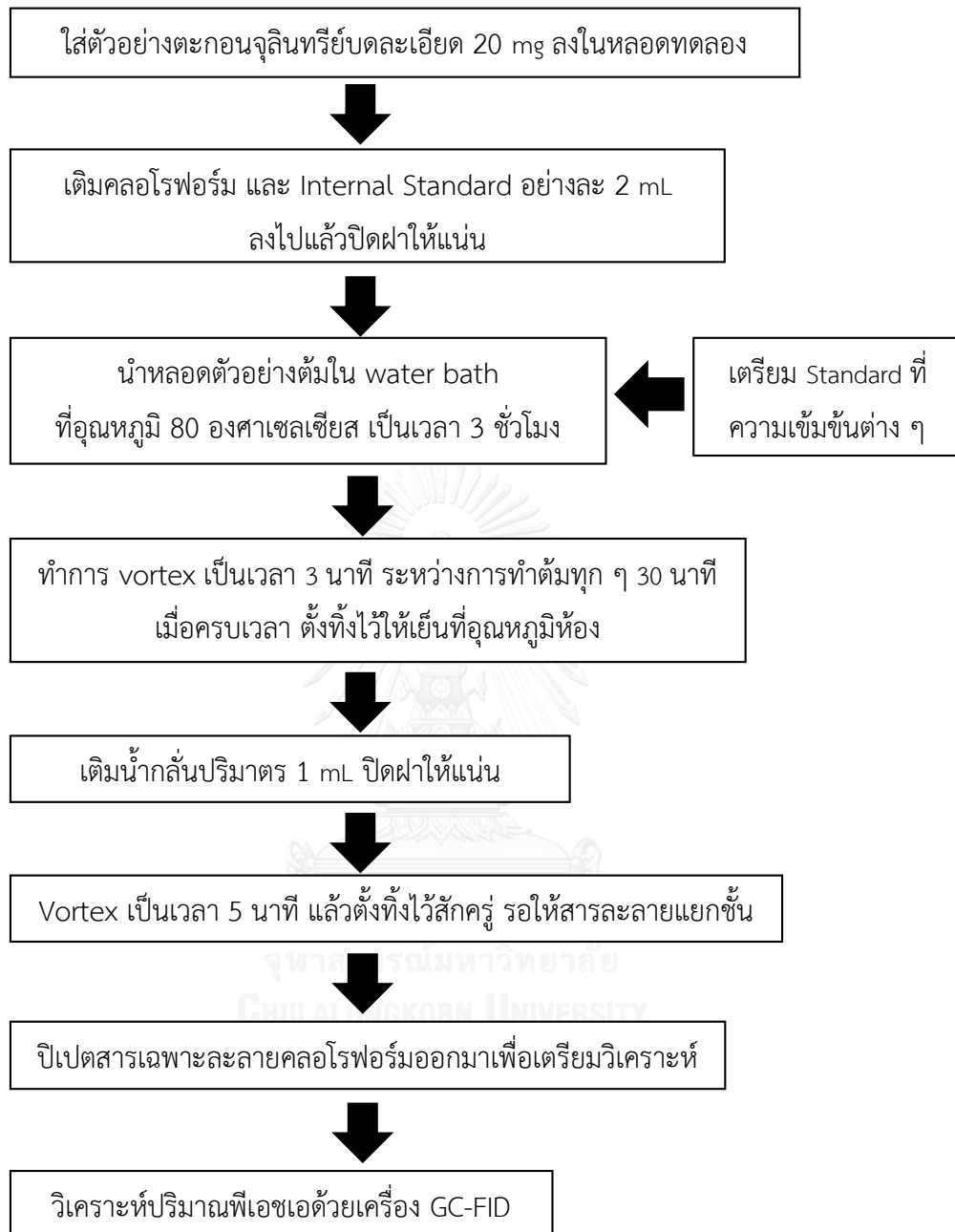
### 3.2.1.6.5 บันทึกผลและวิเคราะห์ผลเพื่อหาค่าพีเอชเอสูงสุด

นำค่าปริมาณพีเอชเอ (%gPHA/gMLSS) ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละช่วงเวลาของการเดินระบบมาสร้างกราฟเทียบกับระยะเวลา (ชั่วโมง) เพื่อวิเคราะห์หาช่วงเวลาที่ยูนิทรีสามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุด (จุดยอดของกราฟ) ซึ่งตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุดในช่วงเวลาดังกล่าวจะถูกนำไปวิเคราะห์ในการทดลองช่วงที่ 2 และ 3 ต่อไป

### ตารางที่ 8 สภาวะเครื่อง GC-FID

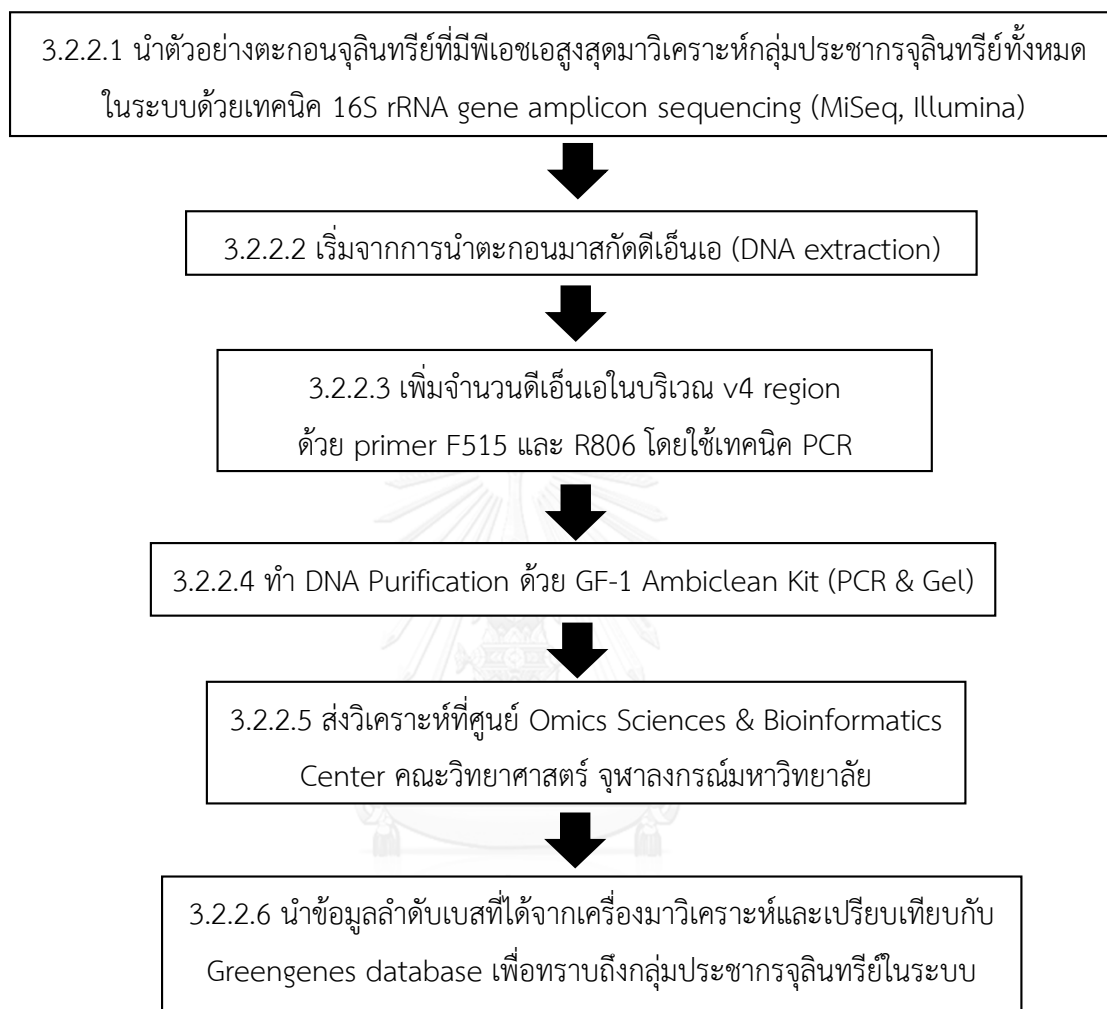
ชนิดของคอลัมน์	แคปพิลลารี คอลัมน์ (Capillary column) ชนิด INNOWAX ขนาด 30 เมตร X 0.32 มิลลิเมตร X 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิของ injector	250 องศาเซลเซียส (Isothermal)
อุณหภูมิของ column	130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector (FID)	250 องศาเซลเซียส (Isothermal)
Split ratio	50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (Carrier gas)	ก๊าซฮีเลียม (He) อัตราการไหล 2 mL ต่อนาที
ปริมาตรการฉีด	1 ไมโครลิตร

ที่มา : อัมตिका เมืองวงษ์, (2553)



แผนภาพที่ 3 ขั้นตอนในการสกัดพีเอชเอออกจากเซลล์จูลินทรีย์

3.2.2 การวิจัยช่วงที่ 2 จำแนกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบโดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing (MiSeq, Illumina) ดังแสดงในแผนภาพที่ 4



แผนภาพที่ 4 แผนการดำเนินงานวิจัยช่วงที่ 2

จากการวิจัยในช่วงที่ 1 เมื่อเดินระบบด้วยการให้อาหารเกินพอสลักกับขาดแคลน โดยใช้ น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว จะได้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต และสะสมพืเอชเอสูงสุดในระบบตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมในระบบ และเมื่อเข้าสู่ช่วงการวิจัยที่ 2 จะเป็นขั้นตอนของการศึกษาถึงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากช่วงการทดลองที่ 1 โดยใช้ เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing (MiSeq, Illumina) ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวสามารถ ดำเนินการได้ดังนี้

3.2.2.1 นำตัวอย่างกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตและสะสมพืเอชเอได้สูงสุดจากการ ทดลองช่วงที่ 1 มาวิเคราะห์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ แยกตะกอนจุลินทรีย์และน้ำใสออกจากกัน เก็บเฉพาะตัวอย่างตะกอนให้ได้ปริมาณ 0.5 mL แล้วแช่ตู้ แช่ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมพร้อมที่จะสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3.2.2.2 นำตัวอย่างจุลินทรีย์ดังกล่าวมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA FastDNA ® SPIN Kit MP Biomedicals) โดยทำตามขั้นตอนที่ระบุโดยผู้ผลิต

3.2.2.3 เมื่อสกัดดีเอ็นเอออกมาได้แล้วให้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณ v4 region ด้วย primer F515 และ R806 (บริษัท sigma) โดยอาศัยเทคนิค PCR ซึ่ง primer ดังกล่าวแสดงใน ตารางที่ 9

ตารางที่ 9 Primer ที่ใช้ในการทดลอง (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท sigma)

Primer	ลำดับเบส
F515	5'-CACGGTCGKCGGCCATT-3'
R806	5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'

อ้างอิงจาก : Woraittinun และ Suwannasilp, (2017)

ซึ่งเทคนิค PCR เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ สามารถทำ ได้โดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิที่เหมาะสมกับ primer ที่ขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้โปรแกรม อุณหภูมิแสดงในตารางที่ 10 และองค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ในตารางที่ 11 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 โปรแกรมอุณหภูมิที่เหมาะสมกับ primer F515 และ R806

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Initial denaturing	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	20 รอบ
2. Denaturing	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
3. Annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
4. Extension	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
5. Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
6. End	4 องศาเซลเซียส	∞	

ตารางที่ 11 องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ต่อ 1 ตัวอย่าง ( 13 และ 50 ไมโครลิตร)

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu$ L)	ปริมาตร ( $\mu$ L)
1. น้ำ (Molecular grade)	6.65	24.5
2. 10X Taq Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.25	5
3. $\text{MgCl}_2$ (10 mM ; Vivantis )	1.25	5
4. Forward primer 515F (10 $\mu$ M)	1.25	5
5. Reverse primer 806R (10 $\mu$ M)	1.25	5
6. dNTP Mix (10 mM ; Vivantis )	0.25	1
7. Taq DNA Polymerase (Fermentus)	0.125	0.5
8. DNA Template	1	4
<b>รวม</b>	<b>13</b>	<b>50</b>

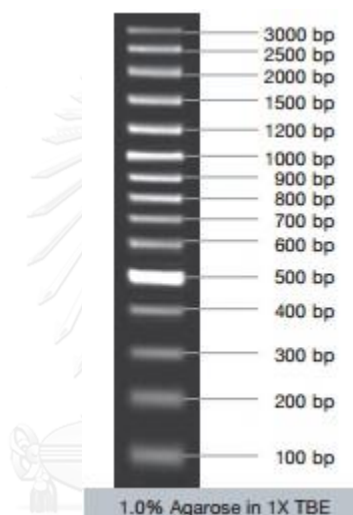
ในการทำ PCR จะต้องทำภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิและเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้จะต้องทำการฆ่าเชื้อโดยใช้แสง UV อย่างน้อย 15 นาที ก่อนที่จะเริ่มทำการรวมสารเคมีที่ 1 - 7 ในตารางที่ 11 เข้าด้วยกันในหลอดเดียว (vortex เบา ๆ) ซึ่งสารดังกล่าวมักจะถูกเรียกว่า Master mixed และการเตรียม Master mixed สามารถเตรียมพร้อมกันได้ครั้งละหลายตัวอย่าง

ข้อดีของการรวม Master mixed เข้าด้วยกัน คือ เพื่อลดความผิดพลาดในการปิเปตสาร ปริมาณน้อย ๆ สังเกตได้จากสารเคมีใช้แต่ละตัวอย่างมีปริมาตรน้อยมาก และเมื่อ Master mixed เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันแล้วให้ปิเปตสารดังกล่าวแบ่งใส่หลอด PCR ปริมาตรหลอดละ 46  $\mu$ L ก่อนที่จะปิเปตดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดไว้ (3.2.2.2) ปริมาตร 4  $\mu$ L ใส่ลงไป ซึ่งปริมาตรรวมทั้งสิ้น 50  $\mu$ L ต่อ

หลอด PCR 1 ตัวอย่าง จากนั้นปิดฝาแล้วนำเข้าเครื่อง T100™ Thermal cycle (Bio-Rad) ตามโปรแกรมอุณหภูมิในตารางที่ 10

ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อเลือก condition ที่เหมาะสม ผู้วิจัยเลือกเตรียมที่ปริมาตร 13  $\mu$ l ก่อน และเมื่อได้ condition ที่เหมาะสมกับตัวอย่างตามตารางที่ 10 แล้วให้เพิ่มปริมาตรเป็น 50  $\mu$ l

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาจะต้องทำการตรวจสอบผลการทำ PCR โดยใช้เทคนิค DNA electrophoresis ซึ่งเป็นการรันดีเอ็นเอบนเจล (2% w/v agarose gel) ที่ความต่างศักย์ 100 mV เป็นเวลา 50 นาที หลังจากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide อีก 45 นาที และตรวจสอบความยาวของดีเอ็นเอโดยเทียบกับ DNA ladder & marker ขนาด 100 คู่เบส (Vivantis) ภาพที่ 25 ภายใต้อ่างส่องแสงยูวี



ภาพที่ 25 DNA ladder&marker ขนาด 100 คู่เบส (Vivantis)

ที่มา : <http://www.vivanttechnologies.com>

3.2.2.4 เมื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการแล้วทำ DNA Purification ด้วย GF-1 Ambiclean Kit (PCR & Gel) (Vivantis) โดยทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้โดยผู้ผลิต และสารเคมีที่ใช้ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR clean up ต่อ 1 ตัวอย่าง

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu$ L)
DNA Binding Buffer (Buffer DB)	ปริมาตรเท่ากับดีเอ็นเอตัวอย่าง
Wash Buffer	650
Elution Buffer	30

3.2.2.5 นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ส่ง sequence เพื่อ sequencing หาลำดับเบสของตัวอย่างที่ ศูนย์ Omics Sciences & Bioinformatics Center ชั้น 12 อาคารมหาชิรณทิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

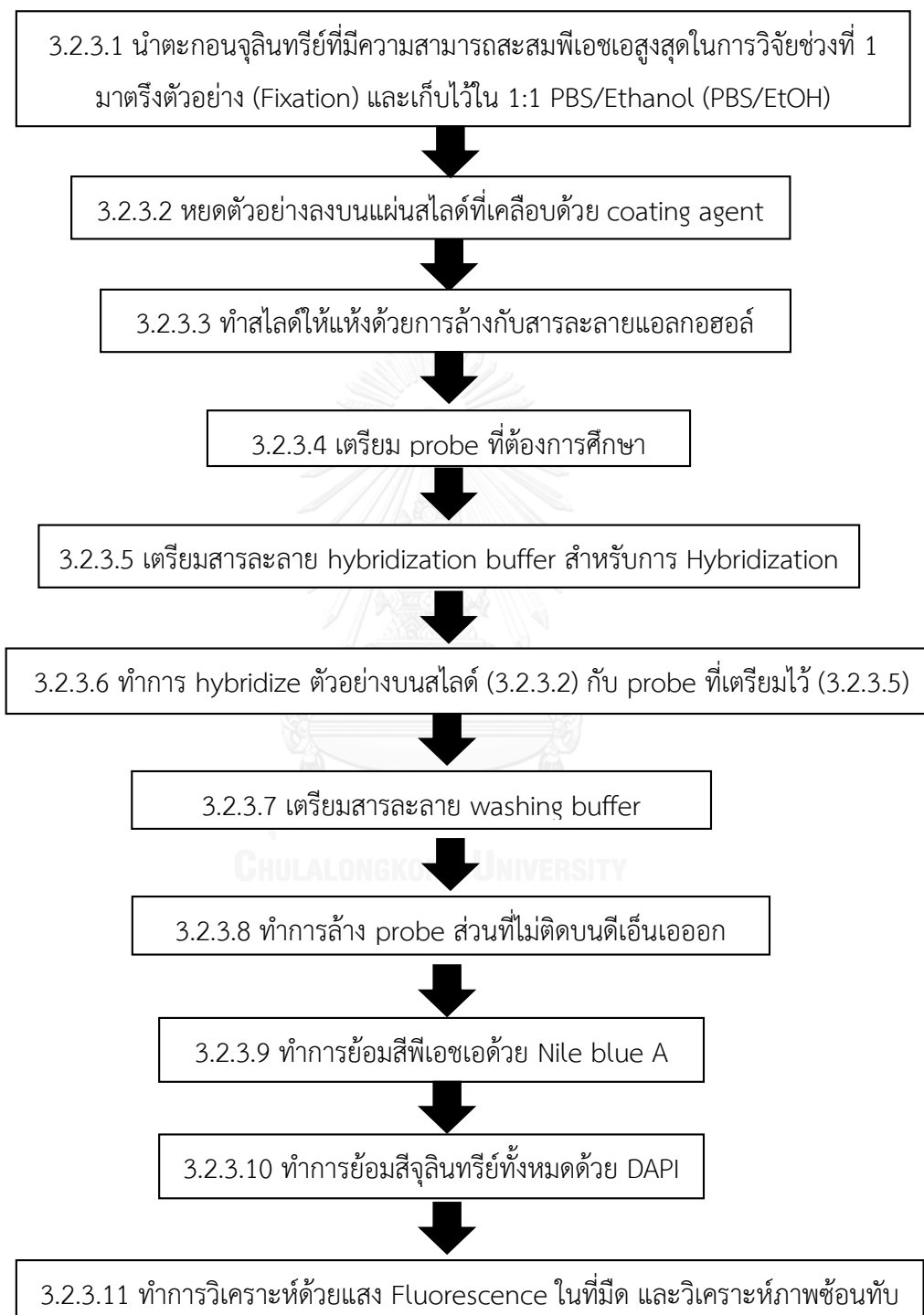
3.2.2.6 นำข้อมูลที่ได้จากเครื่องมาวิเคราะห์เพื่อหากลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับ Greengenes database

จากขั้นตอนงานวิจัยดังกล่าวมาแล้วในขั้นต้นจะทำให้ทราบถึงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ทั้งหมดในระบบจากตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมที่สามารถผลิตและสะสมฟิเอชเอได้ปริมาณมากที่สุดและเข้าสู่การดำเนินงานวิจัยในช่วงที่ 3 ต่อไป





**3.2.3 การวิจัยช่วงที่ 3** ศึกษาจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตฟิเอชเอในระบบด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอและการย้อมสี DAPI ดังแสดงในแผนภาพที่ 5



แผนภาพที่ 5 แผนการดำเนินงานวิจัยช่วงที่ 3

ในการวิจัยช่วงที่ 3 ทำเพื่อศึกษาถึงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมฟิเอชเอได้ในระบบ โดยใช้เทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอและการย้อมสี DAPI นอกจากนี้จะอาศัยผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการวิจัยในช่วงที่ 2 มาเพื่อยืนยันผลกับกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ศึกษา ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้ (Nielsen และคณะ, (2009)) และ Thayanukul และคณะ, (2010))

3.2.3.1 เก็บตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมฟิเอชเอได้สูงสุดในช่วงการวิจัยที่ 1 มาตรึงตัวอย่างด้วยสารละลาย 4 % formaldehyde ผลิตภัณท์จาก SCBT ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อหยุดการเจริญเติบโต หยุดการใช้ฟิเอชเอและเปิดผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ และสารเคมีที่ใช้แสดงในตารางที่ 13

3.2.3.1.1 เก็บตะกอนจุลินทรีย์ในชั่วโมงที่จุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสมฟิเอชเอได้สูงสุด ปริมาตรหลอดละ 1 mL จำนวน 4-6 หลอด (เก็บให้เพียงพอ)

3.2.3.1.2 ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนจุลินทรีย์และน้ำแยกชั้นออกจากกันที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

3.2.3.1.3 จากนั้นเปิดน้ำออกจากหลอดทดลองให้เหลือเฉพาะตะกอนจุลินทรีย์

3.2.3.1.4 ปิดสารละลาย 4% paraformaldehyde ที่แช่เย็นลงในหลอดทดลองจนทั่วตัวอย่าง (ปริมาณ 1 mL)

3.2.3.1.5 vortex หรือเขย่าเบา ๆ เพื่อให้เซลล์จุลินทรีย์สัมผัสกับสารละลาย และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1.5 ชั่วโมงหรืออาจทิ้งไว้ข้ามคืน แต่ไม่ควรเกิน 24 ชั่วโมง เนื่องจากจะทำให้เซลล์แห้งได้

3.2.3.1.6 เมื่อตรึงตัวอย่างไว้จนครบเวลาแล้ว ให้นำหลอดทดลองดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกส่วนน้ำออกแล้วเปิดน้ำใส่ทิ้ง

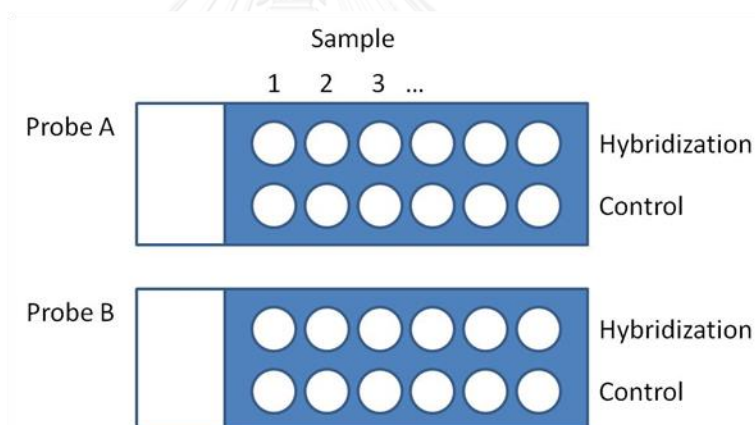
3.2.3.1.7 เติม 1X PBS ปริมาณ 1 mL ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex เพื่อล้างสารตรึงออกจากตะกอนเซลล์ ทำซ้ำ 2 ครั้ง

3.2.3.1.8 เติม 1X PBS และ 100% แอลกอฮอล์ ปริมาตรละ 0.5 mL ลงในหลอดทดลองดังกล่าวแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ไม่วิเคราะห์ทันทีตัวอย่างดังกล่าวสามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลา 1 ปี

**ตารางที่ 13** สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Fixation ต่อ 1 รอบของตัวอย่าง  
(ประมาณ 4-6 หลอดตัวอย่าง)

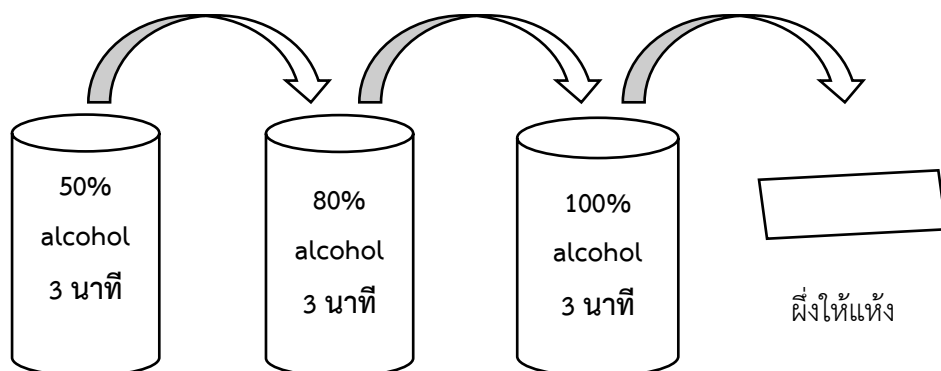
สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (mL)
1X Phosphate-buffered Saline (1X PBS)	20
4% paraformaldehyde (PFA) (ผลิตภัณฑ์จาก SCBT (USA))	6
100% เอทานอล	3

3.2.3.2 เป็นขั้นตอนการหยดตัวอย่างลงบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วย coating agent ซึ่งสาร coating agent นี้จะช่วยจับตัวอย่างให้อยู่บนแผ่นสไลด์ได้ดีขึ้น โดยก่อนจะหยดตัวอย่างจะต้องล้างแอลกอฮอล์ออกด้วย 1X PBS ก่อน จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงปิเปตตัวอย่างปริมาตรหลุมละประมาณ 8  $\mu$ l หยดลงบนแผ่นสไลด์หลุมที่เตรียมเอาไว้ (ดังภาพที่ 26) รองนตัวอย่างแห้งแล้วจึงทำขั้นตอนต่อไป



**ภาพที่ 26** แผ่นสไลด์ที่ใช้ในการหากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH

3.2.3.3 เมื่อตัวอย่างแห้งแล้วนำแผ่นสไลด์ดังกล่าวไปทำ alcohol series ให้แห้งสนิทโดยจุ่มลงในสารละลายแอลกอฮอล์ที่ 50%, 80%, และ 100% ที่สารละลายความเข้มข้นละ 3 นาทีตามลำดับ เมื่อเสร็จแล้วฝั่งแผ่นสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ดังภาพที่ 27



ภาพที่ 27 ขั้นตอนการทำสไลด์ให้แห้งด้วยการทำ alcohol series ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.2.3.4 เตรียม probe และ primer ที่ต้องการศึกษาในฟิล์ม *Proteobacteria* โดย probe เป็นชนิด fluorescence ที่สามารถเรืองแสงได้และมีความจำเพาะของ %formaldehyde (%FA) ที่แตกต่างกัน ส่วน primer เป็นสารที่ไม่มีสี จะใช้เพื่อเป็นสาร competitor เพื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอส่วนที่ต่างกันในกรณีที่ทำ hybridization ระหว่าง probe GAM42a และ probe BET42a (ในตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ชนิดของ probe และ primer ที่ต้องการศึกษาในฟิล์ม *Proteobacteria*

Name	Specificity	Sequence	Color	%FA
ALF1b	คลาส <i>Alphaproteobacteria</i>	5' -CGTTCG(C/T)TCTGAGCCAG-3'	Cy3 (Red)	20
ALF968	คลาส <i>Alphaproteobacteria</i>	5' -GGTAAGGTTCTGCGCGTT-3'	Cy3 (Red)	20
BET42a	คลาส <i>Betaproteobacteria</i>	5' -GCCTTCCCACTTCGTTT-3'	Cy3 (Red)	35
BET42a	คลาส <i>Betaproteobacteria</i>	5' -GCCTTCCCACTTCGTTT-3'	primer	35
GAM42a	คลาส <i>Gammaproteobacteria</i>	5' -GCCTTCCCACATCGTTT-3'	Cy3 (Red)	35
GAM42a	คลาส <i>Gammaproteobacteria</i>	5' -GCCTTCCCACATCGTTT-3'	primer	35

ที่มา : <http://probase.csb.univie.ac.at/>

ซึ่งทั้ง probe และ primer ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สั่งมาจากบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดย probe และ primer ที่ได้มานั้นเมื่อละลายจะถูกเรียกว่า Master solution หรือ Stock solution

ส่วน probe และ primer ที่ใช้ในขั้นตอนของการ Hybridization จะต้องทำให้เป็น working probe solution ก่อน ซึ่งขั้นตอนในการละลาย Master solution และการเตรียม working probe solution สามารถทำได้ต่อไปนี้ (จะต้องทำในที่มืดทุกขั้นตอนเพื่อป้องกัน probe สลายตัว)

1. ในการเตรียม Master solution นำ probe และ primer ที่ต้องการมาละลาย โดยปิเปต TE-buffer ใส่ในหลอด probe และ primer แต่ละหลอดตามปริมาตรที่บอก (ข้างขวดหรือแผ่นที่แนบมา) ในหน่วย  $\mu\text{L}$  เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 pmol/ $\mu\text{L}$
2. ในกรณีที่ยังไม่เตรียม working probe solution ให้เก็บ Master solution ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
3. ถ้าต้องการเตรียม working probe solution ให้เจือจาง Master solution กับน้ำ (Molecular grade) ในอัตราส่วน 1:100 ได้เลยแล้วปิเปตสารขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้สารเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.5 เตรียมสารละลาย hybridization buffer ด้วยความเข้มข้นของ %FA ที่เหมาะสมสำหรับให้ probe เข้าจับกับ 16S rRNA ของจุลินทรีย์ในตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 15 ซึ่งสาร hybridization buffer ที่เตรียมได้จะมีปริมาตรรวมเท่ากับ 2 mL และเพียงพอสำหรับทำ hybridization 2 ตัวอย่าง

ตารางที่ 15 องค์ประกอบของสารละลาย hybridization buffer ที่ความเข้มข้น %FA ต่าง ๆ

FA (%)	FA ( $\mu\text{L}$ )	Milli-Q ( $\mu\text{L}$ )	5 M NaCl ( $\mu\text{L}$ )	1 M Tris/HCl ( $\mu\text{L}$ )	10% SDS ( $\mu\text{L}$ )
0	0	1600	360	40	2
5	100	1500	360	40	2
10	200	1400	360	40	2
15	300	1300	360	40	2
20	400	1200	360	40	2
25	500	1100	360	40	2
30	600	1000	360	40	2
35	700	900	360	40	2
40	800	800	360	40	2

45	900	700	360	40	2
50	1000	600	360	40	2
60	1200	400	360	40	2
65	1300	300	360	40	2
70	1400	200	360	40	2

เนื่องจากในงานวิจัยเลือกใช้ probe ในตารางที่ 14 ดังนั้นสาร hybridization buffer ที่เลือกใช้จึงมีความจำเพาะกับ %FA ที่ 20 และ 35 ตามลำดับ

3.2.3.6 เมื่อเตรียม hybridization buffer แล้ว ขั้นตอนต่อไปจะเริ่มขั้นตอนของการ hybridization ระหว่างตัวอย่าง (3.2.3.2) กับ working probe solution ที่ต้องการศึกษา (3.2.3.4) โดยมีขั้นตอนต่อไปนี้

3.2.3.6.1 เตรียม corning tube (หลอด centrifuge ที่ผ่านการ Sterile) หลอด ปริมาตร 50 mL จากนั้นใส่กระดาษกรอง (filter paper) หรือกระดาษทิชชู่ลงตามแนวยาว ของหลอด

3.2.3.6.2 คำนวณปริมาตรของ probe และ hybridization buffer ที่ต้องการใช้ใน แต่ละตัวอย่าง ในอัตราส่วน 1:8 (probe: hybridization buffer) เพื่อให้มีปริมาตรที่ เพียงพอสำหรับการ hybridization

เช่น ถ้าตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง จะต้องปิเปตแบ่ง hybridization buffer จากหลอด ปริมาตร 2 mL ใส่หลอดทดลองเล็ก ๆ หลอดละ 8  $\mu$ L จำนวน 2 หลอดก่อน (ปริมาตรรวม 16  $\mu$ L) แล้วจึงค่อยปิเปต probe ปริมาตร 1  $\mu$ L ใส่ตามที่หลังผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตอย่าง ช้า ๆ (ในกรณีที่ต้องใส่ competitor probe ก็ใส่ในขั้นตอนนี้)

3.2.3.6.3 หลังจากนั้นปิเปตสารละลาย hybridization buffer ปริมาตรที่เหลืออยู่ ลงบนกระดาษทิชชู่ที่เตรียมไว้ ปิดฝาหลอดให้สนิทแล้วนำหลอดดังกล่าวเข้า hybridization oven ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีจนกระทั่งเข้าสู่สภาวะสมดุล ถือเป็น pre-incubated tube เพื่อให้ hybridization buffer พร้อมใช้งาน

3.2.3.6.4 เมื่อครบเวลา pre-incubated tube ให้นำหลอดเล็ก ๆ ที่เตรียมไว้ (3.2.3.6.2) ปิเปตใส่ในแต่ละตัวอย่างบนแผ่นสไลด์หลุม ในกรณีที่ทำ hybridization มากกว่า 1 probe ทำเริ่มที่ probe ที่มี %FA สูงกว่าก่อน

3.2.3.6.5 นำแผ่นสไลด์ใส่ pre-incubated tube ที่เตรียมไว้แล้วเข้า hybridization oven ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส อีกครั้ง ซึ่งระยะเวลาของการ hybridization จะใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง

3.2.3.7 ระหว่างรอการ hybridization สามารถเตรียมสารละลาย washing buffer ได้ตามขั้นตอนดังนี้

3.2.3.7.1 เตรียม corning tube (หลอด centrifuge ที่ผ่านการ Sterile) หลอดปริมาตร 50 mL แล้วปิเปตสารละลาย washing buffer ซึ่ง %FA ของสารละลาย washing buffer (แสดงในตารางที่ 16) จะต้องสอดคล้องกับ %FA ของสารละลาย hybridization buffer (แสดงในตารางที่ 15)

3.2.3.7.2 นำ corning tube ที่เตรียมใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เพื่อเป็น Pre-heat washing buffer

3.2.3.7.3 เตรียมน้ำ dH<sub>2</sub>O ที่กรองแล้ว แช่เย็นไว้สำหรับล้างสาร washing

3.2.3.8 เมื่อเสร็จขั้นตอนของการ hybridization ต่อมาจะเป็นขั้นตอนของการ washing ซึ่งเป็นการล้าง probe ส่วนที่ไม่ได้เข้าจับกับ 16S rRNA ออกจากตัวอย่างบนสไลด์

3.2.3.8.1 หลังครบระยะเวลาแล้วให้นำ corning tube ออกจาก water bath แล้วค่อย ๆ ปิเปต washing buffer ที่อุ่นไว้ปริมาตรประมาณ 1 mL ล้างสารละลาย hybridization buffer บนแผ่นสไลด์

3.2.3.8.2 ก่อนจะนำแผ่นสไลด์ดังกล่าวไปจุ่มใน corning tube ที่อุ่น washing buffer ไว้ แล้วนำ corning tube ที่มีแผ่นสไลด์เข้าไปใน water bath ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.3.8.3 เมื่อครบเวลา 15 นาที นำ corning tube ออกจาก water bath แล้วจึงค่อย ๆ นำแผ่นสไลด์ออกมาล้างด้วยน้ำ dH<sub>2</sub>O ที่แช่เย็นไว้ (3.2.3.7.3) และรอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 16 องค์ประกอบของสารละลาย washing buffer ที่สอดคล้องกับ %FA ของสารละลาย hybridization buffer ที่ความเข้มข้น %FA ต่าง ๆ

FA (%)	1 M Tris/HCl pH 8.0 (μL)	10% SDS (μL)	5 M NaCl (μL)	0.5 M EDTA (μL)
0	1000	50	9000	0
5	1000	50	6300	0
10	1000	50	4500	0
15	1000	50	3180	0
20	1000	50	2150	500
25	1000	50	1490	500
30	1000	50	1020	500
35	1000	50	700	500
40	1000	50	460	500
45	1000	50	300	500
50	1000	50	180	500
55	1000	50	100	500

3.2.3.9 หลังจากนั้นย้อมสีฟิเอชเอด้วย Nile blue A (post-stain) (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท sigma) ในเซลล์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมฟิเอชเอได้ ดังขั้นตอนต่อไปนี้ (Johnson และคณะ, (2009))

3.2.3.9.1 เตรียมสารละลาย 1% (wt/vol) Nile blue A ใน coming tube (หลอด centrifuge ที่ผ่านการ Sterile) หลอดปริมาตร 50 mL

3.2.3.9.2 นำ coming tube เข้า oven ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการ pre-heat

3.2.3.9.3 เมื่อสารละลาย Nile blue A เริ่มอุ่น ให้นำแผ่นสไลด์ดังกล่าวจุ่มใน coming tube โดยให้สารละลายท่วมแผ่นสไลด์ แล้วจึงนำ coming tube เข้า oven ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.3.9.4 เมื่อครบเวลาให้นำ coming tube ออกจาก oven แล้วดึงสไลด์ออกจาก coming tube จากนั้นล้างสารละลาย Nile blue A ออกด้วยการจุ่มแผ่นสไลด์ในสารละลายกรดอะซิติก 8% (vol/vol) เป็นเวลา 1 นาที



3.2.3.9.5 หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำ  $\text{dH}_2\text{O}$  อีกครั้งแล้วฝังแผ่นสไลด์ให้แห้ง

3.2.3.10 ทำการย้อมสีด้วย DAPI เพื่อดูกลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระบบ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (<http://botanika.biologija.org/exp/protocols/DAPI-staining-protocol.pdf>)

3.2.3.10.1 เตรียมสารละลาย DAPI ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  แล้วเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ป้องกันการสลายตัว)

3.2.3.10.2 เมื่อต้องการใช้ให้ปีเปตสารละลาย DAPI ปริมาตรประมาณ 8  $\mu\text{L}$  ลงบนสไลด์ตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

3.2.3.10.3 เมื่อครบเวลาแล้วนำสไลด์ออกมา แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนทั่วแผ่นสไลด์ แล้วรอให้แห้ง

3.2.3.11 หลังจากนั้นเตรียมแผ่นสไลด์ สำหรับส่องภายใต้กล้องแบบ fluorescence สามารถทำได้ตามขั้นตอนต่อไปนี้

3.2.3.11.1 หยดสารละลาย Slow-fade ลงบนสไลด์จนทั่ว

3.2.3.11.2 ปิดด้วยแผ่น cover slide และกด cover slide จากตรงกลางออกไปด้านข้างเพื่อให้สารกระจายออกและไล่อากาศ

3.2.3.11.3 ทำการเคลื่อน cover slide ด้วยนายนาทาเล็บเพื่อป้องกันไม่ให้ cover slide เคลื่อนหลุดออกจากแผ่นสไลด์

3.2.3.11.4 นำไปส่องภายใต้กล้องบันทึกภาพเซลล์ระบบ confocal (Fluoview FV10i Olympus) เพื่อดูการซ้อนทับกันของแสง fluorescence ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการวิเคราะห์ผลการซ้อนทับของแสงสีต่าง ๆ ที่ได้ โดย probe ที่ศึกษาและสารย้อมสีจะให้แสง fluorescence ที่ต่างกันเนื่องจากความยาวคลื่นที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 17 โดย probe ที่ศึกษาจะให้แสงสีแดง สาร Nile Blue A จะให้แสงสีเหลืองและ DAPI จะให้แสงสีน้ำเงิน ตามลำดับ

ผลการซ้อนทับกันของแสง fluorescence สีแดงและสีน้ำเงินในบริเวณเดียวกันแสดงให้เห็นและยืนยันว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ศึกษาเป็นกลุ่มของแบคทีเรียหรืออาร์เคีย ยิ่งไปกว่านั้นถ้าพบแสงสีแดงแสงสีน้ำเงินและแสงสีเหลืองในบริเวณเดียวกันจะยืนยันได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ศึกษามีความสามารถใน

การผลิตพีเอชเอ ในทางกลับกันถ้าแสงสีแดงและแสงสีเหลืองไม่ได้ซ้อนทับกันแสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ศึกษาไม่สามารถผลิตพีเอชเอได้

จากนั้นวิเคราะห์ความหนาแน่นของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยสุ่มภาพตัวอย่างจำนวน 20 ภาพต่อ 1 กลุ่มจุลินทรีย์ที่ศึกษา ทำการนับเซลล์ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด รวมไปถึงทำการนับจำนวนพีเอชเอที่จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มสามารถผลิตได้เทียบกับจำนวนพีเอชเอทั้งหมดที่พบ คำนวณและแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ซึ่งจากขั้นตอนดังกล่าวมาทั้งหมดจะสามารถระบุกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้

ตารางที่ 17 การติดสี fluorescence ของ probe และสารย้อมสี

กลุ่มจุลินทรีย์ที่ศึกษา	Probe	สารย้อมสี	ความยาวคลื่น (nm)		แสง fluorescence
			Ex	Em	
Alphaproteobacteria	ALF1b		547	567	สีแดง
Alphaproteobacteria	ALF968		547	567	สีแดง
Betaproteobacteria	BET42a		547	567	สีแดง
Gammaproteobacteria	GAM42a		547	567	สีแดง
		Nile Blue A	631	647	สีเหลือง
		DAPI	359	461	สีน้ำเงิน

\*Ex คือ Excited state, Em คือ Emission state

### 3.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 3.3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1.1 ถังแก้วใสรูปทรงสี่เหลี่ยม ขนาดกว้าง 0.3 เมตร ยาว 0.3 เมตร สูง 0.3 เซนติเมตร

3.3.1.2 บั้มเติมอากาศและสายยางสำหรับเติมอากาศ

3.3.1.3 หัวทรายกระจายอากาศ

3.3.1.4 กระดาษกรอง GF/C ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร

3.3.1.5 อุปกรณ์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ เช่น ไมโครปิเปต ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ หลอด

ทดลองสำหรับวิเคราะห์ซีไอดี บีเวอร์ต เป็นต้น

3.3.1.6 ชุดกรองแบบกรวยบูชเนอร์

3.3.1.7 กรวยอิมฮอฟฟ์ (Imhoff cone)

3.3.1.8 เครื่องควบคุมค่า pH (pH controller) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 M

3.3.1.9 เครื่องวัดค่าการละลายออกซิเจน (DO meter)

3.3.1.10 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3.1.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.1.12 เครื่อง Gas chromatography (GC)

3.3.1.13 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส

3.3.1.14 เตาเผา 550 องศาเซลเซียส

3.3.1.15 ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.1.16 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing (MiSeq, Illumina)

3.3.1.17 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH



### 3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 3.3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์

- 3.3.2.1.1 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate;  $\text{CH}_3\text{COONa}$ )
- 3.3.2.1.2 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassiumdihydrogenphosphate;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 3.3.2.1.3 แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )
- 3.3.2.1.4 ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (Dipotassium phosphate;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- 3.3.2.1.5 แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate;  $\text{MgSO}_4$ )
- 3.3.2.1.6 เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride;  $\text{FeCl}_3$ )
- 3.3.2.1.7 กรดบอริก (Boric acid;  $\text{HBO}_3$ )
- 3.3.2.1.8 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.3.2.1.9 แมงกานีสคลอไรด์ (Magnesium chloride;  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.3.2.1.10 โซเดียมโมลิบเดต (Sodium molybdate;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.3.2.1.11 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride;  $\text{CaCl}_2$ )
- 3.3.2.1.12 ซิงค์ซัลเฟต (Zinc sulfate;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.3.2.1.13 โคบอลท์คลอไรด์ (Cobalt chloride;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.3.2.1.14 นิกเกิลคลอไรด์ (Nickel chloride;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.3.2.1.15 ไทโอยูเรีย (Thiourea;  $\text{H}_2\text{NCSNH}_2$ )
- 3.3.2.1.16 โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate;  $\text{NaHCO}_3$ )

#### 3.3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ซีโอดี

- 3.3.2.2.1 โพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium Dichromate;  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )
- 3.3.2.2.2 เมอร์คิวริกซัลเฟต (Mercuric sulfate;  $\text{HgSO}_4$ )
- 3.3.2.2.3 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Concentrated sulfuric acid; conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- 3.3.2.2.4 ซิลเวอร์ซัลเฟต (Silver sulfate;  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ )
- 3.3.2.2.5 เฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulfate;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.3.2.2.6 1,10-ฟีแนนทโรรีนโมโนไฮเดรต (1,10-phenanthroline monohydrate;  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

### 3.3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing (MiSeq, Illumina)

3.3.2.3.1 น้ำปราศจากดีเอ็นเอสำหรับทำ PCR

3.3.2.3.2 10X Taq Buffer

3.3.2.3.3 dNTP

3.3.2.3.4 MgCl<sub>2</sub> (10 mM ; Vivantis )

3.3.2.3.5 Taq DNA Polymerase

3.3.2.3.6 Forward primer 515F

3.3.2.3.7 Reverse primer 806R

3.3.2.3.8 DNA Binding Buffer (Buffer DB)

3.3.2.3.9 Wash Buffer

3.3.2.3.10 Elution Buffer

### 3.3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH การย้อมสีฟิเอชเอและย้อมสี

#### DAPI

3.3.2.4.1 3X Phosphate buffered saline (PBS) เตรียมได้จาก 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ผสมกับ 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> จน pH 7.4 จากนั้นแบ่งสารละลาย 300 ml แล้วเติม NaCl 22.8 g แล้วปรับปริมาตร 1000 mL นำเข้า Autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2.4.2 4% paraformaldehyde (PFA)

3.3.2.4.3 100% เอทานอล

3.3.2.4.4 0.9 M NaCl

3.3.2.4.5 20 mM Tris-HCl

3.3.2.4.6 0.01% sodium dodecyl sulfates (SDS)

3.3.2.4.7 Formamide (FA)

3.3.2.4.8 4.5 M NaCl

3.3.2.4.9 1 M Tris-HCl (pH 7.4)

3.3.2.4.10 1% solution dodecyl sulfates (SDS)

3.3.2.4.11 0.5 M EDTA

3.3.2.4.12 1% (wt/vol) Nile blue A

3.3.2.4.13 กรดอะซิติก 8% (vol/vol)

3.3.2.4.14 Slow-fade

3.3.2.4.15 1000X DAPI stock (ละลาย DAPI 0.2 mg ในน้ำกลั่น 1 mL)



## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมฟิเอชเอในระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลักับขาดแคลนโดยใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งผลการวิจัยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ดังนี้

- 1) การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฟิเอชเอในถังปฏิกรณ์
- 2) กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing
- 3) การวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฟิเอชเอในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอและการย้อมสี DAPI
- 4) การคาดการณ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฟิเอชเอได้ในระดับลึกกว่าคลาสใน Proteobacteria

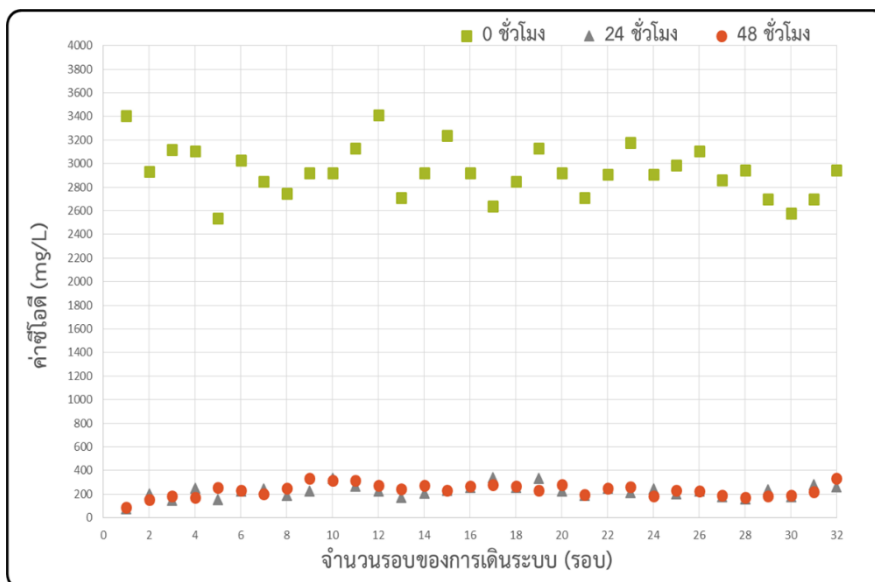
#### 4.1 การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฟิเอชเอในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท

เมื่อเดินระบบด้วยตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตเครื่องดื่มน้ำผักและผลไม้ภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลักับขาดแคลน โดยทำการเติมอากาศตลอดเวลา และควบคุมค่าอายุตะกอน (SRT) ที่ 10 วัน และระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) ที่ 2 วัน ผลการเดินระบบถังปฏิกรณ์และการสะสมฟิเอชเอภายในระบบเป็นดังนี้

##### 4.1.1 การเดินระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลักับขาดแคลน

จากการเดินระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลักับขาดแคลน ผลความเข้มข้นของสารอินทรีย์ ความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ ค่าฟิเอช ค่าออกซิเจนละลาย อุณหภูมิ และความสามารถในการตกตะกอนในระบบ เป็นดังต่อไปนี้

#### 4.1.1.1 ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในระบบ (COD)

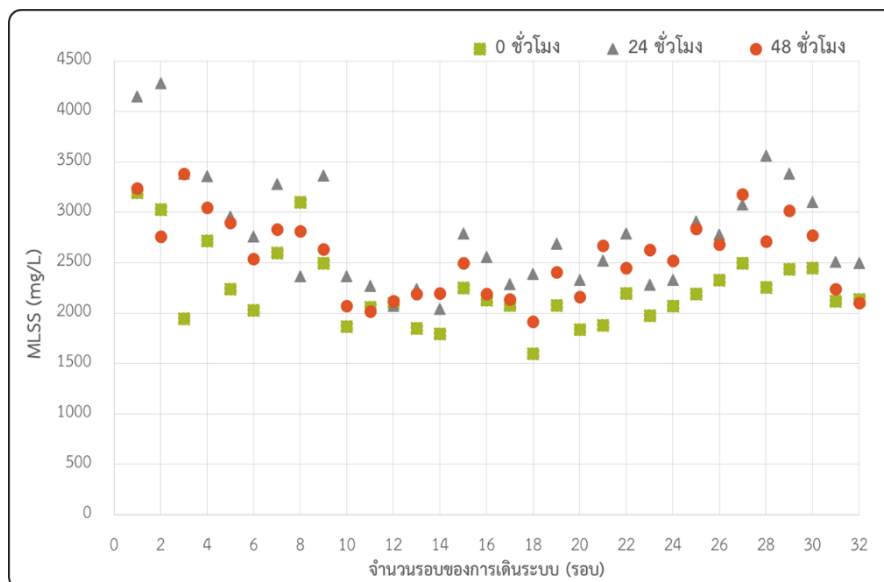


ภาพที่ 28 ความเข้มข้นซีโอดีเมื่อเริ่มต้น (0 ชม.) กึ่งกลาง (24 ชม.) และท้ายรอบ (48 ชม.) ของทุกรอบการเดินระบบ

ภาพที่ 28 แสดงค่าซีโอดีเมื่อเริ่มต้น กึ่งกลาง และท้ายรอบของทุกรอบการเดินระบบ จากผลการทดลอง ความเข้มข้นซีโอดีขาเข้าของระบบตั้งแต่รอบที่ 1-32 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $2,930.3 \pm 202.5$  mgCOD/L ภายหลังจากเดินระบบได้ 24 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งทำให้ค่าความเข้มข้นซีโอดีลดลงเหลือ  $235.4 \pm 55.8$  mgCOD/L คิดเป็นประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียเฉลี่ยประมาณ  $92 \pm 1.35$  เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเดินระบบครบระยะ 48 ชั่วโมงพบความเข้มข้นของซีโอดีมีค่า  $246.3 \pm 54.7$  mgCOD/L ซึ่งค่าซีโอดีดังกล่าวใกล้เคียงกับค่าซีโอดีในชั่วโมงที่ 24 จึงแสดงให้เห็นว่าภายหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้วนั้นการลดลงของสารอินทรีย์เกิดขึ้นน้อยมาก จึงกล่าวได้ว่าระบบเกิดสภาวะขาดแคลนอาหารในช่วงท้ายของทุกรอบการเดินระบบ ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าประสิทธิภาพในการบำบัดสารอินทรีย์นั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดการเดินระบบถึงปฏิบัติการ



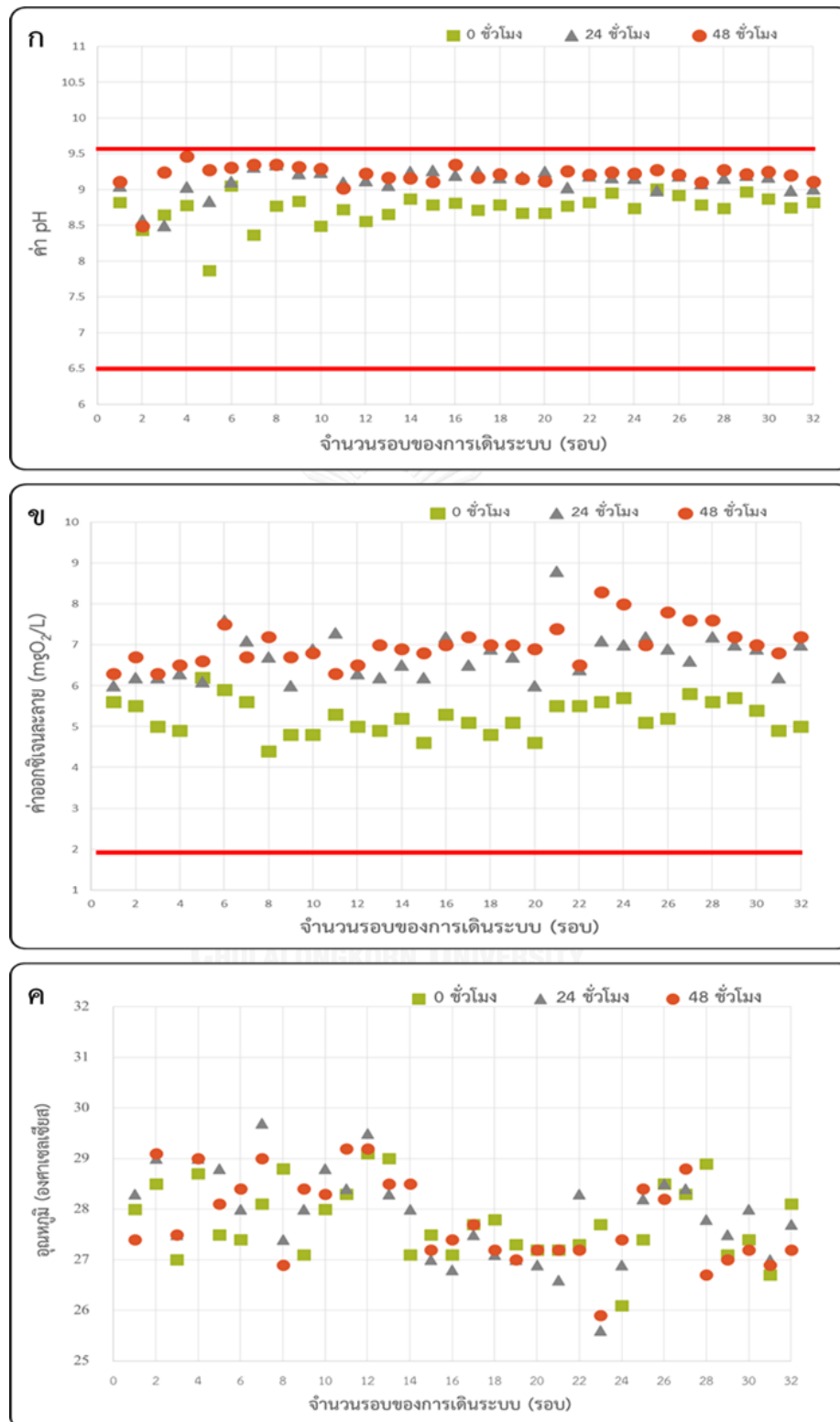
#### 4.1.1.2 ความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ (MLSS)



ภาพที่ 29 ความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ (MLSS) เมื่อเริ่มต้น (0 ชม.) กึ่งกลาง (24 ชม.) และท้ายรอบ (48 ชม.) ของทุกรอบการเดินระบบ

ความเข้มข้นของตะกอนจุลินทรีย์ (MLSS) (ภาพที่ 29) สามารถบ่งบอกถึงการเจริญเติบโตและการย่อยสลายตัวเองของจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลาในระบบ โดยงานวิจัยนี้เดินระบบด้วยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท็จส่งผลให้ค่า MLSS มีการเปลี่ยนแปลงไปตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอินทรีย์ในระบบ จากภาพที่ 29 ในระยะเริ่มต้นของการเดินระบบ (0 ชม.) ในแต่ละรอบพบว่าค่า MLSS มีค่าเฉลี่ยที่  $2,237 \pm 377.8$  mg/L และหลังจากจุลินทรีย์ใช้สารอินทรีย์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำให้ MLSS มีค่าสูงขึ้นถึง  $2,802.5 \pm 564.5$  mg/L จากนั้นค่า MLSS ลดลงที่ท้ายรอบของการเดินระบบ (48 ชม.) ( $2,558.8 \pm 388.4$  mg/L) ซึ่งคาดว่าเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของจุลินทรีย์เมื่อเข้าสู่สภาวะขาดอาหาร จากผลความเข้มข้นของซีโอดีและ MLSS แสดงให้เห็นถึงการเกิดสภาวะขาดแคลนอาหารในช่วงท้ายของรอบการเดินระบบ ซึ่งเป็นสภาวะที่ตั้งใจใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอในระบบ

#### 4.1.1.3 ค่าพีเอช ค่าออกซิเจนละลาย อุณหภูมิ และค่า SV30



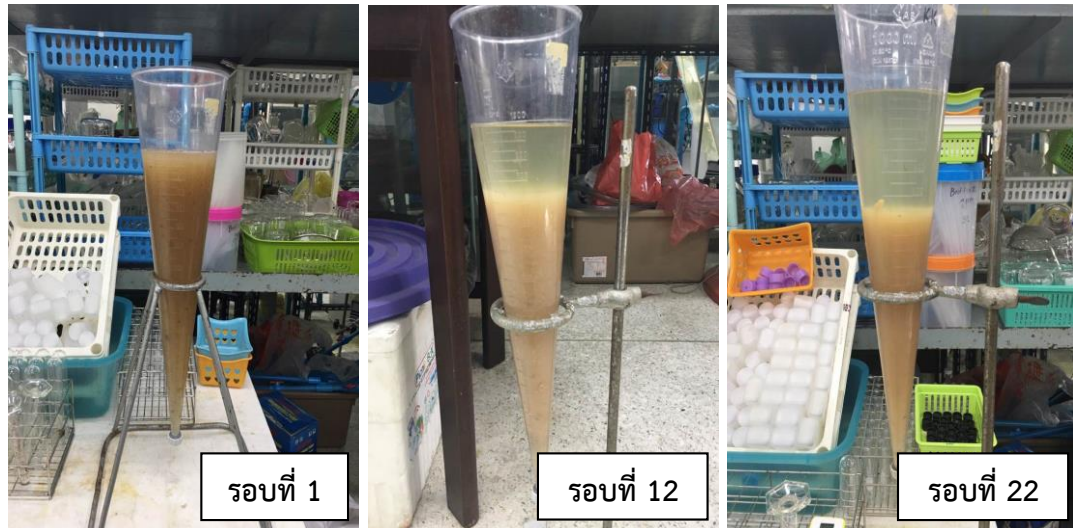
ภาพที่ 30 ค่าพีเอช (ก) ค่าออกซิเจนละลาย (ข) และ อุณหภูมิ (ค) ในทุกรอบของการเดินระบบ

จากภาพที่ 30ก พบว่าค่าพีเอช ค่าออกซิเจนละลายและอุณหภูมิมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ควบคุมไว้ โดยค่าพีเอชจะอยู่ในช่วง 7.7-9.5 ซึ่งใช้เครื่องควบคุมพีเอชอัตโนมัติด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 M โดยพบว่าที่หลังจากเริ่มต้นระบบ (0 ชม.) ค่าพีเอชเฉลี่ยอยู่ที่  $8.73 \pm 0.2$  ต่อมาเมื่อสารอินทรีย์หมดลงเมื่อเดินระบบได้ 24 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชสูงขึ้นกว่าเดิม ( $9.1 \pm 0.18$ ) และใกล้เคียงกับค่าพีเอชเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงหลังจากเติมน้ำเสียเข้าระบบ ( $9.2 \pm 0.16$ )

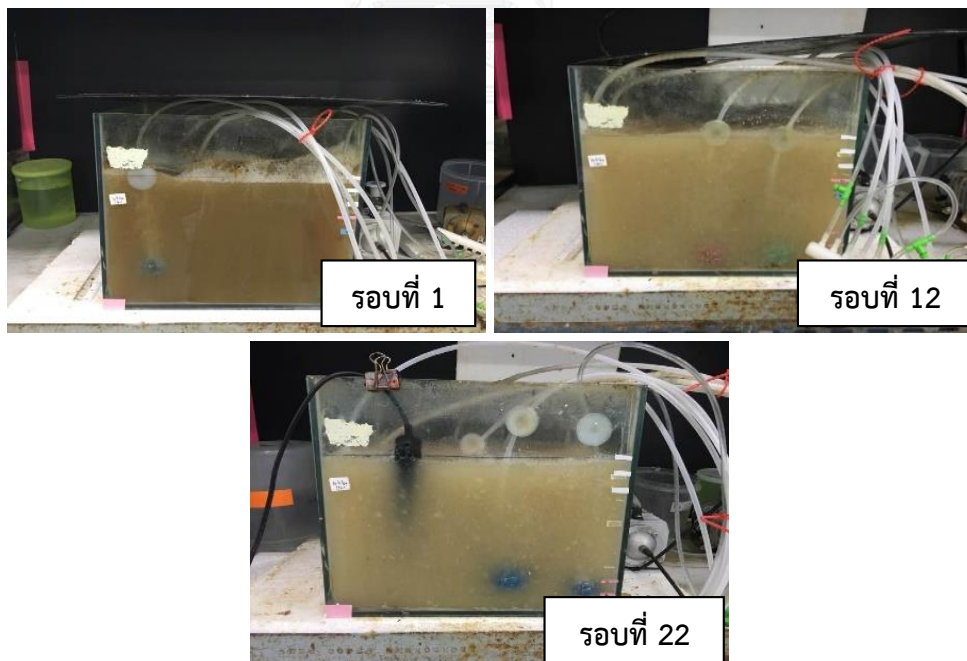
ค่าออกซิเจนละลายหรือค่าดีไอโอบ่งบอกถึงปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ จากภาพที่ 30ข พบว่าค่าดีไอลดต่ำลงในช่วงเริ่มต้น โดยมีค่าประมาณ  $5.4 \pm 0.4 \text{ mgO}_2/\text{L}$  เนื่องจากในช่วงแรก จุลินทรีย์ต้องการใช้ออกซิเจนปริมาณมากในการย่อยสารอินทรีย์ที่เติมเข้าสู่ระบบ หลังจากสารอินทรีย์เริ่มหมดลงปริมาณออกซิเจนในน้ำจึงเพิ่มสูงขึ้นเป็น  $6.7 \pm 0.6 \text{ mgO}_2/\text{L}$  เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับทำยรอบการเดินระบบเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงคือ  $7.0 \pm 0.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$  เนื่องจากการใช้สารอินทรีย์เกิดขึ้นน้อยมากในช่วงทำยซึ่งอยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร จึงส่งผลให้ค่าออกซิเจนละลายค่อนข้างคงที่

ในส่วนของอุณหภูมิจะแปรผันตามสภาพอากาศในแต่วัน งานวิจัยนี้เดินระบบโดยกำหนดอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 30ค) ซึ่งอุณหภูมิเมื่อเริ่มต้น กึ่งกลางและทำยรอบการเดินระบบนั้นมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน

นอกจากนี้เมื่อเริ่มเดินระบบ (รอบที่ 1) ในถังปฏิกรณ์พบว่าตะกอนจุลินทรีย์มีสีน้ำตาลเข้ม อีกทั้งทำการตรวจวัดค่า SV30 ในต้นรอบของการเดินระบบพบว่าค่า SV30 มีค่าเท่ากับ 1,000 mL/L กล่าวคือ จุลินทรีย์ในระบบไม่สามารถตกตะกอนได้ ต่อมาเมื่อเดินระบบครบ 12 รอบพบว่าตะกอนจุลินทรีย์เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลอ่อนและสามารถตกตะกอนได้โดยวัดค่า SV30 ได้ 650 mL/L ซึ่งจากรอบดังกล่าวเป็นรอบที่จุลินทรีย์สามารถผลิตพีเอชเอได้สูงที่สุดเทียบกับรอบอื่น ๆ ต่อมาเมื่อเดินระบบได้ 22 รอบ พบว่าจุลินทรีย์เปลี่ยนสีอีกครั้งและสามารถตกตะกอนได้ดีโดยวัดค่า SV30 ได้ 450 mL/L ซึ่งการตกตะกอนและสีของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ในรอบที่ 1 12 และ 22 แสดงในภาพที่ 31 และ 32 ตามลำดับ



ภาพที่ 31 การตกตะกอนของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ในรอบที่ 1 12 และ 22



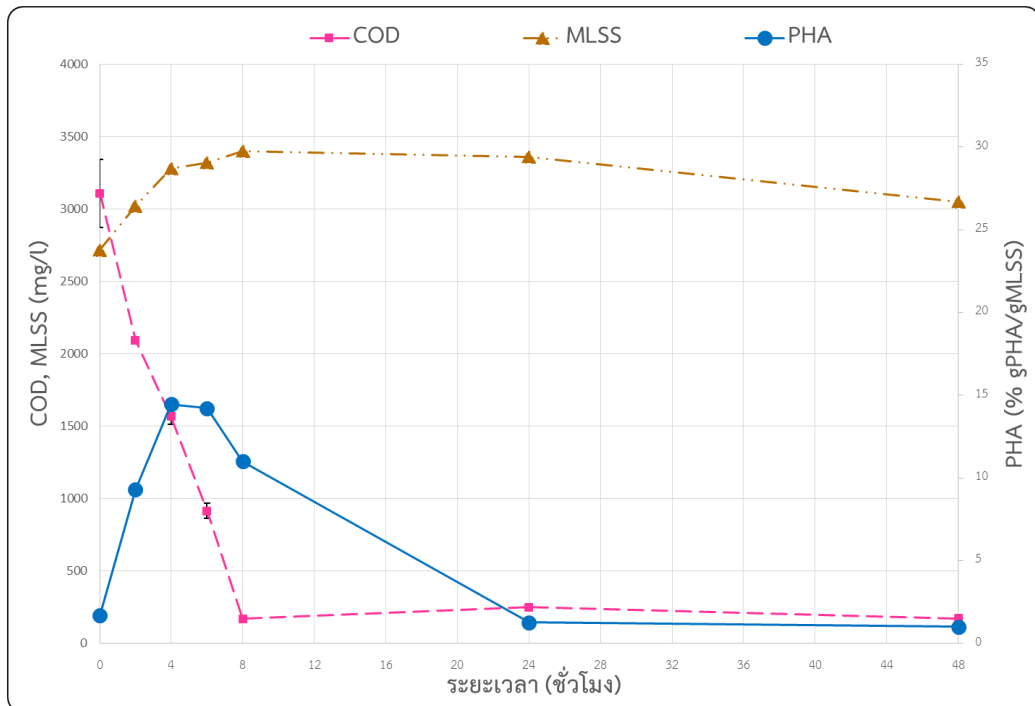
ภาพที่ 32 สีของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ในรอบที่ 1 12 และ 22

#### 4.1.2 การสะสมพีเอชเอในระหว่างรอบการเดินระบบ

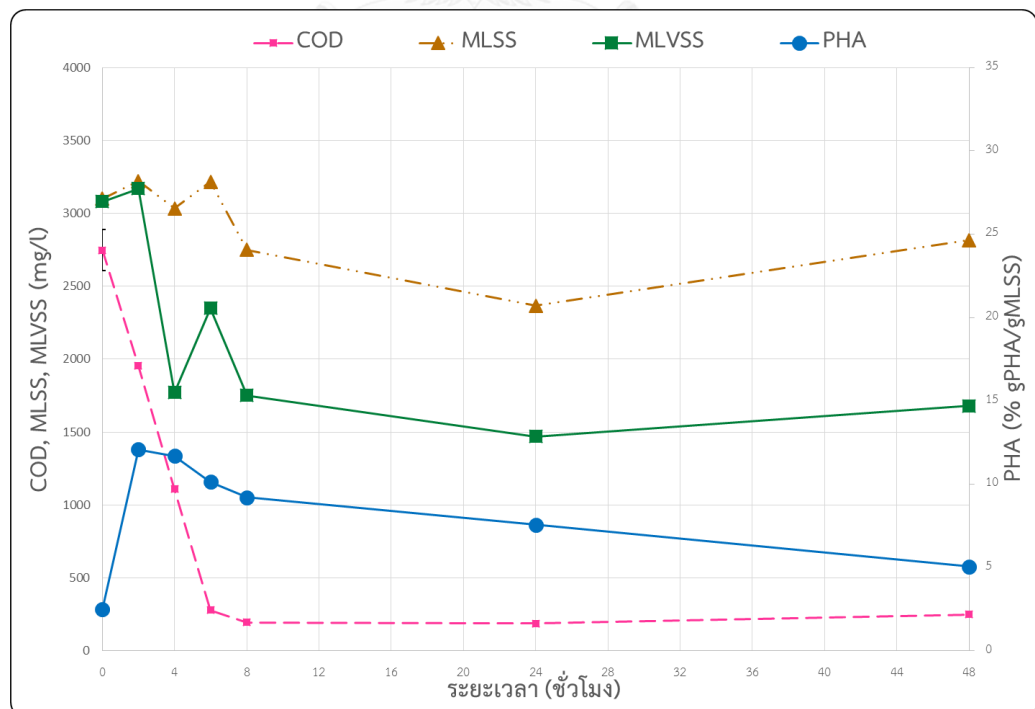
ผลการศึกษาปริมาณพีเอชเอที่จุลินทรีย์ผลิตและสะสมในระหว่างรอบการเดินระบบ ได้แก่ รอบการเดินระบบที่ 4 8 12 15 22 และ 25 แสดงในภาพที่ 33 ถึง ภาพที่ 38 ตามลำดับ

จากภาพที่ 33 ถึง ภาพที่ 38 พบว่าในทุก ๆ รอบของการเดินระบบ สารอินทรีย์มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมงแรก และหมดลงภายในระยะเวลา 4-8 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลานี้จึงถือเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอาหารเกินพอ (feast phase) และหลังจากนั้นจนถึงท้ายรอบการเดินระบบ (48 ชั่วโมง) จะถือได้ว่าจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะขาดแคลนอาหาร (famine phase) ซึ่งเป็นระยะเวลารวมทั้งสิ้นประมาณ 40-44 ชั่วโมง เมื่อคำนวณอัตราส่วน feast/famine (F/F) ในการเดินระบบจึงมีค่าอยู่ในช่วง 0.09-0.20 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชเอ จากงานวิจัยของ Johnson และคณะ, (2009) พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตพีเอชเอได้มากถึง 89% เมื่อเดินระบบด้วยอัตราส่วน F/F เท่ากับ 0.1 นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) พบว่าที่ค่า F/F อยู่ในช่วง 0.14-0.20 สามารถผลิตพีเอชเอได้เฉลี่ย 27.9 % โดยน้ำหนักแห้ง และในงานวิจัยของ Albuquerque และคณะ, (2010) พบว่าที่อัตราส่วน F/F ในช่วง 0.21-1.10 ทำให้จุลินทรีย์ในระบบสามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุด 74.6% โดยน้ำหนักแห้ง

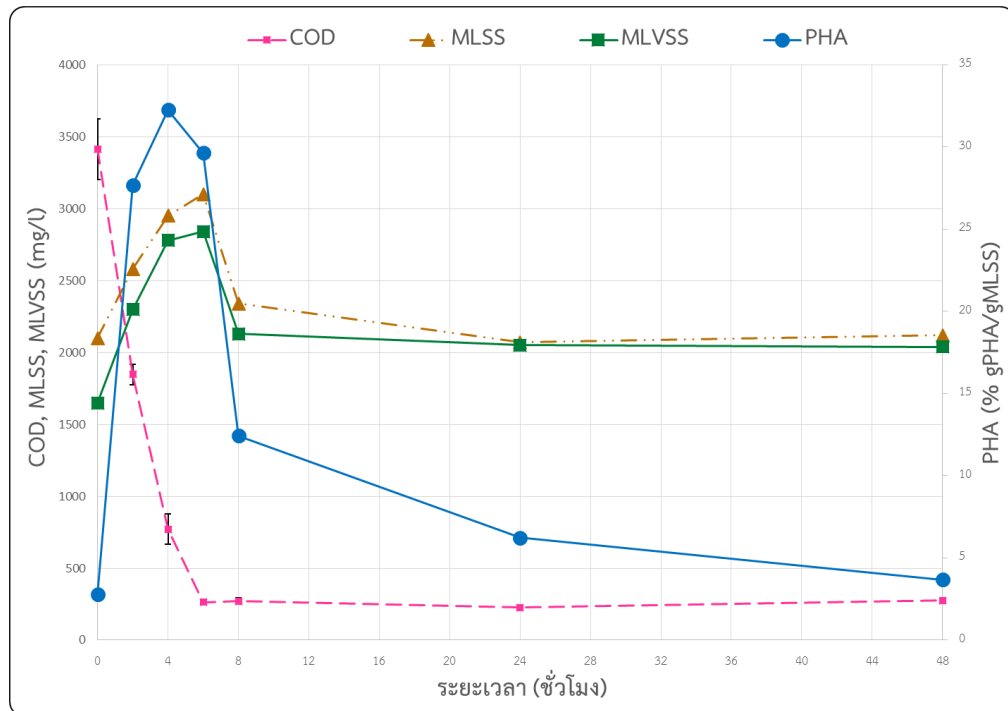
ในขณะที่ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์ (MLSS) จะเพิ่มขึ้นในช่วงระยะที่อาหารเกินพอ ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของค่าซีไอทีในช่วงดังกล่าว ทั้งนี้การสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมงนับจากการเริ่มต้นรอบการเดินระบบ ดังเช่นในรอบการเดินระบบที่ 4 12 และ 15 ซึ่งมีปริมาณพีเอชเอสูงสุดเป็น 14.4 32.3 และ 26.4 % gPHA/gMLSS ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในบางรอบของการเดินระบบพบว่าปริมาณการสะสมพีเอชเอเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 2 ชั่วโมง ดังเช่นในรอบการเดินระบบที่ 8 22 และ 25 มีปริมาณพีเอชเอสูงสุดที่ 12.1 22.4 และ 19.6 % gPHA/gMLSS ตามลำดับ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าแนวโน้มการลดลงของสารอินทรีย์นั้นสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่า MLSS และปริมาณพีเอชเอ จึงกล่าวได้ว่าสารอินทรีย์นั้นถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสร้างพีเอชเอในช่วงสภาวะที่อาหารเกินพอ คือ ในช่วง 4-8 ชั่วโมงแรกของรอบการเดินระบบ หลังจากที่สารอินทรีย์หมดลง ปริมาณตะกอนจุลินทรีย์และการสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์จะค่อย ๆ ลดปริมาณลงตามระยะเวลา คาดว่าเนื่องจากเมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะขาดแคลนอาหารจึงทำให้จุลินทรีย์เกิดการย่อยสลายตัวเอง และจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชเอได้จะใช้พีเอชเอแทนสารอินทรีย์ ด้วยเหตุนี้ปริมาณพีเอชเอจึงลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 48



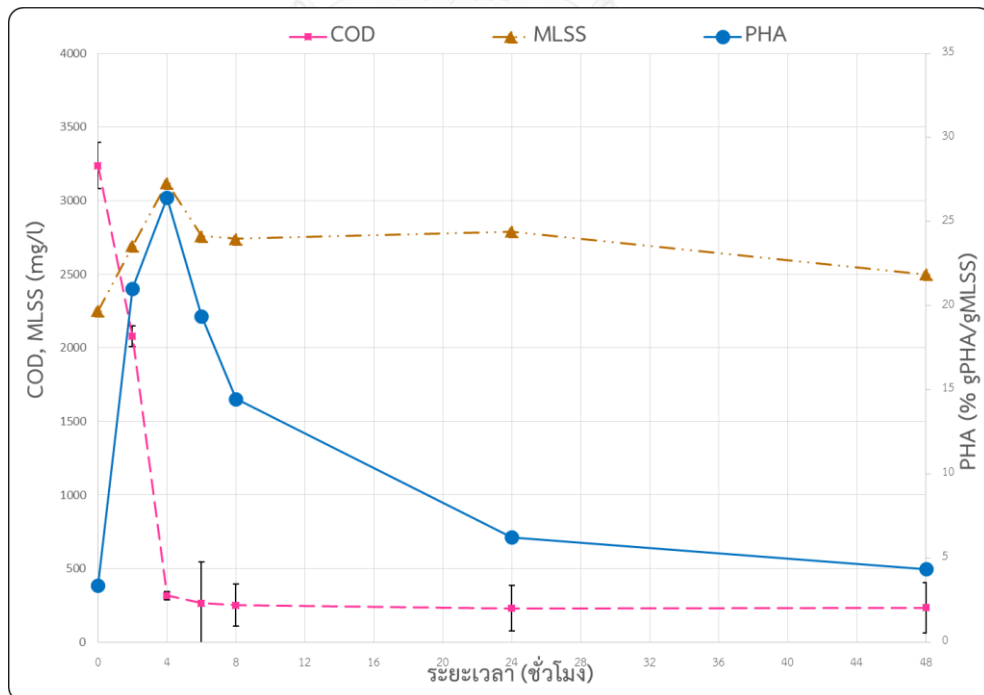
ภาพที่ 33 ความเข้มข้นซีโอดี MLSS และปริมาณฟิเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 4



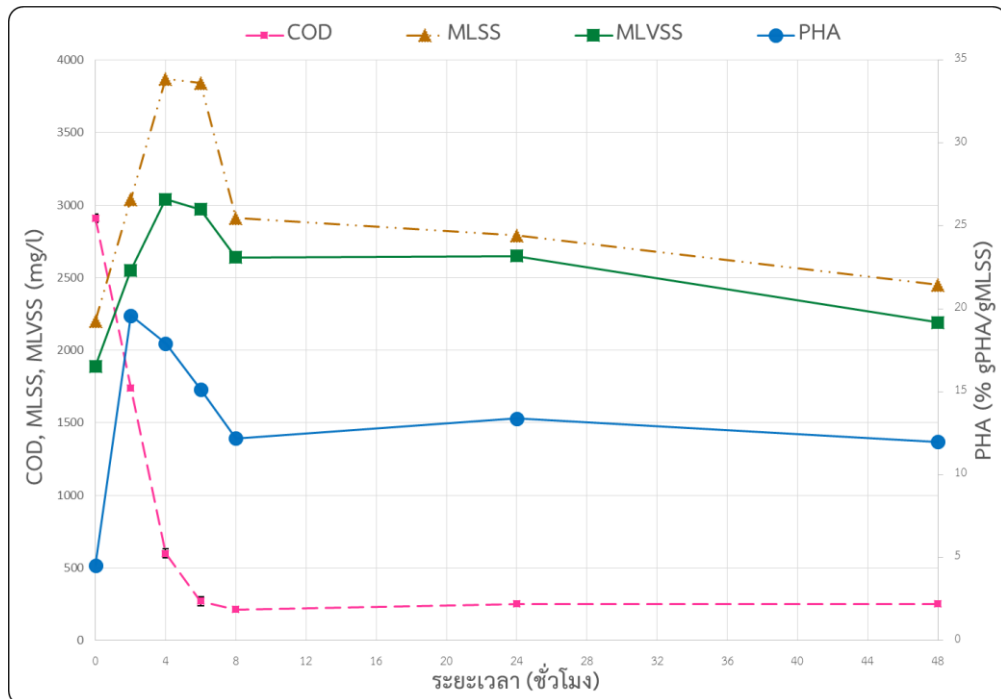
ภาพที่ 34 ความเข้มข้นซีโอดี MLSS MLVSS และปริมาณฟิเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 8



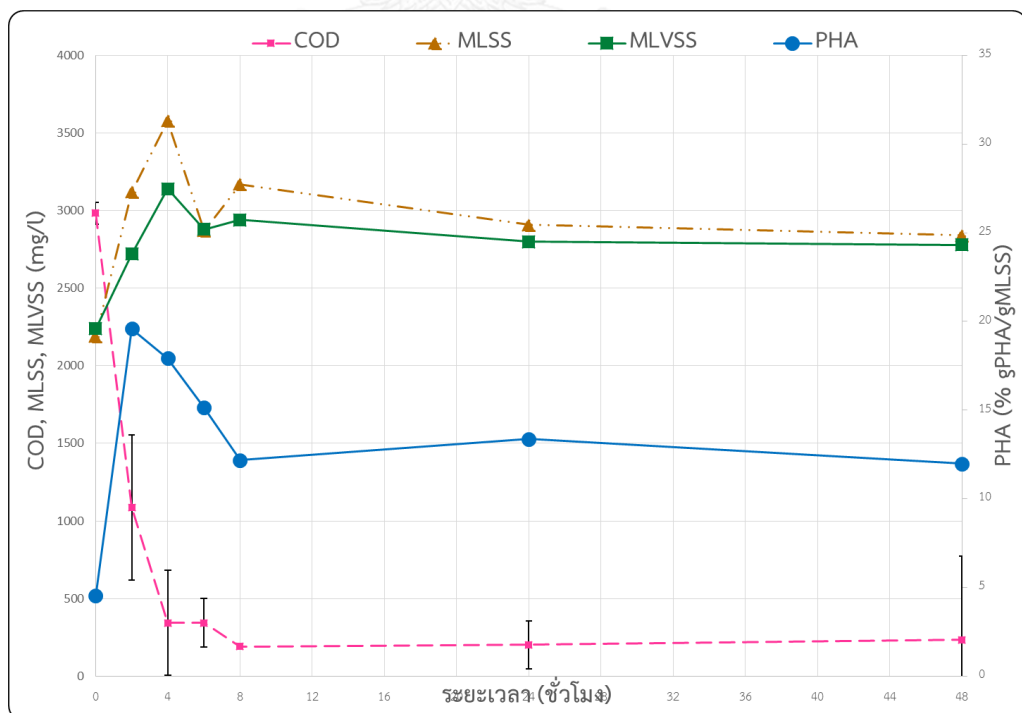
ภาพที่ 35 ความเข้มข้นซีไอดี MLSS MLVSS และปริมาณฟิเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 12



ภาพที่ 36 ความเข้มข้นซีไอดี MLSS และปริมาณฟิเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 15



ภาพที่ 37 ความเข้มข้นซีไออดี MLSS MLVSS และปริมาณฟิเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 22



ภาพที่ 38 ความเข้มข้นซีไออดี MLSS MLVSS และปริมาณฟิเอชเอในรอบการเดินระบบที่ 25



นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่า MLSS และค่า MLVSS ในช่วงแรกของการเดินระบบ (รอบที่ 8 ภาพที่ 34) พบว่าค่า MLSS และค่า MLVSS มีค่าต่างกันมาก หมายความว่าตะกอนจุลินทรีย์น่าจะยังมีชีวมวลเฉื่อยอยู่จำนวนมากซึ่งอาจจะส่งผลต่อการผลิตฟิเอชเอของจุลินทรีย์ ต่อมาเมื่อเดินระบบมาถึงรอบที่ 12 (ภาพที่ 35) พบว่าค่า MLSS และค่า MLVSS มีค่าใกล้เคียงกันซึ่งหมายความว่าสัดส่วนชีวมวลเฉื่อยนั้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับรอบการเดินระบบที่ 8

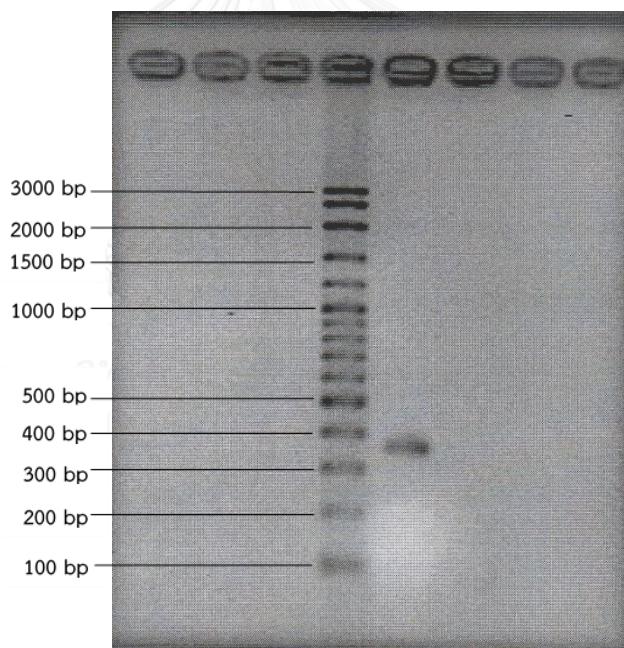
เมื่อเดินระบบด้วยถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตฟิเอชเอมาถึงรอบของการเดินระบบที่ 32 เครื่องควบคุมฟิเอชอัตโนมัติเกิดขัดข้องทำให้ปัมเติมกรดไฮโดรคลอริกจนค่าฟิเอชในถังปฏิกรณ์ลดลงเหลือ 2 จึงยุติการเดินระบบ

ถ้าเปรียบเทียบปริมาณฟิเอชเอในแต่ละรอบการเดินระบบตั้งแต่รอบที่ 1 ถึงรอบที่ 32 พบว่าในรอบที่ 12 เมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 35) พบปริมาณฟิเอชเอสูงที่สุด 32.3% gPHA/gMLSS (34.2% gPHA/gMLVSS) คิดเป็นสัดส่วนของเอซปีโมโนเมอร์ 100% ซึ่งตัวอย่างจุลินทรีย์ในรอบการเดินระบบนี้จะถูกนำไปวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing และวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตฟิเอชเอด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอด้วย Nile Blue A และการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI ต่อไป

#### 4.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing

ผลการทดลองส่วนนี้เป็นการนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุด (32.3% gPHA/gMLSS หรือ 34.2% gPHA/gMLVSS) จากการเดินระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะที่มีอาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน ซึ่งคือตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ในรอบการเดินระบบที่ 12 หลังจากผ่านไป 4 ชั่วโมง มาศึกษาในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในระบบโดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing

ตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V4 region ของ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ซึ่งครอบคลุมทั้งแบคทีเรียและอาร์เคีย แล้วส่งวิเคราะห์เพื่ออ่านลำดับเบสทั้งหมดด้วยระบบ MiSeq (Illumina) ซึ่งผลการทำ PCR ของตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างได้สายดีเอ็นเอซึ่งมีความยาวประมาณ 350 base pair (bp) แสดงดังภาพที่ 39



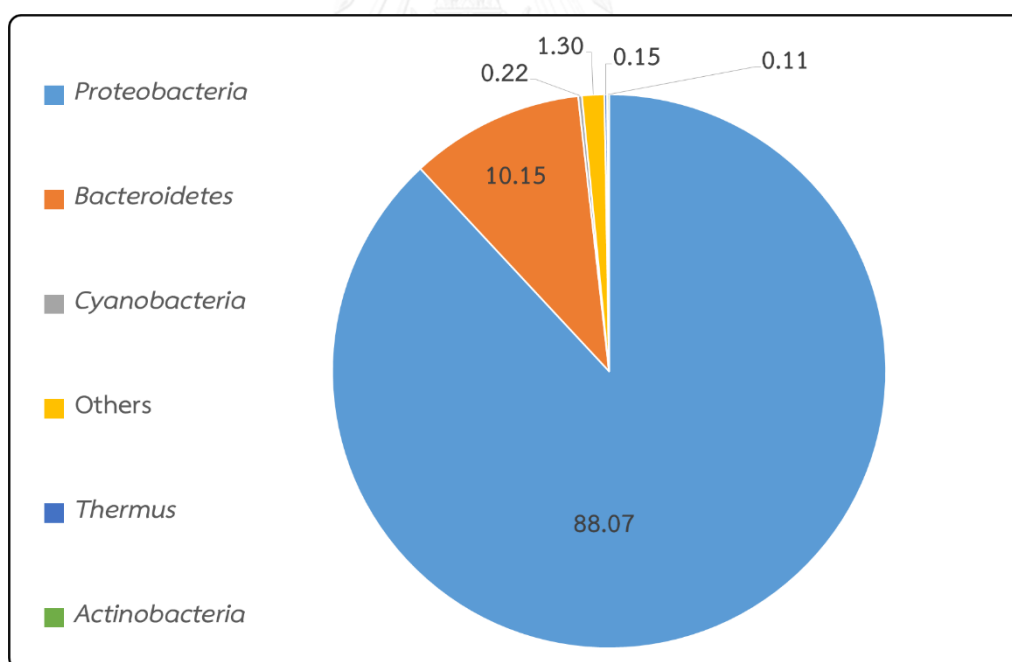
ภาพที่ 39 ผลการทำ PCR ของตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างที่สามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุด

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยระบบ MiSeq (Illumina) ให้ค่าลำดับเบสออกมาจำนวนทั้งสิ้น 229,177 reads โดยพบจุลินทรีย์อาณาจักรแบคทีเรียจำนวน 6 ไฟลัม ได้แก่ 1. *Proteobacteria* 2. *Bacteroidetes* 3. *Cyanobacteria* 4. *Thermus* 5. *Actinobacteria* และ 6. อื่น ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์จำนวนลำดับเบสในไฟลัมต่าง ๆ เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด ดังในตารางที่ 18 และ

ภาพที่ 40 และเมื่อจำแนกจุลินทรีย์ในอาณาจักรแบคทีเรียลงในระดับคลาสที่พบได้ผลแสดงดังในตารางที่ 19

ตารางที่ 18 จำนวนไฟลัม (เปอร์เซ็นต์) ที่พบในตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่าง

ไฟลัม	เปอร์เซ็นต์ (%)
1. <i>Proteobacteria</i>	88.07
2. <i>Bacteroidetes</i>	10.15
3. <i>Cyanobacteria</i>	0.22
4. <i>Thermus</i>	0.15
5. <i>Actinobacteria</i>	0.11
6. Others	1.30
รวม	100



ภาพที่ 40 เปอร์เซ็นต์จำนวนลำดับเบสในไฟลัมต่าง ๆ เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมดที่พบในตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์

ตารางที่ 19 แบคทีเรียในระดับไฟลัม คลาส ออร์เดอร์ แฟมิลี และจีนัส ที่พบในงานวิจัยนี้

ไฟลัม	คลาส	ออร์เดอร์	แฟมิลี	จีนัส					
1. <i>Proteobacteria</i> (88.07%)	1. <i>Betaproteobacteria</i> (51.37%)	<i>Rhodocyclales</i> (51.07%)	<i>Rhodocyclaceae</i> (51.07%)	<i>Thauera</i> (48.88%)					
				Unclassified (1.77%)					
				Others (0.42%)					
	2. <i>Gamma</i> proteobacteria (23.44%)	<i>Burkholderiales</i> (20.14%)	<i>Alteromonadales</i> (20.14%)	<i>Comamonadaceae</i> (0.30%)	Unclassified (0.30%)				
					<i>Xanthomonadales</i> (3.30%)	<i>Xanthomonadaceae</i> (3.30%)	<i>Aquimonas</i> (1.77%)		
							<i>Luteimonas</i> (0.78%)		
	3. <i>Alphaproteobacteria</i> (13.26%)	<i>Rhodobacterales</i> (10.12%)	<i>Rhodobacteraceae</i> (6.29%)	<i>Rhodobacteraceae</i> (6.29%)	Unclassified (0.75%)				
					Unclassified (4.55%)				
					<i>Rhodobacter</i> (1.32%)				
					<i>Rhodobaca</i> (0.25%)				
					<i>Amaricoccus</i> (0.16%)				
					<i>Hyphomonas</i> (3.84%)				
					<i>Caulobacterales</i> (2.21%)	<i>Rhizobiales</i> (0.65%)	<i>Sphingomonadales</i> (0.27%)	<i>Caulobacteraceae</i> (2.21%)	Unclassified (2.21%)
									<i>Hyphomicrobiaceae</i> (0.37%)
									<i>Phyllobacteriaceae</i> (0.28%)
			<i>Sphingomonadaceae</i> (0.27%)	<i>Sphingopyxis</i> (0.27%)					

ตารางที่ 19 แบคทีเรียในระดับไฟลัม คลาส ออร์เดอร์ แฟมิลี และจิ้นัส ที่พบในงานวิจัยนี้ (ต่อ)

ไฟลัม	คลาส	ออร์เดอร์	แฟมิลี	จิ้นัส
2. Bacteroidetes (10.15%)	Cytophagia (4.5%)	Cytophagales (4.5%)	Cyclobacteriaceae (4.5%)	Unclassified (4.5%)
	Flavobacteriia (5.65%)	Flavobacteriales (5.65%)	Cryomorphaceae (3.95%)	Unclassified (2.40%) Others (1.55%)
3. Cyanobacteria (0.22%)	Chloroplast (0.22%)	Chlorophyta (0.22%)	Flavobacteriaceae (1.70%)	Flavobacterium (1.70%)
4. Thermus (0.15%)	Deinococci (0.15%)	Deinococcales (0.15%)	Unclassified (0.22%)	Unclassified (0.22%)
5. Actinobacteria (0.11%)	Actinobacteria (0.11%)	Actinomycetales (0.11%)	Trueperaceae (0.15%)	B-42 (0.15%)
6. Others (1.30%)			Microbacteriaceae (0.11%)	Unclassified (0.11%)

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์จำนวนลำดับเบสในแฟมิลีและจิ้นัสที่พบใน Alphaproteobacteria Betaproteobacteria และ Gammaproteobacteria เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมดที่พบในตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์

ไฟลัม	คลาส	แฟมิลี* และจิ้นัส
Proteobacteria (88.07%)	Betaproteobacteria (51.37%)	1. Thaueria (48.88%)
	Gammaproteobacteria (23.44%)	2. Chromatiaceae* (20.14%)
		3. Hyphomonas (3.84%)
	Alphaproteobacteria (13.26%)	4. Caulobacteraceae* (2.21%)
		5. Aquimonas (1.77%)

จากตารางที่ 18 และตารางที่ 19 จะเห็นได้ว่าในตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างพบแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* เป็นหลักมากถึง 88.07 % ซึ่งในไฟลัมนี้พบแบคทีเรียใน 3 คลาส คือ *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* คิดเป็น 13.26 51.37 และ 23.44 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด ตามลำดับ แบคทีเรียใน 3 คลาสนี้ ถือว่ามีความสำคัญในการผลิตพีเอชเอเนื่องจากเคยมีรายงานว่าจุลินทรีย์บางกลุ่มในคลาสดังกล่าวมีความสามารถในการสะสมพีเอชเอโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม (Lemos และคณะ, (2008) Jiang และคณะ, (2011a) และ Oshiki และคณะ, (2013) เป็นต้น)

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการสะสมพีเอชเอของจุลินทรีย์ทั้ง 3 คลาสนี้ โดยใช้เทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอและย้อมจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI ดังจะกล่าวถึงโดยละเอียดในหัวข้อต่อไป ทั้งนี้แฟมิลีและจีแนสที่พบสูงสุด 5 อันดับแรกในแบคทีเรียทั้ง 3 คลาสดังกล่าวสรุปได้ในตารางที่ 20 ได้แก่ 1. แบคทีเรียในคลาส *Betaproteobacteria* พบประชากร *Thauera* spp. มากที่สุดถึง 48.88% จากจำนวนลำดับเบสทั้งหมด 2. แบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* พบแบคทีเรียในแฟมิลี *Chromatiaceae* (20.14%) 3. จีแนส *Hyphomonas* (3.84%) 4. แฟมิลี *Caulobacteraceae* (2.21%) และ 5. จีแนส *Aquimonas* (1.77%) ซึ่งในแบคทีเรีย 3 ลำดับหลังเป็นแบคทีเรียในคลาส *Alphaproteobacteria*

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทที่ใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ กับงานวิจัยที่ผ่านมาพบจุลินทรีย์หลากหลายกลุ่ม เช่น คลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ในไฟลัม *Proteobacteria* และไฟลัม *Bacteroidetes* เป็นต้น แสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ

อ้างอิง	เทคนิคทางชีวโมเลกุล	ไฟลัม	คลาส	แพมิลี* และจีนัส
Lemos และคณะ (2008)	RT-PCR FISH และ Nile Blue A	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Amaricoccus และ Paracoccus
			Betaproteobacteria	Azoarcus และ Thauera
Ciggin และคณะ (2011)	FISH และ DAPI	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Azoarcus และ Thauera
Jiang และคณะ (2011a)	DGGE FISH และ DAPI	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Plasticumulans acidivorans
			Betaproteobacteria	Zoogloea และ Simplicispira
Carvalho และคณะ (2013)	cDNA pyrosequencing	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acinetobacter และ Methylobacter
			Alphaproteobacteria	
Oshiki และคณะ (2013)	16S rRNA gene clone library FISH DAPI และ Nile Blue A	Proteobacteria	Alphaproteobacteria Betaproteobacteria	

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ (ต่อ)

อ้างอิง	เทคนิคทางชีวโมเลกุล	ไฟลัม	คลาส	แฟมิลี* และจิ้นัส
Worattinun และ Suwannasilp, (2017)	16S rRNA gene amplicon sequencing	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Hyphomonas</i> , <i>Nitratireductor</i> และ <i>Agrobacterium</i>
		<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> และ <i>Pseudoxanthomonas</i>
งานวิจัยนี้	16S rRNA gene amplicon sequencing	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Hyphomonas</i> <i>Caulobacteraceae*</i> และ <i>Aquimonas</i>
			<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Thauera</i>
			<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Chromatiaceae*</i>
		<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cytophagia</i>	<i>Cyclobacteriaceae*</i>
		<i>Cyanobacteria</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Cryomorpaceae*</i>
			<i>Chloroplast</i>	



#### 4.3 การวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฟิเอชเอในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอและการย้อมสี DAPI

การวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอด้วย Nile Blue A และย้อมจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI เป็นการศึกษาความสามารถในการผลิตฟิเอชเอของจุลินทรีย์โดยการนำตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ในรอบการเดินระบบที่มีปริมาณฟิเอชเอสูงที่สุด คือในรอบการเดินระบบที่ 12 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง

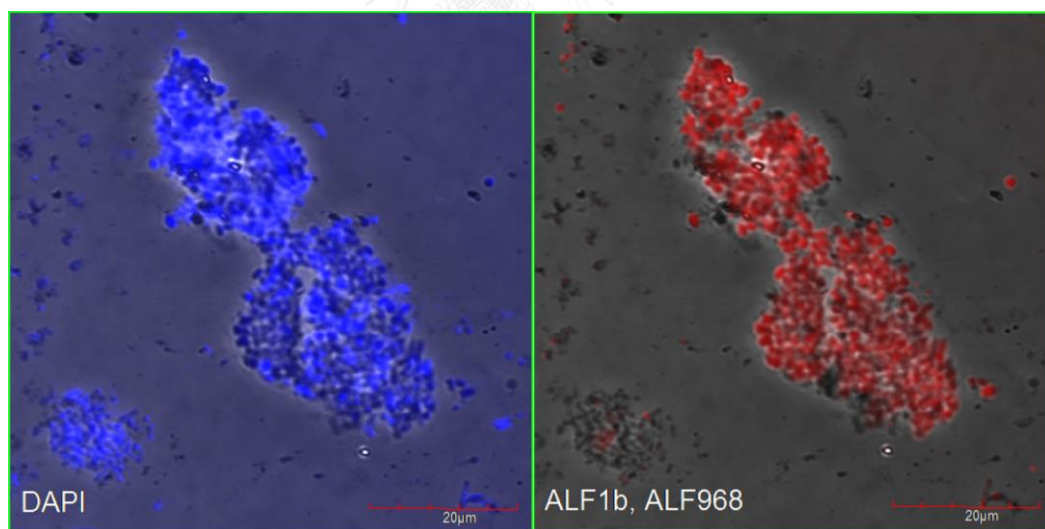
ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษากลุ่มแบคทีเรียจำนวน 3 คลาสในไฟลัม *Proteobacteria* คือ คลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักในสภาวะมีอากาศซึ่งเคยมีรายงานว่ามีความสามารถในการสะสมฟิเอชเอ (Lemos และคณะ, (2008) Jiang และคณะ, (2011a) และ Oshiki และคณะ, (2013)) ซึ่งจากการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing พบแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* เป็นกลุ่มหลักใน *Proteobacteria* คิดเป็น 13.26 51.37 และ 23.44 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมดตามลำดับ และไม่พบแบคทีเรียคลาสอื่นใน *Proteobacteria* ซึ่ง probe ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะมีดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายทั้ง 3 คลาสใน *Proteobacteria* ดังตารางที่ 22 ซึ่งจะแสดงผลด้วยแสง fluorescence

ตารางที่ 22 Probe ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย 3 คลาสใน *Proteobacteria* และสารย้อมสีต่าง ๆ

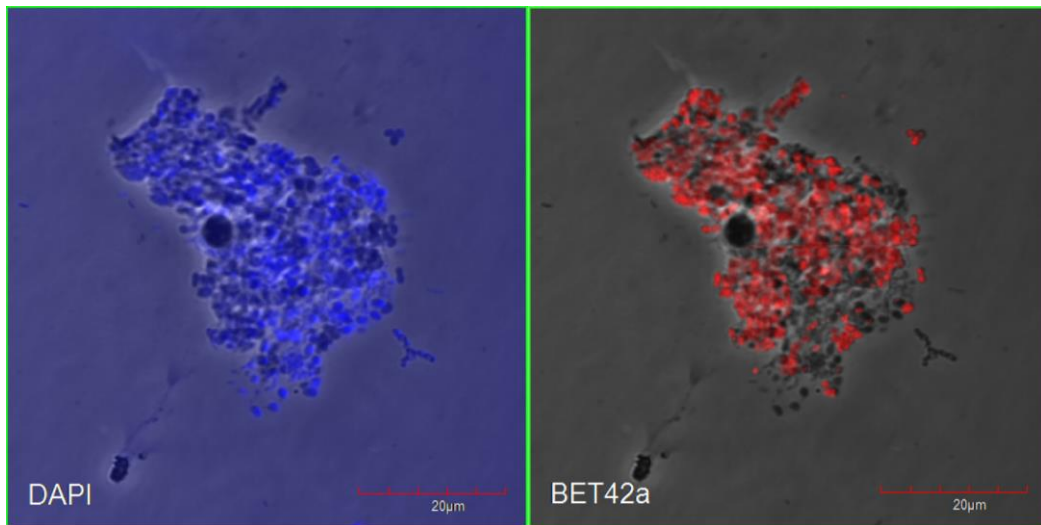
กลุ่มจุลินทรีย์ที่ศึกษา	Probe	สารย้อมสี	แสง fluorescence	อ้างอิง
<i>Alphaproteobacteria</i>	ALF1b		สีแดง	Manz และคณะ, (1992)
	ALF968		สีแดง	Neef, (1997)
<i>Betaproteobacteria</i>	BET42a		สีแดง	Manz และคณะ, (1992)
<i>Gammaproteobacteria</i>	GAM42a		สีแดง	Manz และคณะ, (1992)
		Nile Blue A	สีเหลือง	Jiang และคณะ, (2011a)
		DAPI	สีน้ำเงิน	

โดยงานวิจัยนี้กำหนดให้แบคทีเรียทั้ง 3 คลาสใน *Proteobacteria* แสดงแสง fluorescence สีแดงซึ่งในบริเวณที่ปรากฏแสงสีแดงในภาพถ่ายจะสื่อถึงแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการศึกษา อีกทั้งเมื่อย้อมสีพีเอชเอในแบคทีเรียทั้ง 3 คลาสด้วย Nile Blue A เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งพีเอชเอที่แบคทีเรียผลิตได้ในงานวิจัยซึ่งกำหนดให้ปรากฏเป็นแสง fluorescence สีเหลือง นอกจากนี้เพื่อยืนยันว่ากลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นกลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียจึงทำการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI ซึ่งจะแสดงแสง fluorescence สีน้ำเงิน

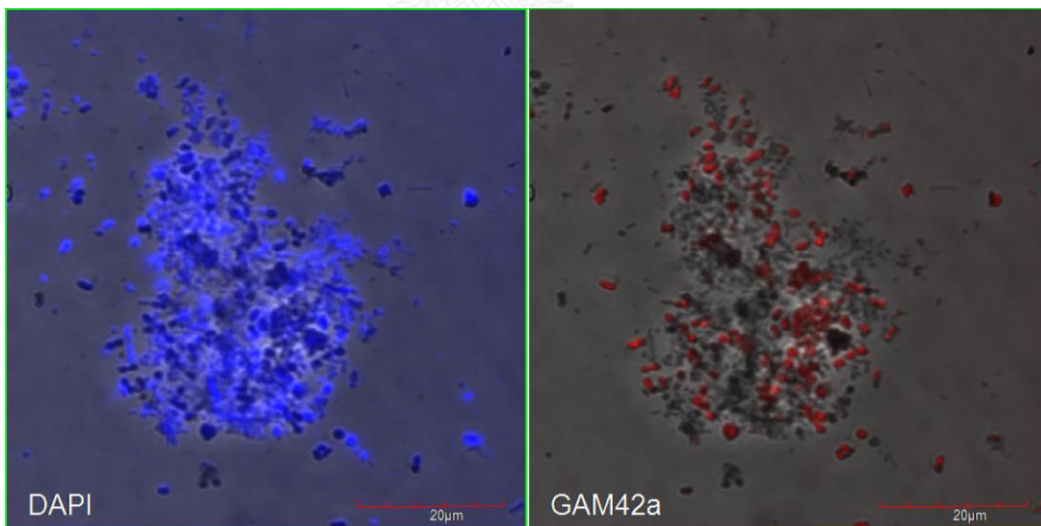
ผลจากการวิเคราะห์แบคทีเรียทั้ง 3 คลาสใน *Proteobacteria* ด้วยเทคนิค FISH พบแบคทีเรียทั้ง 3 คลาส โดยในภาพที่ 41 ถึง 43 แสดงแสง fluorescence สีแดง (ภาพขาว) และสีน้ำเงิน (ภาพซ่าย) ซึ่งปรากฏในบริเวณเดียวกันของแบคทีเรียในคลาส *Alphaproteobacteria* (ภาพที่ 41) *Betaproteobacteria* (ภาพที่ 42) และ *Gammaproteobacteria* (ภาพที่ 43) จากภาพจะสามารถระบุและยืนยันถึงตำแหน่งของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาได้ (แสงสีแดง) อีกทั้งยืนยันได้ว่าในบริเวณดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์อย่างแน่นอน (แสงสีน้ำเงิน)



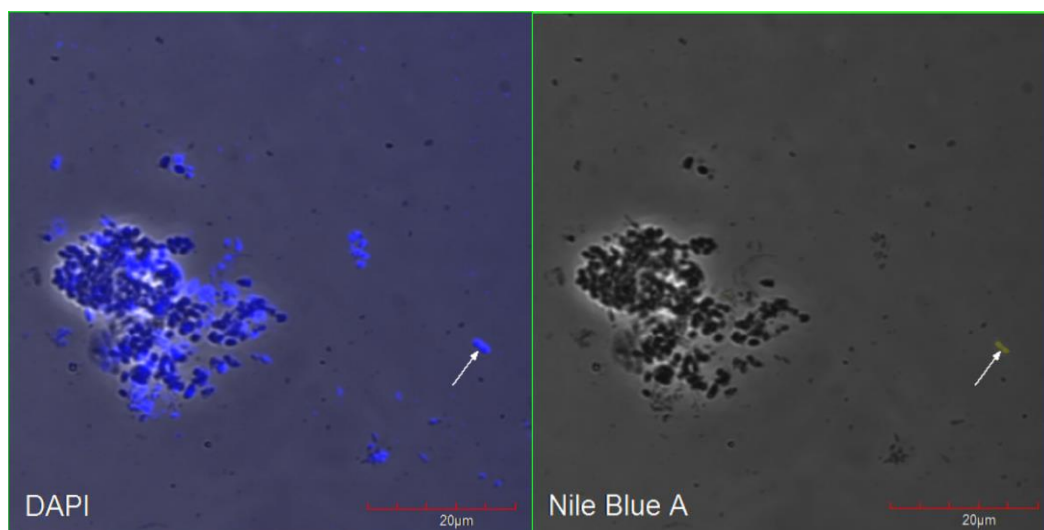
ภาพที่ 41 ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรีย (แสงสีน้ำเงิน) (ภาพซ่าย) และแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* (แสงสีแดง) (ภาพขาว)



ภาพที่ 42 ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรีย (แสงสีน้ำเงิน) (ภาพซ้าย) และแบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria* (แสงสีแดง) (ภาพขวา)



ภาพที่ 43 ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรีย (แสงสีน้ำเงิน) (ภาพซ้าย) และแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria* (แสงสีแดง) (ภาพขวา)



ภาพที่ 44 ผลการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI (แสงสีน้ำเงิน) (ภาพซ้าย) ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอด้วย Nile Blue A (แสงสีเหลือง) (ภาพขวา) และบริเวณที่พบฟิเอชเอ (ลูกศรสีขาว)

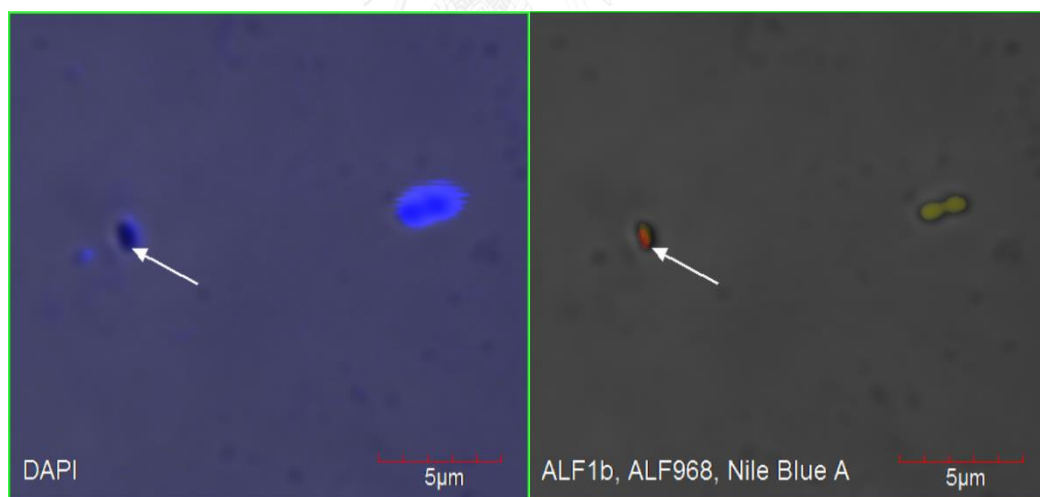
ในภาพที่ 44 แสดงผลการย้อมสีฟิเอชเอด้วย Nile Blue A ร่วมกับการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI ผลปรากฏว่าพบแสง fluorescence สีเหลืองในบริเวณที่ย้อมติดฟิเอชเอดังภาพที่ 44 ภาพขวา (ลูกศรสีขาว) ซึ่งอยู่ในบริเวณเดียวกันกับที่พบแสงสีน้ำเงินทำให้ยืนยันได้ว่าในบริเวณดังกล่าวเป็นเซลล์แบคทีเรียหรืออาร์เคียดังภาพที่ 44 ภาพซ้าย ดังนั้นในภาพที่ 44 สามารถอธิบายและยืนยันได้ว่าเซลล์แบคทีเรียหรืออาร์เคียที่พบมีความสามารถในการสะสมฟิเอชเอ แต่ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นแบคทีเรียคลาสใดใน *Proteobacteria*

ต่อมาจึงทำการวิเคราะห์แบคทีเรียทั้ง 3 คลาสใน *Proteobacteria* ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอและการย้อมสี DAPI ผลปรากฏว่าพบแสง fluorescence สีแดงของกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาแสง fluorescence สีน้ำเงินของเซลล์แบคทีเรียและอาร์เคีย และแสง fluorescence สีเหลืองของเซลล์ที่สะสมฟิเอชเอในบริเวณเดียวกัน โดยในภาพขวาของภาพที่ 45 และภาพที่ 46 (ลูกศรสีขาว) แสดงแสงสีแดงซ้อนทับกับแสงสีเหลืองพอดีซึ่งปรากฏเป็นแสงสีส้ม สามารถอธิบายและยืนยันได้ว่าแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* (ภาพที่ 45) และคลาส *Betaproteobacteria* (ภาพที่ 46) สามารถผลิตและสะสมฟิเอชเอได้ และในภาพซ้ายของภาพที่ 45 และภาพที่ 46 พบแสงสีน้ำเงินอยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับแสงสีส้มในภาพขวา (ลูกศรสีขาว) ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการผลิตฟิเอชเอได้อย่างแน่นอน

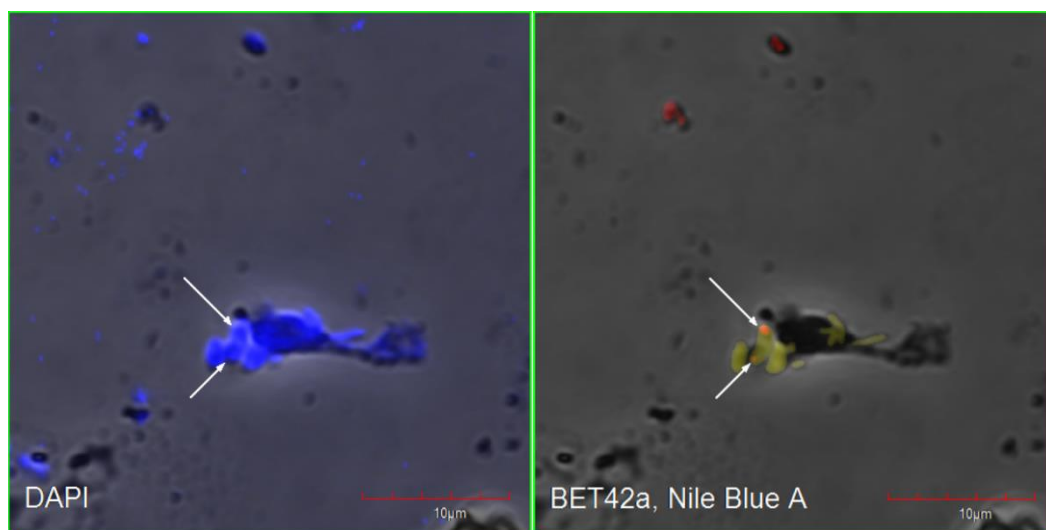
ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) ที่ศึกษาความสามารถในการผลิตฟิเอชเอของกลุ่มแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทเมื่อใช้อะซิเตทหรือโพธิ-

ไอเอนต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยในการศึกษาใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมกับเทคนิค FISH และการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A ซึ่ง พบ แบคทีเรียที่เรียยคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria* (*Amaricoccus* *Azoarcus* *Thauera* และ *Paracoccus*) ในถังปฏิกรณ์ที่เดินระบบด้วยอะซิเตทหรือโพรพิไอเอนต์ นอกจากนี้พบตำแหน่งที่ตรงกันของแบคทีเรียทั้ง 2 คลาสกับการติดสีพีเอชเอ ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าแบคทีเรียทั้งคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria* มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอได้ในงานวิจัย

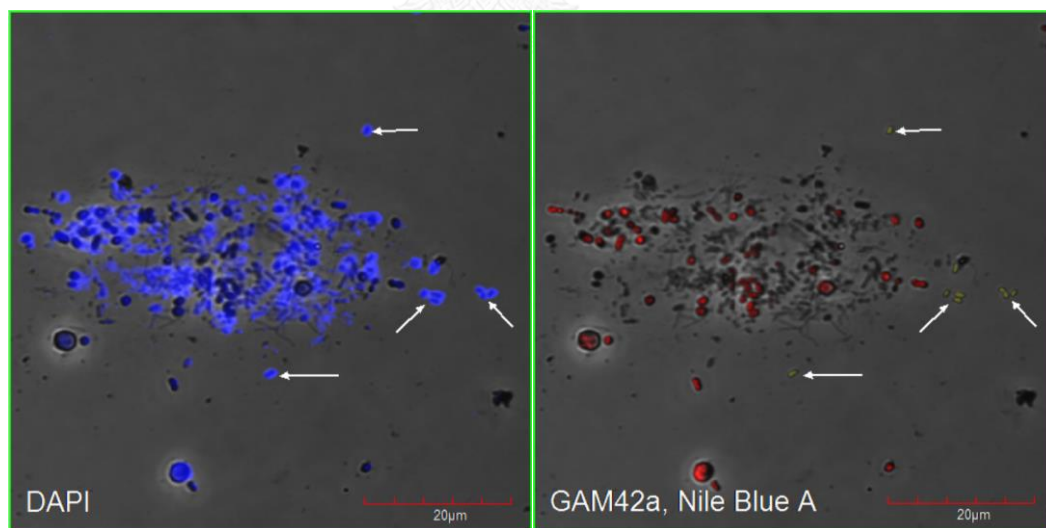
ส่วนในภาพที่ 47 แสดงผลการวิเคราะห์แบคทีเรียที่เรียยคลาส *Gammaproteobacteria* ซึ่งในภาพขวาไม่พบแสงสีแดงซ้อนทับกับแสงสีเหลืองแสดงให้เห็นว่าพีเอชเอไม่ได้สะสมในแบคทีเรียที่เรียยคลาสนี้ และภาพที่ 47 ภาพซ้ายพบแสงสีน้ำเงินอยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับแสงสีเหลือง (ลูกศรสีขาว) ซึ่งยืนยันได้ว่าพีเอชเอนั้นถูกสะสมในเซลล์จุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ *Gammaproteobacteria* ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าในงานวิจัยนี้ยังไม่พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียที่เรียยคลาส *Gammaproteobacteria*



ภาพที่ 45 ผลการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI (แสงสีน้ำเงิน) (ภาพซ้าย) และผลการซ้อนทับกันระหว่างแบคทีเรียที่เรียยคลาส *Alphaproteobacteria* (แสงสีแดง) กับพีเอชเอ (แสงสีเหลือง) ในบริเวณลูกศรสีขาว (ภาพขวา) ที่ปรากฏแสงสีส้ม



ภาพที่ 46 ผลการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI (แสงสีน้ำเงิน) (ภาพซ้าย) และผลการซ้อนทับกันระหว่างแบคทีเรียที่เรียคลาส *Betaproteobacteria* (แสงสีแดง) กับพีเอชเอ (แสงสีเหลือง) ในบริเวณลูกศรสีขาว (ภาพขวา) ที่ปรากฏแสงสีส้ม



ภาพที่ 47 ผลการย้อมสีจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI (แสงสีน้ำเงิน) (ภาพซ้าย) และผลการวิเคราะห์แบคทีเรียที่เรียคลาส *Gammaproteobacteria* (แสงสีแดง) กับพีเอชเอ (แสงสีเหลือง) ในบริเวณลูกศรสีขาว (ภาพขวา) ที่ปรากฏเฉพาะแสงสีเหลือง

หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ความหนาแน่นของกลุ่มจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม โดยสุ่มภาพตัวอย่างจำนวน 20 ภาพต่อ 1 คลาสจุลินทรีย์ที่ศึกษาผลปรากฏว่า

พบแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* จำนวน 468 เซลล์เทียบกับจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบ 3,132 เซลล์ (คิดเป็น 14.9%) และจำนวนฟิเอชเอที่พบ 59 เซลล์ มีเพียง 1 เซลล์ที่เป็นของแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* ซึ่งหมายความว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียกลุ่ม *Alphaproteobacteria* 14.9% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด มีความสามารถในการผลิตฟิเอชเอเพียง 1.7% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถผลิตฟิเอชเอได้

นอกจากนี้ในจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบ 3,132 เซลล์ ยังเป็นแบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria* มากถึง 400 เซลล์ คิดเป็นความหนาแน่นของกลุ่มประชากร 12.8% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและพบฟิเอชเอจำนวน 10 เซลล์ที่แบคทีเรียกลุ่มนี้ผลิตได้จากฟิเอชเอทั้งหมด 83 เซลล์ (คิดเป็น 12%) ซึ่งอธิบายได้ว่าในประชากรแบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria* 12.8% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด มีความสามารถในการผลิตฟิเอชเอ 12% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถผลิตฟิเอชเอได้

พบแบคทีเรียกลุ่ม *Gammaproteobacteria* จำนวน 309 เซลล์จากจุลินทรีย์ทั้งหมด 3,132 เซลล์ (คิดเป็น 9.9%) และไม่พบความสามารถในการผลิตฟิเอชเอของแบคทีเรียคลาสนี้เมื่อเทียบกับจำนวนฟิเอชเอที่พบทั้งหมด 110 เซลล์ สามารถอธิบายได้ว่า *Gammaproteobacteria* ที่พบ 9.9% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ไม่พบความสามารถในการผลิตฟิเอชเอของแบคทีเรียคลาสนี้ในตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างที่ผลิตฟิเอชเอได้สูงสุด

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน (3,000 mg/L) ที่อายุตะกอน 10 วัน ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 2 วัน และอัตราส่วน F/F อยู่ในช่วง 0.09-0.20 ในงานวิจัยนี้สามารถสะสมฟิเอชเอได้ 32.3% gPHA/gMLSS หรือ 34.2% gPHA/gMLVSS โดยพบความสามารถในการผลิตฟิเอชเอของแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria* คิดเป็นร้อยละ 1.7 และ 12 เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถผลิตฟิเอชเอได้ ตามลำดับ แต่ไม่พบความสามารถในการผลิตฟิเอชเอของแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria*

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์แบคทีเรียในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงในตารางที่ 23 พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) ซึ่งมีปัจจัยในการเดินระบบที่คล้ายคลึงกัน เช่น ค่าอายุตะกอน 10 วัน ค่าฟิเอชเออยู่ในช่วง 8.0-9.2 (งานวิจัยนี้กำหนดค่าฟิเอช 6.5-9.5) และค่า F/F อยู่ในช่วง 0.14 - 0.20 (งานวิจัยนี้ 0.09-0.20) เป็นต้น โดยในงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) พบแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria* ประกอบด้วย *Amaricoccus* *Azoarcus* *Thauera* และ *Paracoccus* เป็นประชากรแบคทีเรียกลุ่ม

หลักที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอ (27.9% โดยน้ำหนักแห้ง) อีกทั้งในงานวิจัยของ Serafim และคณะ, (2006) และ Çiğgin และคณะ, (2011) พบ *Thauera* และ *Azoarcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria* โดยใช้เทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A เพื่อยืนยันความสามารถในการผลิตพีเอชเอ

นอกจากนี้ Oshiki และคณะ, (2013) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนในประเทศญี่ปุ่นจำนวน 8 แห่งในระบบแบบแบทช์โดยให้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนแต่ไม่มีการกระตุ้นจุลินทรีย์ด้วยการให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน (Feast/Famine) พบว่าตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนดังกล่าวทั้ง 8 แห่งสามารถผลิตพีเอชเอได้ในช่วง 29-64% ซึ่งในตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ทั้งหมดพบและยืนยันถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria* โดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene clone library ร่วมกับเทคนิค FISH และการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A

อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์แบคทีเรียในงานวิจัยนี้แตกต่างจากกับงานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) ซึ่งเดินระบบด้วยค่าอายุตะกอน 1 วัน ค่าระยะเวลาพักเก็บน้ำ 1 วัน ค่าอัตราส่วน F/F ประมาณ 0.06 โดยในงานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) พบ *Plasticicumulans acidivorans* ในระบบที่ให้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้น ซึ่ง *P. acidivorans* เป็นแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria* ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้มากถึง 52% โดยน้ำหนักแห้งในระบบแบบกึ่งเทและสะสมพีเอชเอได้สูงสุด 88% โดยน้ำหนักแห้งในระบบถังปฏิกรณ์แบบ fed-batch ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A สามารถยืนยันถึงความสามารถในการสะสมพีเอชเอของ *P. acidivorans* ได้ ทั้งนี้ผลจากงานวิจัยดังกล่าวแตกต่างจากงานวิจัยนี้ซึ่งไม่พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria*

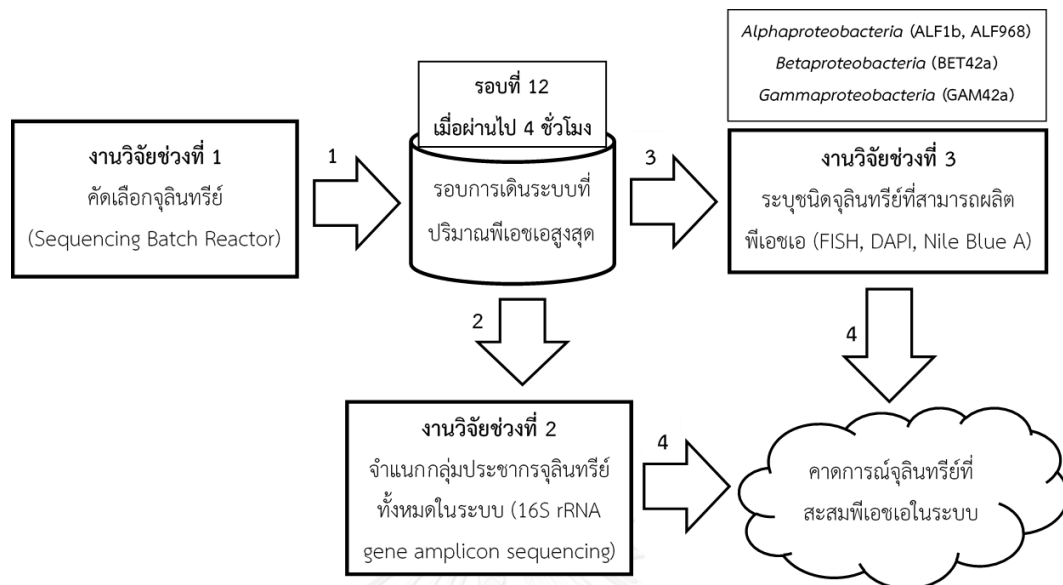
นอกจากนี้ในระบบถังปฏิกรณ์ในงานวิจัยนี้ยังพบแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชเออีกจำนวนมากที่ยังไม่สามารถยืนยันกลุ่มจุลินทรีย์ได้ ซึ่งแบคทีเรียที่เคยมีรายงานว่าผลิตพีเอชเอได้ในไฟลัม *Proteobacteria* คลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และแบคทีเรียไฟลัมอื่น ๆ จะนำมาวิเคราะห์ร่วมกับผลการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing เพื่อคาดการณ์ถึงกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสมพีเอชเอในระบบในการอภิปรายผลส่วนต่อไป (4.4)



ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์และยืนยันถึงความสามารถในการผลิตฟีเอชของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟีเอชด้วย Nile Blue A และเทคนิคอื่น ๆ

อ้างอิง	เทคนิคทางชีวโมเลกุล	จุลินทรีย์ที่พบ	ปัจจัยในการเดินระบบ									
			วิธีผลิตฟีเอช	สารตั้งต้น	ที่มาตะกอน	ปริมาณฟีเอช	HRT (วัน)	SRT (วัน)	pH	Temp.	Operation Time	F/F
Lemos และคณะ (2008)	FISH และ Nile Blue A	Azoarcus (45.9%) Thauera (49.4%)	Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP		1	1	8.0	22 องศาเซลเซียส	101 วัน	0.14
			Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP	27.9%	1	10	8.0	22 องศาเซลเซียส	4 ปี	0.20
Ciggik และคณะ (2011)	FISH DAPI และ Nile Blue A	Thauera (52%) Azoarcus (54%)	Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP	141 mgCOD/L	4 ชม.	2	6.5	25 องศาเซลเซียส	35 วัน	0.23
			Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP	88 wt	1	1	7	30 องศาเซลเซียส	4 ปี	1.67
Jiang และคณะ (2011a)	DGGE FISH และ Nile Blue A	<i>Plasticumulans acidivorans</i>	Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP							
			ไม่มีสารตั้งต้น	อะซิเตท	WWTP	29-64%			8.0	22 องศาเซลเซียส	-	-
Oshiki และคณะ (2013)	16S rRNA gene clone library FISH DAPI และ Nile Blue A	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	ไม่มีสารตั้งต้น	อะซิเตท	WWTP							
			Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP	32.3% gPHA/ gMLSS (34.2% gPHA/ gMLVSS)	2	10	6.5	25-30 องศาเซลเซียส	รอบที่ 12 (22 วัน) เมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมง	0.09
งานวิจัยนี้	FISH DAPI และ Nile Blue A	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	Feast/ Famine	อะซิเตท	WWTP							

#### 4.4 การคาดการณ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ในระดับสูงกว่าคลาสใน *Proteobacteria* และไฟลัมอื่น ๆ



ภาพที่ 48 ภาพรวมงานวิจัยทั้งหมด

เมื่อนำตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตเครื่องดื่มจากผักและผลไม้ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมมากระตุ้นด้วยการให้อะซิเตทที่มีความเข้มข้น 3,000 mgCOD/L ในระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลับกับขาดแคลนเพื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ในระบบ (ช่วงที่ 1) พบว่าตะกอนจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตพีเอชเอได้สูงสุด 32.3% gPHA/gMLSS (34.2% gPHA/gMLVSS) คิดเป็นสัดส่วนของเอชปีโมโนเมอร์ 100% ในรอบการเดินระบบที่ 12 เมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมง โดยภาพรวมทั้งหมดของงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ดังในภาพที่ 48 จากนั้นจึงศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing ในตัวอย่างที่มีพีเอชเอสูงสุด (ช่วงที่ 2) พบแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในระบบมากถึง 88.07% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยคลาส *Alphaproteobacteria* (13.26% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) คลาส *Betaproteobacteria* (51.37% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) รองลงมาคือแบคทีเรียไฟลัม *Bacteroidetes* 10.15% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด ประกอบด้วยคลาส *Cytophagia* (4.5% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) และคลาส *Flavobacteriia* (5.65% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด)

อีกทั้งเมื่อนำตะกอนจุลินทรีย์ในรอบที่มีการผลิตพีเอชเอสสูงที่สุดมาวิเคราะห์หากกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตพีเอชเอสด้วยเทคนิค FISH (ช่วงที่ 3) โดยในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอสของแบคทีเรีย 3 คลาสในไฟลัม *Proteobacteria* คือ คลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* โดยจะใช้ fluorescence probe ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอสด้วย Nile Blue A ซึ่งเป็นสีย้อม fluorescence และการย้อมจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI (ช่วงที่ 3) พบแบคทีเรียทั้งคลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ในระบบโดยความหนาแน่นของกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มนี้เทียบกับประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบมีค่า 14.9%, 12.8%, และ 9.9% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ และพบความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอสของตะกอนจุลินทรีย์ โดยยืนยันได้ว่าแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* มีประชากรที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอสจำนวน 1.7% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ผลิตพีเอชเอสได้ และคลาส *Betaproteobacteria* มีประชากรที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอสได้ 12% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ผลิตพีเอชเอสได้ในกลุ่มประชากรแบคทีเรีย *Betaproteobacteria* ทั้งหมด แต่ไม่พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอสของแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria* ในงานวิจัยนี้ ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานข้อที่ 1 ที่ตั้งไว้ อีกทั้งยังมีจุลินทรีย์ผลิตพีเอชเอสจำนวนมากที่ยังไม่สามารถระบุกลุ่มจุลินทรีย์ได้

จากผลการทดลองช่วงที่ 2 และช่วงที่ 3 ซึ่งใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่แตกต่างกันในการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกันในแง่ที่พบจุลินทรีย์ในคลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria* ในตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามสัดส่วนจุลินทรีย์ที่พบนั้นมีความแตกต่างกันในการวิเคราะห์ด้วย 2 วิธี ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากหลายปัจจัย ได้แก่ ความไม่แน่นอนของตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ (sample heterogeneity) ความไม่แม่นยำของวิธี 16S rRNA gene amplicon sequencing ในเชิงปริมาณ เนื่องจากวิธีดังกล่าวถือว่าการวิเคราะห์แบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) และการเก็บภาพตัวอย่างของวิธี FISH ซึ่งจะมีความแม่นยำมากขึ้นหากเพิ่มจำนวนจุดที่วิเคราะห์ตัวอย่าง

อย่างไรก็ตาม หากวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้จากการทดลองช่วงที่ 2 และช่วงที่ 3 ร่วมกัน โดยเมื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ของจุลินทรีย์ในออคเตอร์ต่าง ๆ ที่พบในคลาส *Alphaproteobacteria* ที่สามารถผลิตและสะสมพีเอชเอสได้ สามารถวิเคราะห์ได้เป็นลำดับดังนี้

1. แบคทีเรียในออคเตอร์ *Rhodobacterales* พบแฟมิลี *Rhodobacteraceae* (6.28%) ซึ่งประกอบด้วย *Rhodobacter* spp., *Rhodobaca* spp., และ *Amaricoccus* spp. จากงานวิจัยที่

ผ่านมาของ Falvo และคณะ, (2001) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ *Amaricoccus kaplicensis* ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการผลิตพีเอชเอ และผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมในระบบที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนของงานวิจัย Lemos และคณะ, (2008) ได้รายงานถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของจุลินทรีย์กลุ่ม *Amaricoccus* spp. ในระบบโดยใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมกับเทคนิค FISH และการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานข้อที่ 2 ที่ตั้งไว้ ในส่วนของวิจัยของ Kanekar และคณะ, (2007) พบว่า *Rhodobaca* spp. ไม่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอและไม่พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของ *Rhodobacter* spp.

2. แบคทีเรียในออเดอร์ *Rhodobacterales* พบแฟมิลี *Hyphomonadaceae* (3.84%) ซึ่งประกอบด้วย *Hyphomonas* spp. ในงานวิจัยที่ผ่านมาของ Weiner และคณะ, (1985) ได้รายงานความสามารถในการผลิตพีเอชเอใน *Hyphomonas* spp. 10 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พบ *Hyphomonas* spp. ในระบบถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ ซึ่งเดินระบบด้วยสภาวะให้อาหารเกินพอสลักกับขาดแคลนโดยใช้น้ำเสียมูลโคนมหมักเป็นสารตั้งต้น แต่ไม่สามารถยืนยันถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในระบบดังกล่าว (Hanson และคณะ, (2016) และในงานวิจัยของ Woraittinun และ Suwannasilp, (2017) ก็มีการพบ *Hyphomonas* spp. เช่นกันในรอบที่มีการผลิตพีเอชเอสูงที่สุดถึง 44.78% gPHA/gMLSS ในระบบที่ให้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้น แต่ก็ไม่สามารถยืนยันถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอในระบบได้เช่นกัน

3. แบคทีเรียในออเดอร์ *Caulobacterales* พบแฟมิลี *Caulobacteraceae* (2.21%) ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมาของ Qi และ Rehm, (2001) รายงานว่า *Caulobacter crescentus* สายพันธุ์บริสุทธิ์สามารถผลิตพีเอชเอได้ประมาณ 18% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น อีกทั้งในงานวิจัยของ Wang และคณะ, (2017b) พบ *Brevundimonas* spp. ในระบบที่สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ 4.262 g/L หลังจากเดินระบบ 300 นาที เมื่อใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้นโดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตสบู่จาก propylene oxide นอกจากนี้ยังพบ *Brevundimonas vesicularis* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ทั้งในสารตั้งต้นชนิดวาเลอเรทหรืออะซิเตท (Hao และคณะ, (2017)) และในงานวิจัยของ Bhuwal และคณะ, (2013) ได้ทำการศึกษาตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ คราฟท์ และกระดาษแข็งในการผลิตพีเอชเอด้วยการย้อม Nile Blue A พบ *Brevundimonas* spp. ในระบบที่มีการสะสมพีเอชเอ 77.63% ซึ่งจากผลการย้อมสีพีเอชเอพบและยืนยันได้ถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของ *Brevundimonas* spp. ทั้ง *Caulobacter crescentus* และ *Brevundimonas* spp. เป็นแบคทีเรียในแฟมิลีเดียวกันกับที่พบใน

งานวิจัยนี้ ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าแบคทีเรียในออคเตอร์ *Caulobacterales* แฟมิลี *Caulobacteraceae* น่าจะมีความสามารถในการผลิตพีเอชเอในระบบของงานวิจัยนี้

4. แบคทีเรียในออคเตอร์ *Rhizobiales* แฟมิลี *Hyphomicrobiaceae* (0.37%) คือ *Devosia* spp. ซึ่งพบ *Devosia* spp. ในงานวิจัย Hao และคณะ, (2017) ในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ แต่ไม่มีการยืนยันถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของจุลินทรีย์กลุ่มนี้

5. แบคทีเรียในออคเตอร์ *Rhizobiales* แฟมิลี *Phyllobacteriaceae* (0.28%) ซึ่งไม่เคยมีรายงานถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอ

และ 6. แบคทีเรียในออคเตอร์ *Sphingomonadales* แฟมิลี *Sphingomonadaceae* (0.27%) คือ *Sphingopyxis* spp. จากงานวิจัยของ Godoy และคณะ, (2003a) ได้รายงานถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ *Sphingopyxis chilensis* นอกจากนี้ในงานของ Worattinun และ Suwannasilp, (2017) ได้ตรวจพบจุลินทรีย์ *Sphingopyxis* spp. ในรอบที่มีจุลินทรีย์สะสมพีเอชเอสูงสุดในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมที่มีโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนในระบบที่ผลิตพีเอชเอได้ 12.65% gPHA/gMLSS แต่ไม่สามารถยืนยันความสามารถในการผลิตพีเอชเอได้ ดังนั้นจึงเป็นที่คาดการณ์ว่า *Sphingopyxis* spp. อาจมีส่วนในการผลิตพีเอชเอในระบบของงานวิจัยนี้

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการสะสมพีเอชเอด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสี Nile blue A พบว่าจุลินทรีย์ในคลาส *Betaproteobacteria* ในระบบมีความสามารถในการผลิตพีเอชเอ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ด้วย 16S rRNA gene amplicon sequencing จุลินทรีย์ในคลาส *Betaproteobacteria* นั้นมีปริมาณสูงถึง 51.37% ของจำนวนลำดับเบสทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ซึ่งอาจมีความสามารถในการผลิตพีเอชเอตามออคเตอร์ที่พบสามารถสรุปได้ดังนี้

1. แบคทีเรียในออคเตอร์ *Rhodocyclales* แฟมิลี *Rhodocyclaceae* 51.07% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด ประกอบด้วย *Thauera* spp. 48.88% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด และจีนัสอื่น ๆ อีก 2.19% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาของ Lemos และคณะ, (2008) พบและยืนยันถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของ *Thauera* spp. ในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมเมื่อใช้อะซิเตทหรือโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบ *Thauera selenatis* ในงานของ Jiang และคณะ, (2011a) ซึ่งทำการศึกษาในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมที่ยืนยันได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถผลิตพีเอชเอได้มากถึง 84% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อใช้แลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH ยังพบ *Thauera* spp. ในงานวิจัยของ Çiğgin และคณะ, (2011), Moita และ Lemos, (2012), Oehmen และคณะ, (2014) และ

Carvalho และคณะ, (2014) อีกด้วย ซึ่งงานวิจัย Lemos และคณะ, (2008), Çiğgin และคณะ, (2011) และ Moita และ Lemos, (2012) ใช้เทคนิค FISH โดยใช้ probe เฉพาะเจาะจงของ *Thauera* spp. ร่วมกับการย้อมสี Nile blue A เพื่อยืนยันความสามารถในการผลิตพีเอชเอ ดังนั้น *Thauera* spp. ที่พบในงานวิจัยนี้มากถึง 48.8% จึงน่าจะมีความสำคัญในการผลิตพีเอชเอในระบบ ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานข้อที่ 2 ที่ตั้งไว้

และ 2. แบคทีเรียในออดีออร์ *Burkholderiales* พบแฟมิลี *Comamonadaceae* (0.3%) ซึ่งถือว่าพบในปริมาณน้อยมาก อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมาของ Khan และคณะ, (2002) ศึกษาความสามารถในการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนแบบตะกอนเร่ง (ประเทศญี่ปุ่น) ซึ่งพบและยืนยันถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรียในแฟมิลี *Comamonadaceae* โดยในงานวิจัยดังกล่าวพบจีโนม *Acidovorax* spp. และ *Comamonas* spp. ที่สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้ นอกจากนี้งานวิจัยของ Spring และคณะ, (2005) ได้พบความสามารถของจุลินทรีย์ *Malikia granosa* สายพันธุ์บริสุทธิ์ในการผลิตพีเอชเอ ซึ่งจุลินทรีย์นี้เป็นแบคทีเรียในแฟมิลี *Comamonadaceae* เช่นกัน ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าแบคทีเรียแฟมิลี *Comamonadaceae* น่าจะสามารถผลิตพีเอชเอได้ในงานวิจัยนี้

และจากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการสะสมพีเอชเอด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสี Nile blue A นั้นไม่พบความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอของแบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* ซึ่งจากการวิเคราะห์กลุ่มประชากรด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing แบคทีเรียในคลาส *Gammaproteobacteria* มีปริมาณ 23.44% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด ซึ่งออดีออร์ต่าง ๆ ที่พบมีดังนี้

1. แบคทีเรียในออดีออร์ *Alteromonadales* พบแฟมิลี *Chromatiaceae* (20.14%) งานวิจัยที่ผ่านมาพบจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ในแฟมิลี *Chromatiaceae* ที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอ เช่น ในงานวิจัยของ Liebergesell และคณะ, (1991) พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของ *Chromatium vinosum* ซึ่งการตรวจไม่พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของ *Gammaproteobacteria* ในงานวิจัยนี้อาจเกิดขึ้นจาก 1) ในระบบไม่มีจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ในกลุ่มนี้ 2) อาจมีจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวแต่ไม่สามารถผลิตพีเอชเอในระบบได้ภายใต้สภาวะนี้ หรือ 3) การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH ไม่พบบริเวณที่จุลินทรีย์กลุ่มนี้สะสมพีเอชเอ

และ 2. แบคทีเรียในออดีออร์ *Xanthomonadales* แฟมิลี *Xanthomonadaceae* ประกอบด้วย *Aquimonas* spp. (1.77%), *Luteimonas* spp. (0.78%) และจีโนมอื่น ๆ (0.75%) ซึ่งในงานวิจัยของ Wang และคณะ, (2017a) พบ *Aquimonas* spp. ในระบบจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมที่

มีการผลิตพีเอชเอแต่ไม่สามารถยืนยันได้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตพีเอชเอได้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ในออเดออร์นี้ถือว่าพบในปริมาณน้อยมากและไม่น่าจะมีส่วนในการผลิตพีเอชเอในระบบ

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังตรวจพบแบคทีเรียไฟลัมอื่น ๆ นอกเหนือจากไฟลัม *Proteobacteria* ในระบบเมื่อวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing ซึ่งลำดับเบสที่พบ ประกอบด้วย ไฟลัม *Bacteroidetes* (10.15% เทียบกับ จำนวนลำดับเบสทั้งหมด) ไฟลัม *Cyanobacteria* (0.22% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) ไฟลัม *Thermus* (0.15% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) ไฟลัม *Actinobacteria* (0.11% เทียบกับ จำนวนลำดับเบสทั้งหมด) และจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ (1.30% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) ซึ่งอาจมีความสามารถหรือมีบทบาทในการผลิตพีเอชเอในงานวิจัยนี้ด้วย โดยวิเคราะห์เป็นลำดับดังนี้

1. งานวิจัยนี้พบไฟลัม *Bacteroidetes* (10.15% ) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์มากเป็นอันดับสองเมื่อเทียบกับลำดับเบสทั้งหมดในตะกอนจุลินทรีย์ตัวอย่างซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Woraittinun และ Suwannasilp, (2017) ที่พบไฟลัม *Bacteroidetes* ในรอบการเดินระบบที่ผลิตพีเอชเอได้สูงสุด 44.78% gPHA/gMLSS ในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนแต่ไม่สามารถยืนยันได้ถึงความสามารถในการผลิตพีเอชเอ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Liu และคณะ, (2013) ที่พบไฟลัม *Bacteroidetes* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเทที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอ (64.2% โดยน้ำหนักแห้ง) แต่ไม่มีรายงานความสามารถในการผลิตพีเอชเอ รวมไปถึงในงานวิจัยของ Zengin และคณะ, (2010) Oshiki และคณะ, (2013) และในงานวิจัยที่เดินระบบด้วยตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งอีกจำนวนมาก ซึ่งงานวิจัยที่กล่าวถึงทั้งหมดไม่พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอ แต่งานวิจัยของ Ahmed และคณะ, (2003) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถและบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนในระบบ ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าแบคทีเรียไฟลัม *Bacteroidetes* ไม่น่าจะมีความสามารถในการผลิตพีเอชเอในงานวิจัยนี้แต่น่าจะมีส่วนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบซึ่งพบได้ทั่วไปในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

2. พบไฟลัม *Cyanobacteria* จำนวนน้อย (0.22% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) ในระบบในงานวิจัยนี้ งานวิจัยที่ผ่านมาของ Taroncher-Oldenburg และคณะ, (2000) พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ในไฟลัม *Cyanobacteria* มากถึง 12.3% โดยน้ำหนักแห้งภายใต้สภาวะ high-glucose growth ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสันนิษฐานว่าแบคทีเรียไฟลัม *Cyanobacteria* อาจมีความสามารถในการผลิตพีเอชเอ

3. งานวิจัยนี้พบแบคทีเรียไฟลัม *Thermus* (0.15% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมาของ Pantazaki และคณะ, (2009), Papaneophytou และคณะ, (2011) และ

Papaneophytou และ Kyriakidis, (2012) ซึ่งพบ *Thermus thermophiles* จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอจึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียไฟลัม *Thermus* อาจมีบทบาทในการผลิตพีเอชเอในระบบ

4. งานวิจัยของ Liu และคณะ, (2002) พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของ *Kineosphaera limosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในไฟลัม *Actinobacteria* ต่อมาในปี 2009 Matias และคณะ, (2009) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียไฟลัม *Actinobacteria* ต่อจากงานวิจัยของ Liu และคณะ, (2002) พบ *Actinobacteria* จำนวนมากถึง 34 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ เช่น *Nocardia* spp., *Streptoalloteichus* spp., *Streptacidiphilus* spp., *Rhodococcus* spp. เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยนี้พบแบคทีเรียไฟลัม *Actinobacteria* เช่นกัน (0.11% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) ซึ่งอาจมีความสามารถในการผลิตพีเอชเอได้ในระบบ

อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ในไฟลัม *Cyanobacteria* *Thermus* และ *Actinobacteria* ถือได้ว่าพบในปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับลำดับเบสทั้งหมด ดังนั้นจึงคาดว่าไม่น่าจะมีบทบาทสำคัญในการผลิตพีเอชเอภายในระบบ หากวิเคราะห์ผลทั้งหมดรวมกันจะสามารถคาดการณ์ได้ว่าจุลินทรีย์ในระบบที่มีความสามารถในการผลิตพีเอชเอในงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ดังในตารางที่ 24

**ตารางที่ 24** แบคทีเรียที่ลึกกว่าระดับไฟลัมที่คาดการณ์ว่าน่าจะสามารถในการผลิตพีเอชเอในงานวิจัยนี้

ไฟลัม	คลาส	แฟมิลี* และจิ้นัสที่พบในงานวิจัยนี้	อ้างอิง
Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Thauera</i> (48.88%)	Lemos และคณะ, (2008), Çiğgin และคณะ, (2011), Moita และ Lemos, (2012)
		<i>Comamonadaceae</i> * (0.3%)	Khan และคณะ, (2002) Spring และคณะ, (2005)
	Alphaproteobacteria	<i>Hyphomonas</i> (3.84%)	Weiner และคณะ, (1985)
		<i>Caulobacteraceae</i> * (2.21%)	Qi และ Rehm, (2001) Bhuwal และคณะ, (2013) Wang และคณะ, (2017b) Hao และคณะ, (2017)
		<i>Sphingopyxis</i> (0.27%)	Godoy และคณะ, (2003a)
		<i>Amaricoccus</i> (0.16%)	Falvo และคณะ, (2001) Lemos และคณะ, (2008)



จุลินทรีย์ที่พบในงานวิจัยนี้เป็นการเดินระบบภายใต้สภาวะการให้อาหารเกินพอสลับกับขาดแคลน (Feast/Famine) ซึ่งพบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของจุลินทรีย์ไฟลัม *Proteobacteria* ในคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria*

เมื่อเปรียบเทียบจุลินทรีย์ที่พบในงานวิจัยนี้กับวิธีการผลิตพีเอชเอด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมวิธีอื่น ๆ โดยงานวิจัยของ Liu และคณะ, (2001) พบความสามารถผลิตพีเอชเอของ *Candidatus Accumulibacter phosphatis* แบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria* ซึ่งผลิตพีเอชเอได้ 5.6% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท (ประเทศไต้หวัน) ภายใต้สภาวะไร้อากาศสลับกับมีอากาศ (Anaerobic-aerobic process หรือ EPBR) โดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene clone library ร่วมกับเทคนิค FISH และการย้อมสีพีเอชเอ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Beer และคณะ, (2004) (ประเทศออสเตรเลีย) พบความสามารถในการผลิตพีเอชเอของ *Sphingomonas* spp. (คลาส *Gammaproteobacteria*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในระบบเมื่อใช้เทคนิค Clone library DGGE FISH ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A

ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในงานวิจัยของ Liu และคณะ, (2001) และ Beer และคณะ, (2004) มีความแตกต่างกับงานวิจัยนี้ เนื่องจากการเดินระบบด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน อีกทั้ง *Candidatus Accumulibacter phosphatis* และ *Sphingomonas* spp. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถในการสะสมฟอสเฟตและไม่พบในงานวิจัยนี้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชเอในกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมโดยใช้ตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานผลิตเครื่องดื่มจากผักและผลไม้ (บริษัท ทิปโก้ เอพ แอนด์บี จำกัด) ทำการเดินระบบโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบกึ่งเท (Sequencing Batch Reactor) ภายใต้สภาวะให้อาหารเกินพอสลักับขาดแคลนและใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน (3,000 mg/L) เดิมอากาศตลอดเวลาและคุมพีเอชในช่วง 7.7-9.5 โดยเครื่องควบคุมพีเอชอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส ในงานวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงการทดลอง เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมพีเอชเอได้ในระบบ โดยการทดลองช่วงที่ 1 คัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ถึงปฏิกรณ์ด้วยสภาวะให้อาหารเกินพอสลักับขาดแคลน การทดลองช่วงที่ 2 ศึกษาจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing และการทดลองช่วงที่ 3 ศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอได้ถึงปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH) โดยใช้ Fluorescence probe เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ 3 กลุ่มหลักในไฟลัม *Proteobacteria* คือ คลาส *Alphaproteobacteria* (probe ALF1b และ ALF968) คลาส *Betaproteobacteria* (probe BET42a) และคลาส *Gammaproteobacteria* (probe GAM42a) ร่วมกับการย้อมสีพีเอชเอด้วย Nile Blue A และการย้อมจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วย DAPI ซึ่งผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้ และผลที่ได้จากงานวิจัยสามารถสรุปแสดงเป็นภาพอย่างง่ายได้ดังภาพที่ 49

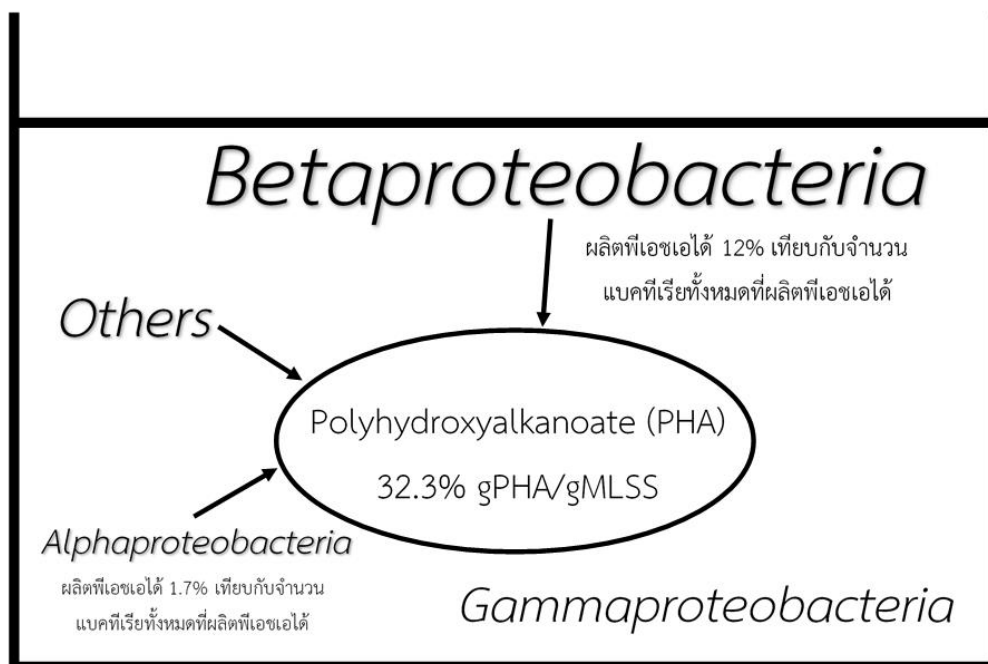
1. ตะกอนจุลินทรีย์เมื่อกระตุ้นด้วยอะซิเตทพบว่าสามารถผลิตและสะสมพีเอชเอได้สูงสุดถึง 32.3% gPHA/gMLSS (34.2% gPHA/gMLVSS) คิดเป็นสัดส่วนของเอชพีโมโนเมอร์ 100% ในรอบการเดินระบบที่ 12 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และพบว่าอัตราส่วนระหว่าง F/F ที่เหมาะสมของงานวิจัยนี้อยู่ในช่วง 0.09-0.20

2. เมื่อวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบด้วยเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในระบบเป็นจุลินทรีย์ 1. ไฟลัม *Proteobacteria* มากถึง 88.07% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วย คลาส *Betaproteobacteria* 51.37% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด คลาส *Alphaproteobacteria* 13.26% เทียบกับจำนวนลำดับ

เบสทั้งหมด และคลาส *Gammaproteobacteria* 23.44% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด รองลงมาคือ 2. โพลัม *Bacteroidetes* (10.15% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) 3. โพลัม *Cyanobacteria* (0.22% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) 4. โพลัม *Thermus* (0.15% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) 5. โพลัม *Actinobacteria* (0.11% เทียบกับจำนวนลำดับเบสทั้งหมด) และกลุ่มอื่น ๆ (1.30%) ตามลำดับ

3. ผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมพืเอชเอด้วยเทคนิค FISH พบความสามารถในการผลิตพืเอชเอของจุลินทรีย์คลาส *Betaproteobacteria* และคลาส *Alphaproteobacteria* คิดเป็น 12% และ 1.7% เทียบกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ผลิตพืเอชเอได้ตามลำดับ โดยไม่พบความสามารถในการผลิตพืเอชเอของจุลินทรีย์คลาส *Gammaproteobacteria* ในระบบ ดังนั้นจึงไม่เป็นไปตามสมมติฐานข้อที่ 1 ที่ตั้งไว้ อีกทั้งยังมีจุลินทรีย์ผลิตพืเอชเอจำนวนมากที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้

4. จากการคาดการณ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพืเอชเอได้ในระดับลึกกว่าคลาส โดยอาศัยผลที่ได้จากเทคนิค 16S rRNA gene amplicon sequencing ร่วมกับเทคนิค FISH มีแนวโน้มว่า *Thauera* spp. เป็นแบคทีเรียคลาส *Betaproteobacteria* ซึ่งมีจำนวนลำดับเบสมากถึง 48.88% ของลำดับเบสทั้งหมดน่าจะมีส่วนสำคัญในการสะสมพืเอชเอในระบบ ดังนั้นจึงไม่เป็นไปตามสมมติฐานข้อที่ 2 ที่ตั้งไว้ นอกจากนี้แบคทีเรียแฟมิลี *Caulobacteraceae* (2.21% ของลำดับเบสทั้งหมด) แบคทีเรียแฟมิลี *Comamonadaceae* (0.30% ของลำดับเบสทั้งหมด) *Sphingopyxis* spp. (0.27% ของลำดับเบสทั้งหมด) และ *Amaricoccus* spp. (0.16% ของลำดับเบสทั้งหมด) ก็อาจมีส่วนในการสะสมพืเอชเอในระบบ ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวมานี้เคยมีรายงานถึงความสามารถในการผลิตพืเอชเอในงานวิจัยที่ผ่านมา



ภาพที่ 49 ภาพสรุปอย่างง่ายของผลที่ได้จากงานวิจัยนี้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ.

1. ควรศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชเอได้ในระบบ ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ probe ในระดับที่ลึกกว่าคลาสลงไป ได้แก่ ออกเตอร์ แฟมิลี จินัส และสปีชีส์ เป็นต้น หรือตรวจสอบความสามารถของจุลินทรีย์ *Thauera* spp. ในการผลิตพีเอชเอในระบบ นอกจากนี้ควรศึกษาจุลินทรีย์โฟลัมอื่น ๆ ที่พบในงานวิจัยนี้นอกเหนือจากแบคทีเรียโฟลัม *Proteobacteria* คลาส *Alphaproteobacteria* *Betaproteobacteria* และ *Gammaproteobacteria*

2. ควรศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในระบบที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากพบจุลินทรีย์ต่างชนิดกันทั้งที่ใช้สารตั้งต้นชนิดเดียวกัน เช่น พบ *P. acidivorans* ในงานวิจัยของ Jiang และคณะ, (2011a) เป็นแบคทีเรียคลาส *Gammaproteobacteria* ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Lemos และคณะ, (2008) Serafim และคณะ, (2006) Çuğçin และคณะ, (2011) Oshiki และคณะ, (2013) และงานวิจัยนี้ที่ใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกันแต่พบแบคทีเรียคลาส *Alphaproteobacteria* และ *Betaproteobacteria* ดังนั้นจึงคาดการณ์ว่าน่าจะพบความหลากหลายของจุลินทรีย์หลายชนิดเมื่อเดินระบบถึงปฏิกรณ์แบบกึ่งเตด้วยอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน

### รายการอ้างอิง

- Ahmed, K., S. Chohnan, H. Ohashi, T. Hirata, T. Masaki and F. Sakiyama (2003). "Purification, bacteriolytic activity, and specificity of  $\beta$ -lytic protease from *Lysobacter* sp. IB-9374." Journal of bioscience and bioengineering **95**(1): 27-34.
- Albuquerque, M., C. Torres and M. Reis (2010). "Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection." Water Research **44**(11): 3419-3433.
- Anderson, A. J. and E. A. Dawes (1990). "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates." Microbiological reviews **54**(4): 450-472.
- Anderson, A. J., G. W. Haywood and E. A. Dawes (1990). "Biosynthesis and composition of bacterial poly (hydroxyalkanoates)." International journal of biological macromolecules **12**(2): 102-105.
- Beer, M., Y. H. Kong and R. J. Seviour (2004). "Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic: aerobic activated sludge systems members of the  $\alpha$ -Proteobacteria?" Microbiology **150**(7): 2267-2275.
- Bengtsson, S., J. Hallquist, A. Werker and T. Welander (2008a). "Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production." Biochemical Engineering Journal **40**(3): 492-499.
- Bengtsson, S., A. Werker, M. Christensson and T. Welander (2008). "Production of

polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater." Bioresource technology **99**(3): 509-516.

Bhuwal, A. K., G. Singh, N. K. Aggarwal, V. Goyal and A. Yadav (2013). "Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes." International journal of biomaterials **2013**.

Blackall, L. L., G. R. Crocetti, A. M. Saunders and P. L. Bond (2002). "A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants." Antonie Van Leeuwenhoek **81**(1-4): 681-691.

Carvalho, G., A. Oehmen, M. G. Albuquerque and M. A. Reis (2014). "The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses." New biotechnology **31**(4): 257-263.

Chen, G. (2010). *Plastics from bacteria, nature functions and application*, Berlin-Heidelberg: Springer.

Choi, J.-i. and S. Y. Lee (1997). "Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation." Bioprocess engineering **17**(6): 335-342.

Chua, A. S., H. Takabatake, H. Satoh and T. Mino (2003). "Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent." Water Research **37**(15): 3602-3611.

Ciesielski, S., T. Pokoj and E. Klimiuk (2008). "Molecular insight into activated sludge producing polyhydroxyalkanoates under aerobic-anaerobic conditions." Journal of industrial microbiology & biotechnology **35**(8): 805-814.

Çiğgin, A. S., D. Orhon, S. Rossetti and M. Majone (2011). "Short-term and long-term effects on carbon storage of pulse feeding on acclimated or unacclimated activated sludge." Water Research **45**(10): 3119-3128.

Cullander, C. (1999). "Fluorescent probes for confocal microscopy." Confocal Microscopy Methods and Protocols: 59-73.

Dias, J. M., P. C. Lemos, L. S. Serafim, C. Oliveira, M. Eiroa, M. G. Albuquerque, A. M. Ramos, R. Oliveira and M. A. Reis (2006). "Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product." Macromolecular bioscience **6**(11): 885-906.

Dionisi, D., M. Beccari, S. Di Gregorio, M. Majone, M. P. Papini and G. Vallini (2005). "Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **80**(11): 1306-1318.

Dionisi, D., M. Majone, C. Levantesi, A. Bellani and A. Fuoco (2006). "Effect of feed length on settleability, substrate uptake and storage in a sequencing batch reactor treating an industrial wastewater." Environmental technology **27**(8): 901-908.

Do Young Kim, H. W. K., M. G. Chung and Y. H. Rhee (2007). "Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates." The Journal of Microbiology: 87-97.

Etienne, P., N. Elisabeth and L. Yu (2012). Biodegradable Bioplastic from fermented sludge, waste, and effluents  
John Wiley & Sons, Inc.

Falvo, A., C. Levantesi, S. Rossetti, R. Seviour and V. Tandoi (2001). "Synthesis of

intracellular storage polymers by *Amaricoccus kaplicensis*, a tetrad forming bacterium present in activated sludge." Journal of applied microbiology **91**(2): 299-305.

Godoy, F., M. Vancanneyt, M. Martinez, A. Steinbüchel, J. Swings and B. Rehm (2003a). "Sphingopyxis chilensis sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov." International journal of systematic and evolutionary microbiology **53**(2): 473-477.

Grothe, E. and Y. Chisti (2000). "Poly ( $\beta$ -hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: behavior of fed-batch cultures." Bioprocess engineering **22**(5): 441-449.

Grothe, E., M. Moo-Young and Y. Chisti (1999). "Fermentation optimization for the production of poly ( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic." Enzyme and Microbial Technology **25**(1): 132-141.

Hanson, A. J., N. M. Guho, A. J. Paszczyński and E. R. Coats (2016). "Community proteomics provides functional insight into polyhydroxyalkanoate production by a mixed microbial culture cultivated on fermented dairy manure." Applied microbiology and biotechnology **100**(18): 7957-7976.

Hao, J., X. Wang and H. Wang (2017). "Investigation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis from mixed culture enriched by valerate-dominant hydrolysate." Frontiers of Environmental Science & Engineering **11**(1): 5.

Jiang, Y., M. Hebly, R. Kleerebezem, G. Muyzer and M. C. van Loosdrecht (2011c). "Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production." Water Research **45**(3): 1309-1321.



- Jiang, Y., L. Marang, R. Kleerebezem, G. Muyzer and M. van Loosdrecht (2011a). "Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture." Biotechnology and bioengineering **108**(9): 2022-2035.
- Jiang, Y., L. Marang, R. Kleerebezem, G. Muyzer and M. C. van Loosdrecht (2011b). "Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor." The ISME journal **5**(5): 896-907.
- Jiang, Y., L. Marang, J. Tamis, M. C. van Loosdrecht, H. Dijkman and R. Kleerebezem (2012). "Waste to resource: converting paper mill wastewater to bioplastic." Water Research **46**(17): 5517-5530.
- Johnson, K., Y. Jiang, R. Kleerebezem, G. Muyzer and M. C. van Loosdrecht (2009). "Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity." Biomacromolecules **10**(4): 670-676.
- Johnson, K., R. Kleerebezem and M. C. van Loosdrecht (2010a). "Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs." Water Research **44**(7): 2141-2152.
- Johnson, K., R. Kleerebezem and M. C. van Loosdrecht (2010b). "Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures." Journal of Biotechnology **147**(2): 73-79.
- Kanekar, P., A. Joshi, A. Kelkar, S. Borgave and S. Sarnaik (2007). "Alkaline Lonar lake, India—a treasure of alkaliphilic and halophilic bacteria." Proceedings of Taal **12**: 1765-1774.
- Kapuscinski, J. (1995). "DAPI: a DNA-specific fluorescent probe." Biotechnic & Histochemistry **70**(5): 220-233.

- Khan, S. T., Y. Horiba, M. Yamamoto and A. Hiraishi (2002). "Members of the family Comamonadaceae as primary poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach." Applied and environmental microbiology **68**(7): 3206-3214.
- Khumwanich, P., S. C. Napathorn and B. B. Suwannasilp (2014). "Polyhydroxyalkanoate production with a feast/famine feeding regime using sludge from wastewater treatment plants of the food and beverage industry." Journal of Biobased Materials and Bioenergy **8**(6): 641-647.
- Kleerebezem, R. and M. C. van Loosdrecht (2007). "Mixed culture biotechnology for bioenergy production." Current opinion in biotechnology **18**(3): 207-212.
- Kumar, M. S., S. Mudliar, K. Reddy and T. Chakrabarti (2004). "Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant." Bioresource technology **95**(3): 327-330.
- Lee, S. Y. (1996). "Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria." Trends in Biotechnology **14**(11): 431-438.
- Lee, S. Y. and J.-i. Choi (1998). "Effect of fermentation performance on the economics of poly (3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*." Polymer degradation and stability **59**(1): 387-393.
- Lemos, P. C., C. Levantesi, L. S. Serafim, S. Rossetti, M. A. Reis and V. Tandoi (2008). "Microbial characterisation of polyhydroxyalkanoates storing populations selected under different operating conditions using a cell-sorting RT-PCR approach." Applied microbiology and biotechnology **78**(2): 351-360.
- Lemos, P. C., L. S. Serafim and M. A. Reis (2006). "Synthesis of polyhydroxyalkanoates

from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding." Journal of Biotechnology **122**(2): 226-238.

Liebergesell, M., E. Hustede, A. Timm, A. Steinbüchel, R. C. Fuller, R. W. Lenz and H. G. Schlegel (1991). "Formation of poly (3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria." Archives of microbiology **155**(5): 415-421.

Liu, C., H. Wang, W. Xing and L. Wei (2013). "Composition diversity and nutrition conditions for accumulation of polyhydroxyalkanoate (PHA) in a bacterial community from activated sludge." Applied microbiology and biotechnology **97**(21): 9377-9387.

Liu, H.-Y., P. V. Hall, J. L. Darby, E. R. Coats, P. G. Green, D. E. Thompson and F. J. Loge (2008). "Production of polyhydroxyalkanoate during treatment of tomato cannery wastewater." Water Environment Research **80**(4): 367-372.

Liu, W.-T., S. Hanada, T. L. Marsh, Y. Kamagata and K. Nakamura (2002). "Kineosphaera limosa gen. nov., sp. nov., a novel Gram-positive polyhydroxyalkanoate-accumulating coccus isolated from activated sludge." International journal of systematic and evolutionary microbiology **52**(5): 1845-1849.

Liu, W. T., A. T. Nielsen, J. H. Wu, C. S. Tsai, Y. Matsuo and S. Molin (2001). "In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process." Environmental Microbiology **3**(2): 110-122.

Liu, Z., Y. Wang, N. He, J. Huang, K. Zhu, W. Shao, H. Wang, W. Yuan and Q. Li (2011). "Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis." Journal of hazardous materials **185**(1): 8-16.

- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner and K.-H. Schleifer (1992). "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions." Systematic and applied microbiology **15**(4): 593-600.
- Marchessault, R. (1996). "Tender Morsels for Bacteria-Recent Developments in Microbial Polyesters." Trends in Polymer Science **5**(4): 163-168.
- Matias, F., D. Bonatto, G. Padilla, M. F. d. A. Rodrigues and J. A. P. Henriques (2009). "Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil." Canadian journal of microbiology **55**(7): 790-800.
- Meesters, K., M. Van Loosdrecht and J. Heijnen (1998). "Production of poly-3-hydroxyalkanoates from waste streams." Report of Technical University of Delft, Delft.
- Moita, R. and P. Lemos (2012). "Biopolymers production from mixed cultures and pyrolysis by-products." Journal of Biotechnology **157**(4): 578-583.
- Moter, A. and U. B. Göbel (2000). "Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms." Journal of microbiological methods **41**(2): 85-112.
- Nielsen, P. H., H. Daims and H. Lemmer (2009). FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilm by FISH. London, UK, IWA Publishing.
- Oehmen, A., F. V. Pinto, V. Silva, M. G. Albuquerque and M. A. Reis (2014). "The impact of pH control on the volumetric productivity of mixed culture PHA production from fermented molasses." Engineering in Life Sciences **14**(2): 143-152.

- Oshiki, M., M. Onuki, H. Satoh and T. Mino (2013). "Microbial community composition of polyhydroxyalkanoate-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment plants operated in fully aerobic mode." Microbes and environments **28**(1): 96-104.
- Pantazaki, A. A., C. P. Papaneophytou, A. G. Pritsa, M. Liakopoulou-Kyriakides and D. A. Kyriakidis (2009). "Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8." Process Biochemistry **44**(8): 847-853.
- Papaneophytou, C. P. and D. A. Kyriakidis (2012). "Optimization of Polyhydroxyalkanoates Production from *Thermus thermophilus* HB8 Using Response Surface Methodology." Journal of Polymers and the Environment **20**(3): 760-773.
- Papaneophytou, C. P., E. E. Velali and A. A. Pantazaki (2011). "Purification and characterization of an extracellular medium-chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermus thermophilus* HB8." Polymer degradation and stability **96**(4): 670-678.
- Qi, Q. and B. H. Rehm (2001). "Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase." Microbiology **147**(12): 3353-3358.
- Queirós, D., P. C. Lemos, S. Rossetti and L. S. Serafim (2015). "Unveiling PHA-storing populations using molecular methods." Applied microbiology and biotechnology **99**(24): 10433-10446.
- Queirós, D., S. Rossetti and L. S. Serafim (2014). "PHA production by mixed cultures: a way to valorize wastes from pulp industry." Bioresource technology **157**: 197-205.

- Reis, M., L. Serafim, P. Lemos, A. Ramos, F. Aguiar and M. Van Loosdrecht (2003). "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures." Bioprocess and biosystems engineering **25**(6): 377-385.
- Salehizadeh, H. and M. Van Loosdrecht (2004). "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance." Biotechnology advances **22**(3): 261-279.
- Satoh, H., Y. Iwamoto, T. Mino and T. Matsuo (1998). "Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic." Water science and technology **38**(2): 103-109.
- Satoh, H., W. D. Ramey, F. A. Koch, W. K. Oldham, T. Mino and T. Matsuo (1996). "Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage." Water science and technology **34**(1): 9-16.
- Serafim, L., P. Lemos, S. Rossetti, C. Levantesi, V. Tandoi and M. Reis (2006). "Microbial community analysis with a high PHA storage capacity." Water science and technology **54**(1): 183-188.
- Serafim, L. S., P. C. Lemos, R. Oliveira and M. A. Reis (2004). "Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions." Biotechnology and bioengineering **87**(2): 145-160.
- Sheu, D.-S., Y.-T. Wang and C.-Y. Lee (2000). "Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR." Microbiology **146**(8): 2019-2025.
- Shi, H., M. Shiraishi and K. Shimizu (1997). "Metabolic flux analysis for biosynthesis of

poly ( $\beta$ -hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources." Journal of fermentation and bioengineering **84**(6): 579-587.

Spring, S., M. Wagner, P. Schumann and P. Kämpfer (2005). "Malikia granosa gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov." International journal of systematic and evolutionary microbiology **55**(2): 621-629.

Taroncher-Oldenburg, G., K. Nishina and G. Stephanopoulos (2000). "Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803." Applied and environmental microbiology **66**(10): 4440-4448.

Thayanukul, P., K. Zang, T. Janhom, F. Kurisu, I. Kasuga and H. Furumai (2010). "Concentration-dependent response of estrone-degrading bacterial community in activated sludge analyzed by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization." Water Research **44**(17): 4878-4887.

Ueno, T., H. Satoh, T. Mino and T. Matsuo (1993). "Production of biodegradable plastics." Polym Preprints Jpn **42**(9): 3673-3675.

Volova, T. G., N. O. Zhila, G. S. Kalacheva, C. J. Brigham and A. J. Sinskey (2013). "Effects of intracellular poly (3-hydroxybutyrate) reserves on physiological-biochemical properties and growth of *Ralstonia eutropha*." Research in microbiology **164**(2): 164-171.

Wang, X., A. Oehmen, E. B. Freitas, G. Carvalho and M. A. Reis (2017a). "The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production." Water Research **112**: 269-278.

- Wang, Y., Y. Zhu, P. Gu, Y. Li, X. Fan, D. Song, Y. Ji and Q. Li (2017b). "Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial community from propylene oxide saponification wastewater residual sludge." International journal of biological macromolecules **98**: 34-38.
- Weiner, R. M., R. A. DEVINE, D. M. POWELL, L. DAGASAN and R. L. MOORE (1985). "Hyphomonas oceanitis sp. nov., Hyphomonas hirschiana sp. nov., and Hyphomonas jannaschiana sp. nov." International journal of systematic and evolutionary microbiology **35**(3): 237-243.
- Witholt, B. and B. Kessler (1999). "Perspectives of medium chain length poly (hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics." Current opinion in biotechnology **10**(3): 279-285.
- Woraittinun, N. and B. B. Suwannasilp (2017). "polyhydroxyalkanoate production from different carbon substrates using sludge from a wastewater treatment plant: Microbial communities, polymer compositions, and thermal characteristics." Environmental Progress & Sustainable Energy: n/a-n/a.
- Zengin, G. E., N. Artan, D. Orhon, A. S. Chua, H. Satoh and T. Mino (2010). "Population dynamics in a sequencing batch reactor fed with glucose and operated for enhanced biological phosphorus removal." Bioresource technology **101**(11): 4000-4005.
- ขวัญเนตร สมบัติสมภพ (2551). การบำบัดน้ำเสียด้วยระบบเอสบีอาร์. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. ปีที่ **18** ฉบับที่ **3**: หน้า 96-103.
- เฉลิมราช วันทวิน และ อรรณพ ฤทธิปัญญาวงศ์ (2545). การสังเคราะห์พีเอชเอในเซลล์จุลินทรีย์จากระบบปฏิกรณ์สลับเป็นกะโดยใช้สารอาหารอะซิเตตและกลูโคส. วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ปีที่ **25** ฉบับที่ **4**: หน้า 323-334.



ธนาวดี ลี้จากภัย (2549). พลาสติกย่อยสลายได้เพื่อสิ่งแวดล้อม. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์.

วีระพงศ์ ลulitanนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว (2551). พื้นฐานเทคนิค Polymerase chain reaction. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น: 15 หน้า.

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล (2547). PHA : พลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรีย. บทความพิเศษส่งเสริมเทคโนโลยี. ปี 2535 ฉบับที่ 202: หน้า 66-72.

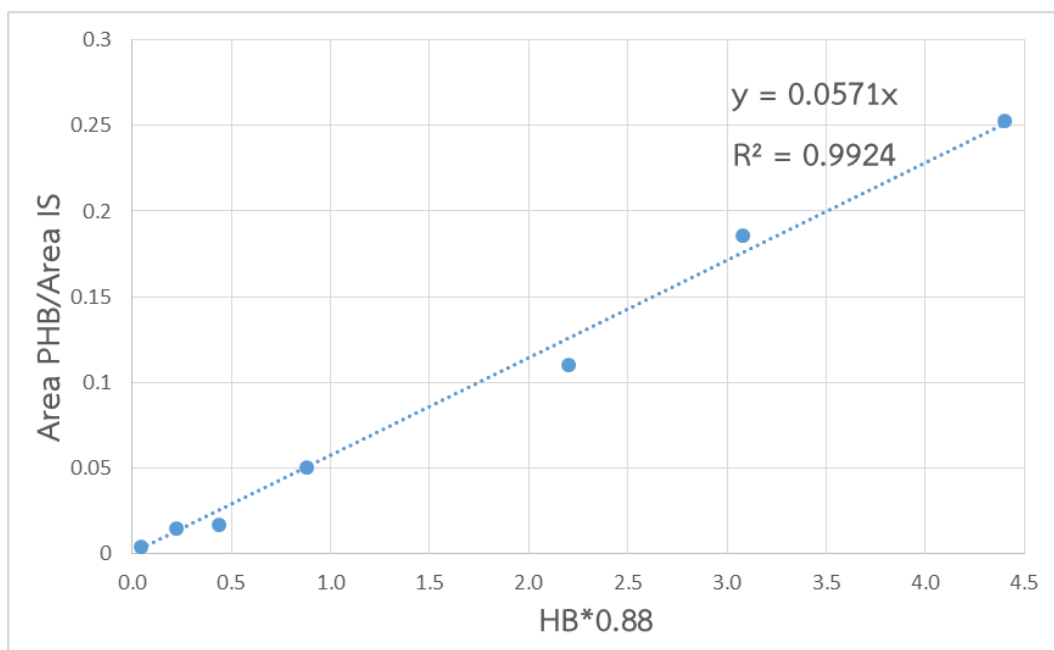
เศารยา กิจพ่อค้า (2557). ผลของอายุตะกอนต่อการผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมโดยการให้อาหารแบบเกินพอสลั้กับขาดแคลน. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. มหาบัณฑิต: 128 หน้า.

อัมทิกา เมืองวงษ์ (2553). การผลิตโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. มหาบัณฑิต.



## การศึกษาการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชเอในถังปฏิกรณ์

กราฟมาตรฐานเอชบีโมโนเมอร์



ตารางที่ 1 ปริมาณพีเอชเอ (% gPHA/gMLSS) ในแต่ละรอบ

รอบที่	ชั่วโมงที่						
	0	2	4	6	8	24	48
PHA							
1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
4	1.7	9.3	14.4	14.2	11.0	1.3	1.0
8	2.5	12.1	11.7	10.1	9.2	7.6	5.0
12	2.8	27.7	32.3	29.6	12.4	6.2	3.7
15	3.4	21.0	26.4	19.4	14.5	6.2	4.4
22	9.9	22.4	22.3	16.0	14.9	7.0	3.5
25	4.5	19.6	17.9	15.1	12.2	13.4	12.0
30	10.5	31.0	24.3	20.2	22.3	27.4	20.5
32	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1.3

N/A = no data

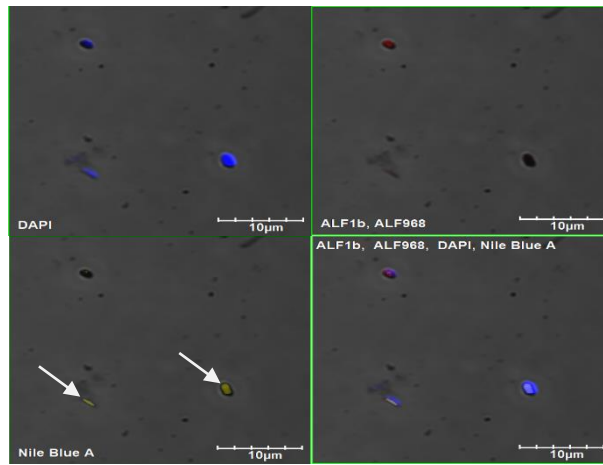
**การวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฟิเอชเอในถังปฏิกรณ์ด้วยเทคนิค FISH ร่วมกับการย้อมสีฟิเอชเอและการย้อมสี DAPI**

**Alphaproteobacteria Probe (ALF1b และ ALF968)**

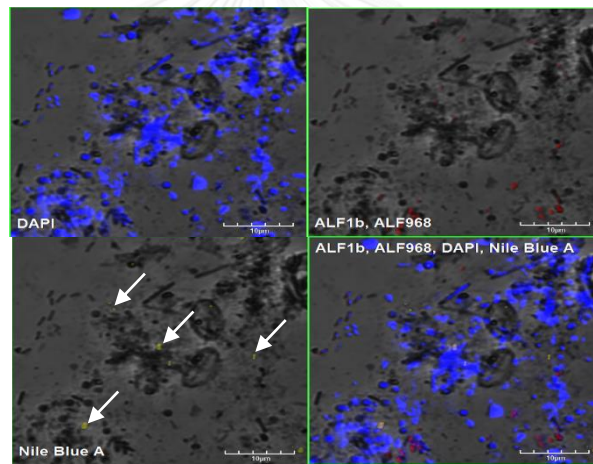
**ตารางที่ 2** จำนวนเซลล์ที่นับได้จาก *Alphaproteobacteria* Probe (ALF1b และ ALF968)

ภาพที่	ALF1b และ ALF 968				
	Number	DAPI	Cy3	Nile blue A	Match
1	A3	3	6	2	0
2	A4	331	17	15	0
3	A5	136	2	5	0
4	A6	109	17	2	0
5	A7	113	10	3	0
6	A9	154	23	4	0
7	A10	49	5	2	0
8	A12	51	23	3	0
9	A16	18	4	2	0
10	A17	17	1	2	0
11	A18	88	86	2	0
12	A19	5	1	1	0
13	A20	23	2	3	1
14	A21	53	38	2	0
15	A22	22	5	2	0
16	A23	76	31	1	0
17	A24	112	66	3	0
18	A25	52	12	2	0
19	A26	124	90	2	0
20	A27	36	29	1	0
	รวม	1572	468	59	1
	TotalDAPI	3132			

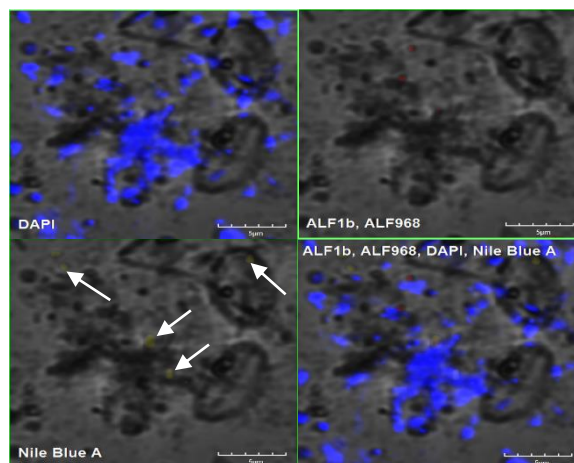
ภาพที่ 1 ALF1b และ ALF968 (A3)



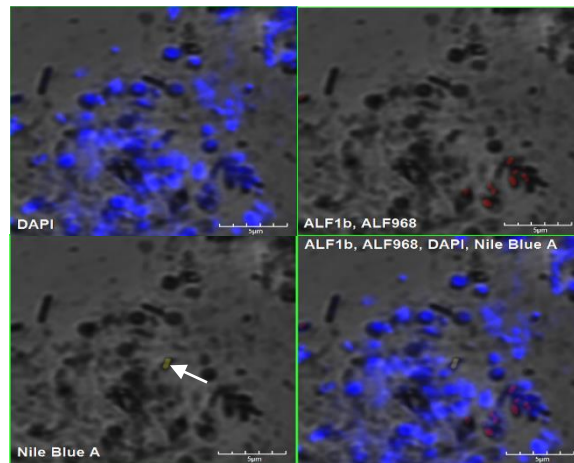
ภาพที่ 2 ALF1b และ ALF968 (A4)



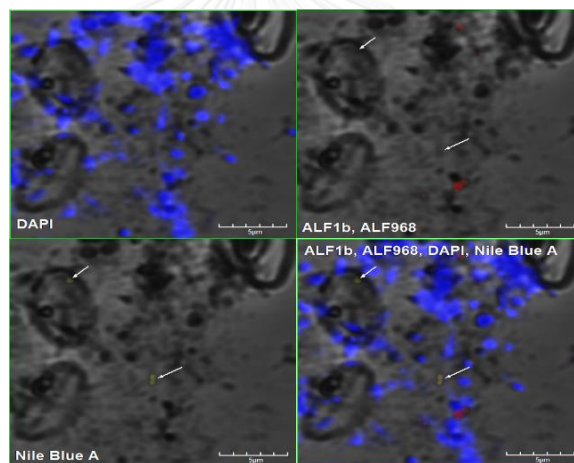
ภาพที่ 3 ALF1b และ ALF968 (A5)



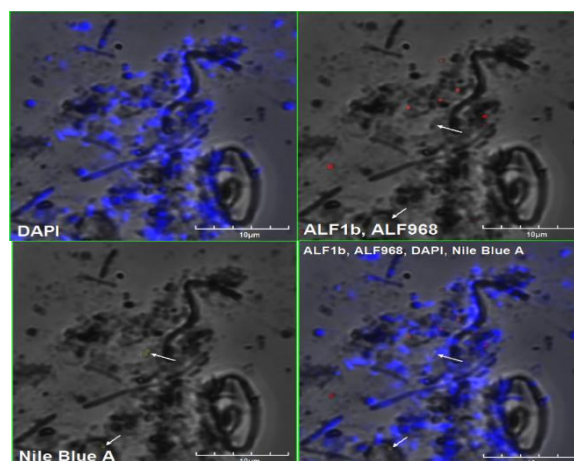
ภาพที่ 4 ALF1b และ ALF968 (A6)



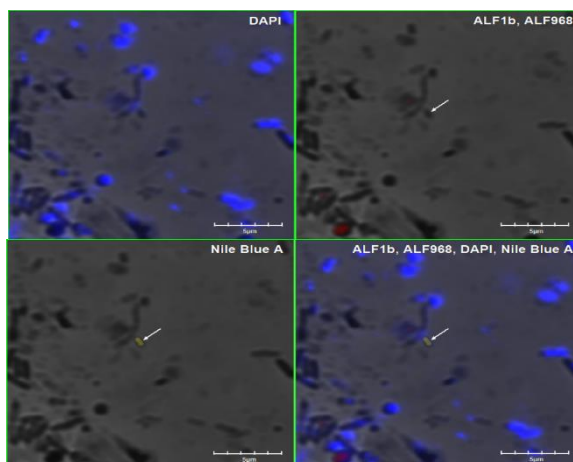
ภาพที่ 5 ALF1b และ ALF968 (A7)



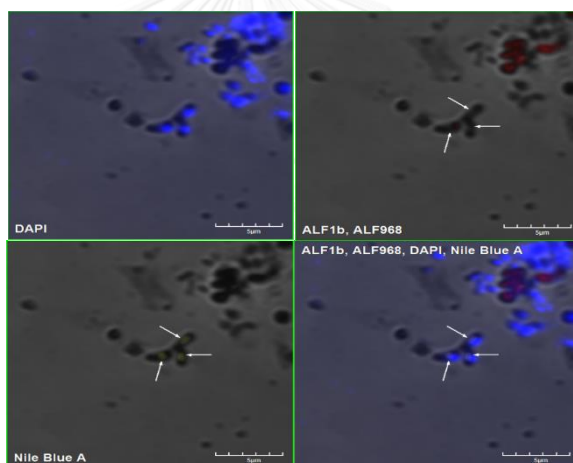
ภาพที่ 6 ALF1b และ ALF968 (A9)



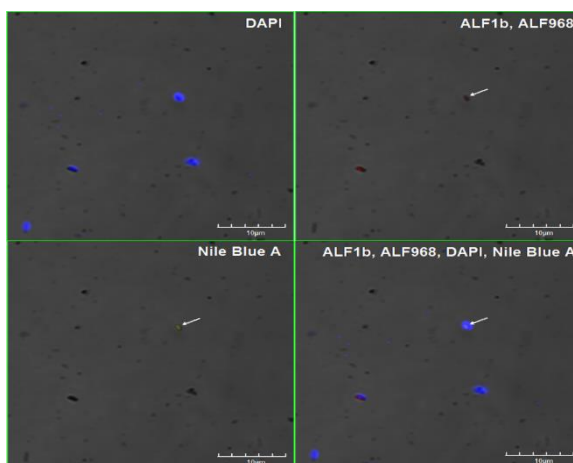
ภาพที่ 7 ALF1b และ ALF968 (A10)



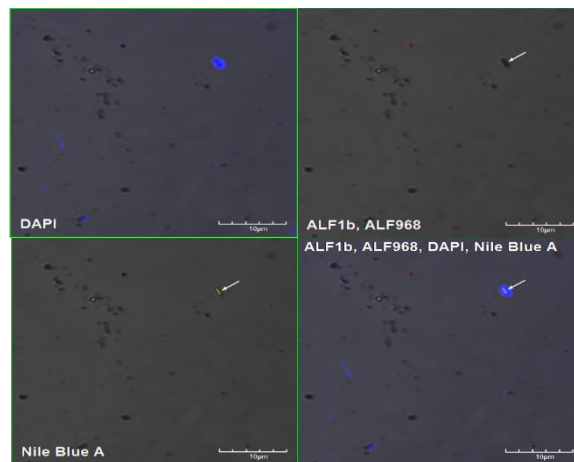
ภาพที่ 8 ALF1b และ ALF968 (A12)



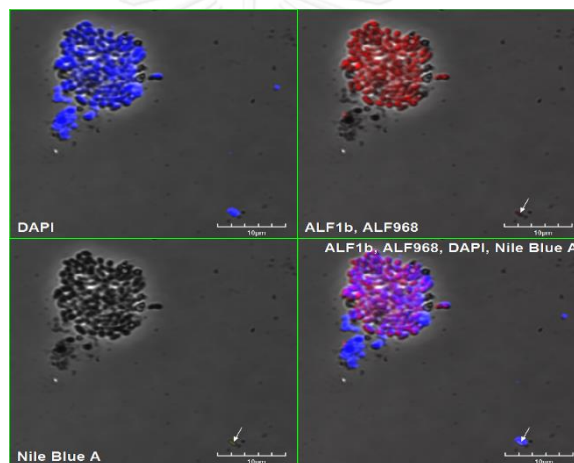
ภาพที่ 9 ALF1b และ ALF968 (A16)



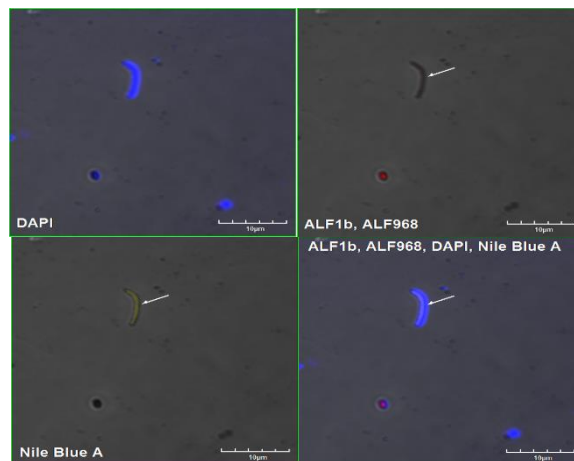
ภาพที่ 10 ALF1b และ ALF968 (A17)



ภาพที่ 11 ALF1b และ ALF968 (A18)

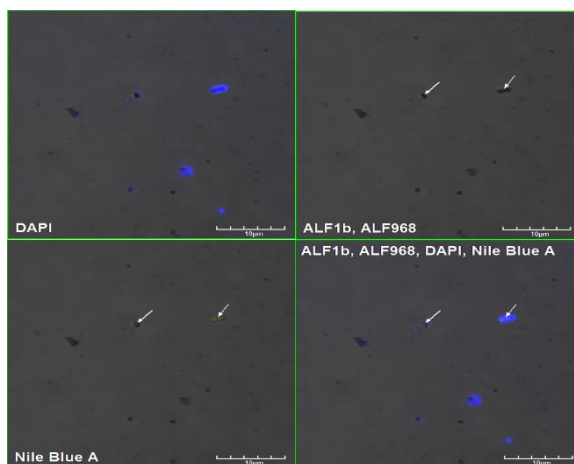


ภาพที่ 12 ALF1b และ ALF968 (A19)

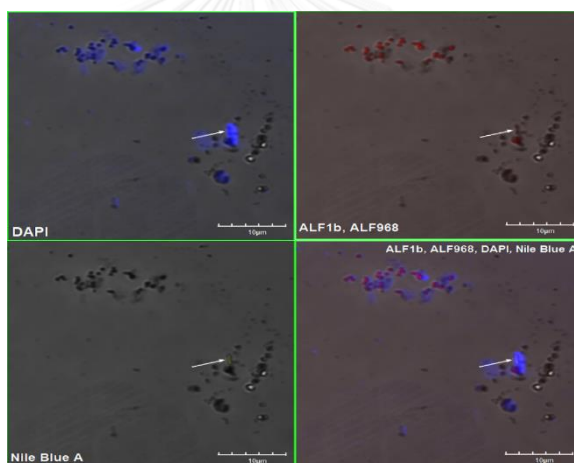




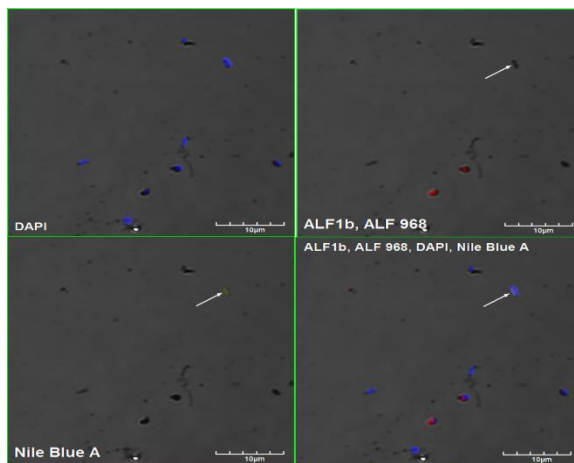
ภาพที่ 13 ALF1b และ ALF968 (A20)



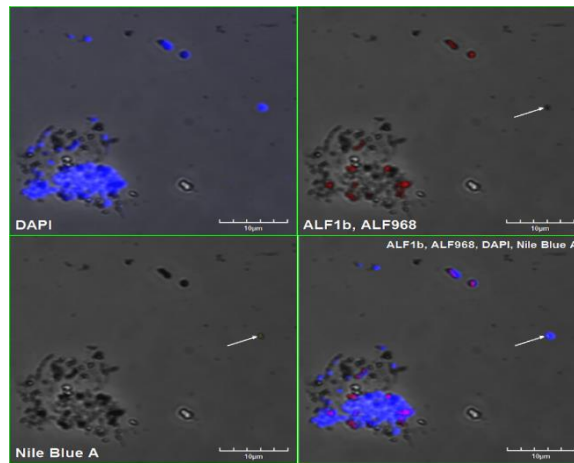
ภาพที่ 14 ALF1b และ ALF968 (A21)



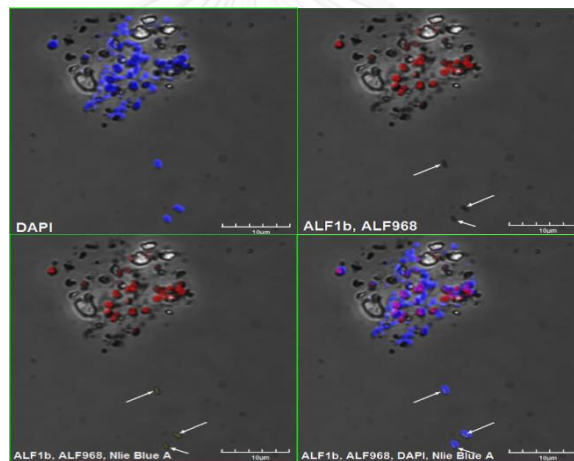
ภาพที่ 15 ALF1b และ ALF968 (A22)



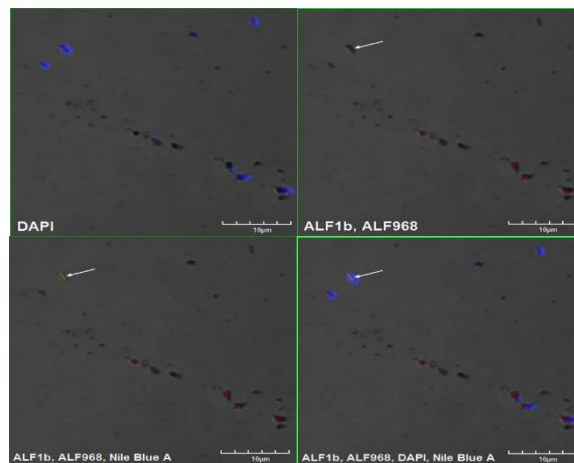
ภาพที่ 16 ALF1b และ ALF968 (A23)



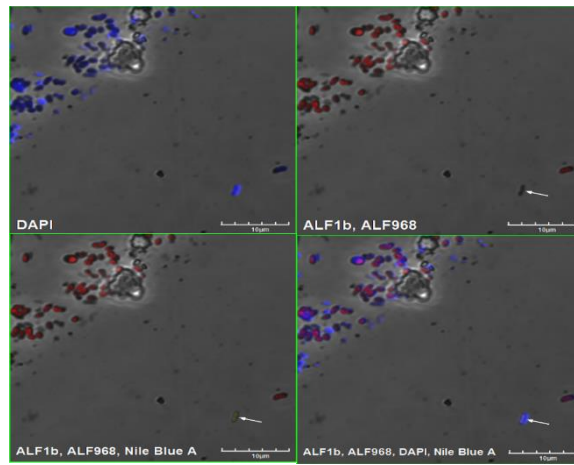
ภาพที่ 17 ALF1b และ ALF968 (A24)



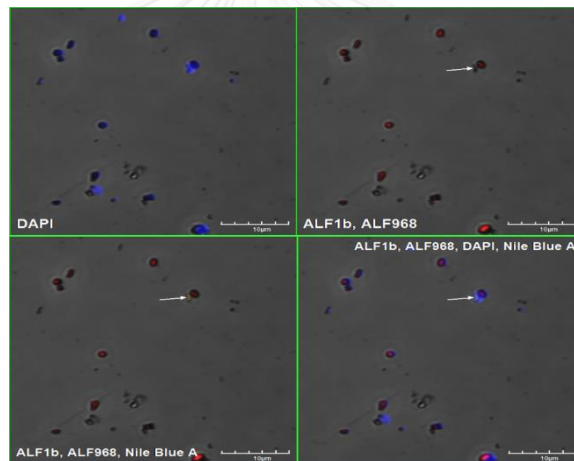
ภาพที่ 18 ALF1b และ ALF968 (A25)



ภาพที่ 19 ALF1b และ ALF968 (A26)



ภาพที่ 20 ALF1b และ ALF968 (A27)

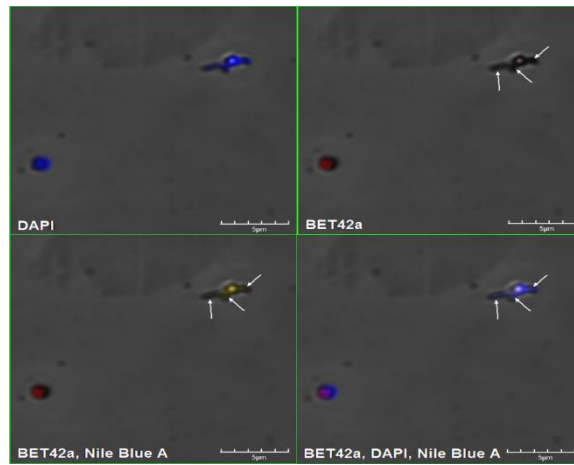


## Betaproteobacteria Probe (BET42a)

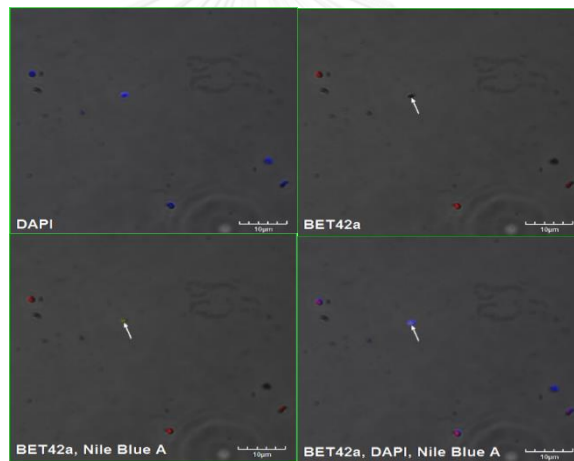
ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์ที่นับได้จาก Betaproteobacteria Probe (BET42a)

ภาพที่	BET42a				
	Number	DAPI	Cy3	Nile blue A	Match
1	B12	12	8	3	0
2	B15	20	6	1	0
3	B16	39	4	5	0
4	B17	36	7	9	6
5	B20	49	6	8	2
6	B22	12	4	2	2
7	B23	42	17	3	0
8	B24	27	13	1	0
9	B26	34	16	1	0
10	B28	20	3	2	0
11	B29	45	25	2	0
12	B30	24	2	20	0
13	B31	54	25	4	0
14	B32	120	83	2	0
15	B33	150	113	4	0
16	B34	30	18	3	0
17	B35	35	9	3	0
18	B36	22	14	6	0
19	B37	28	18	2	0
20	B38	29	9	2	0
	รวม	<b>828</b>	<b>400</b>	<b>83</b>	<b>10</b>

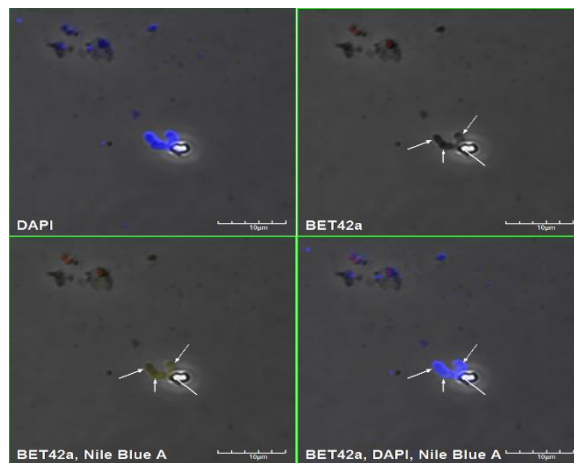
ภาพที่ 1 BET42a (B12)



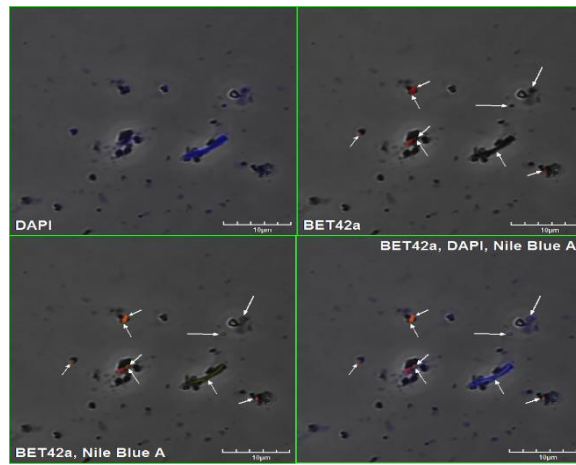
ภาพที่ 2 BET42a (B15)



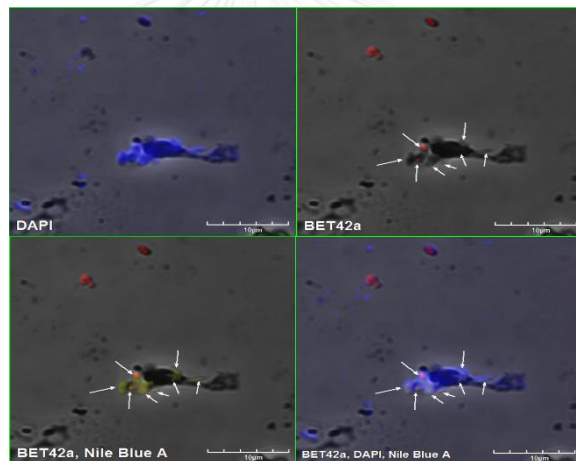
ภาพที่ 3 BET42a (B16)



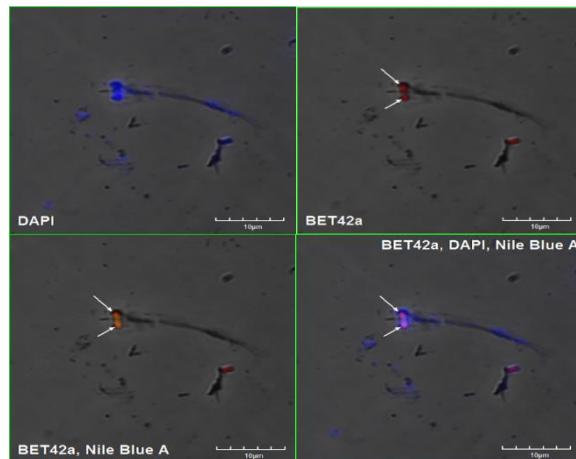
ภาพที่ 4 BET42a (B17)



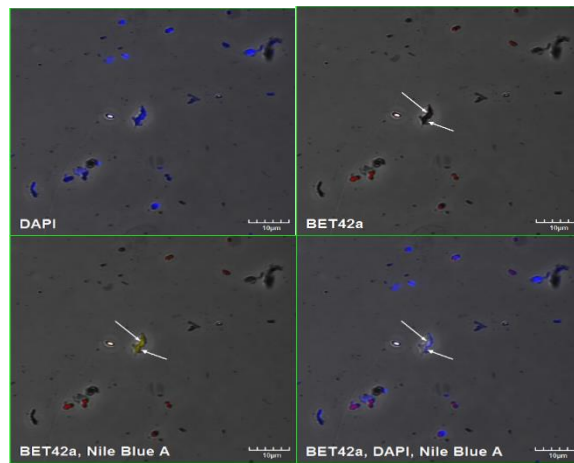
ภาพที่ 5 BET42a (B20)



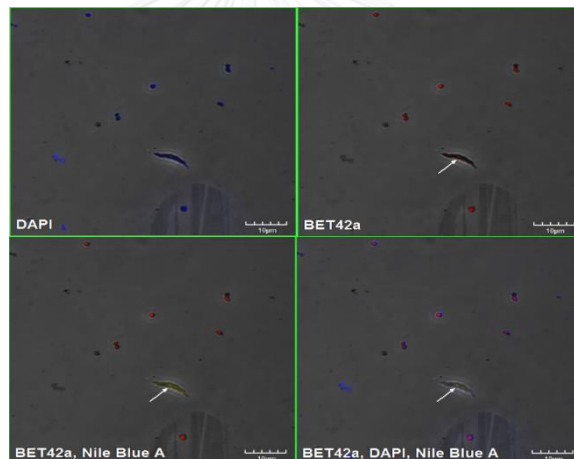
ภาพที่ 6 BET42a (B22)



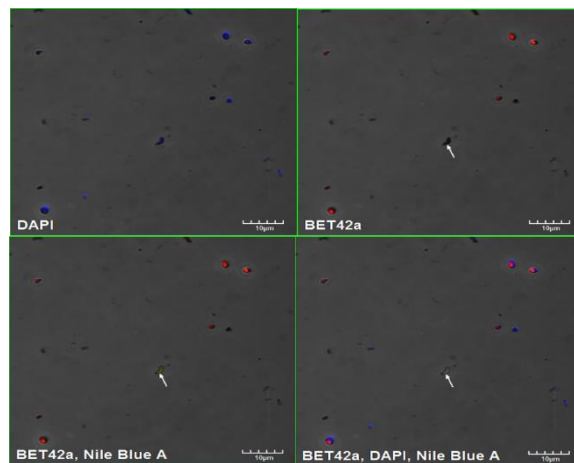
ภาพที่ 7 BET42a (B23)



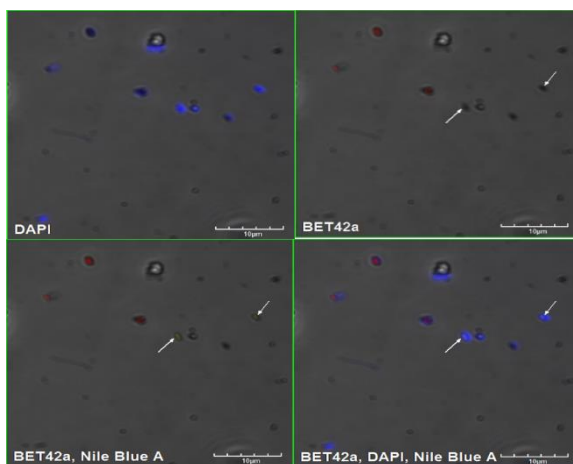
ภาพที่ 8 BET42a (B24)



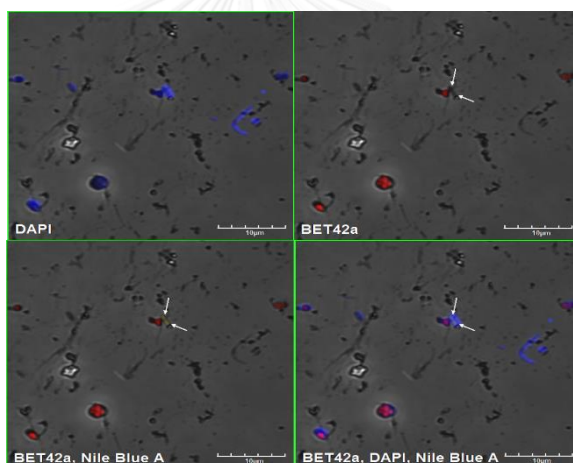
ภาพที่ 9 BET42a (B26)



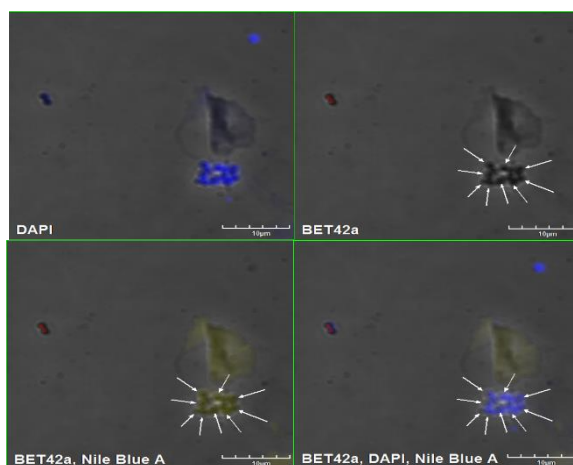
ภาพที่ 10 BET42a (B28)



ภาพที่ 11 BET42a (B29)

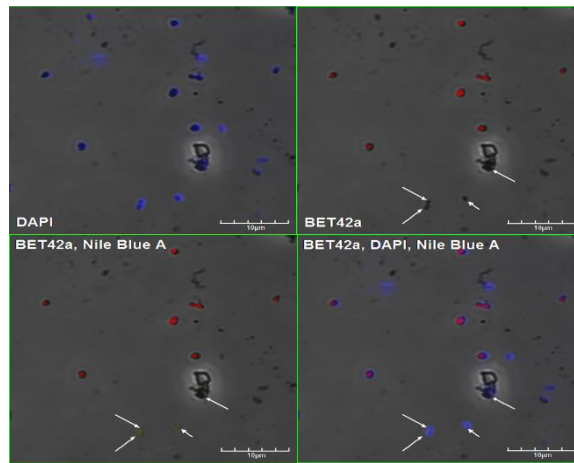


ภาพที่ 12 BET42a (B30)

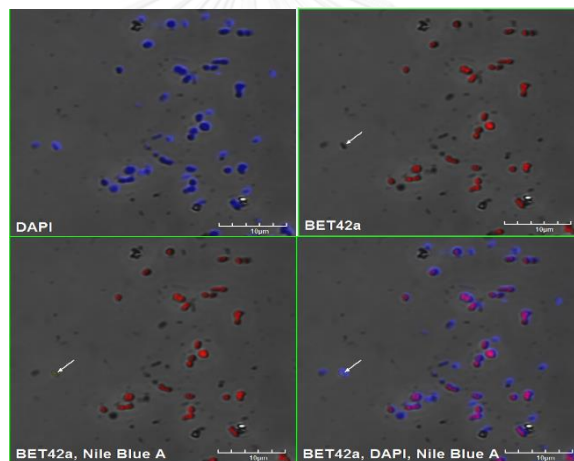




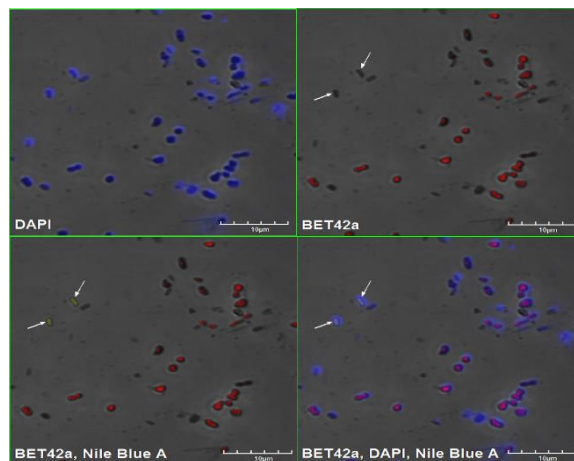
ภาพที่ 13 BET42a (B31)



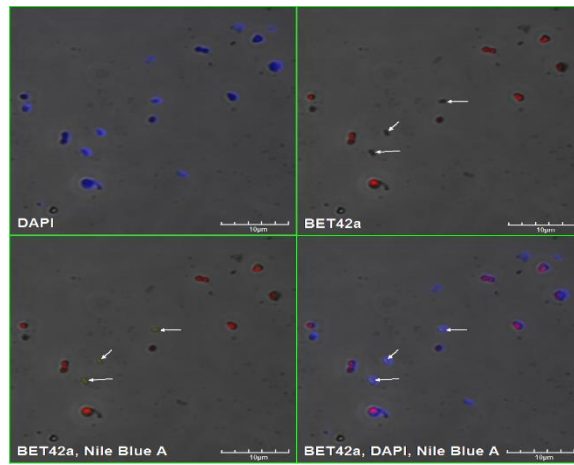
ภาพที่ 14 BET42a (B32)



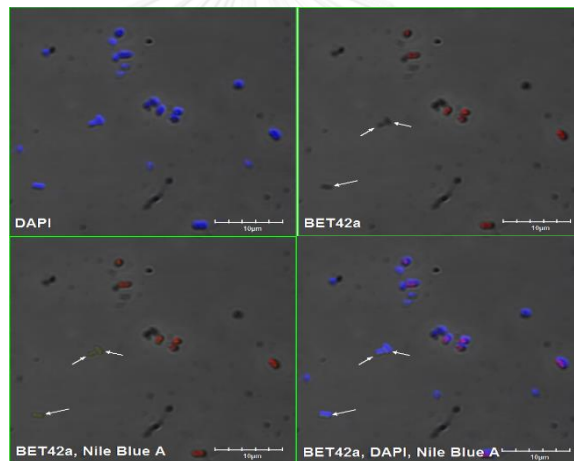
ภาพที่ 15 BET42a (B33)



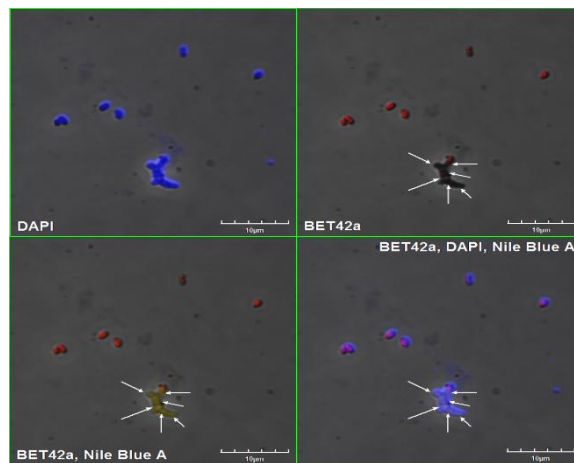
ภาพที่ 16 BET42a (B34)



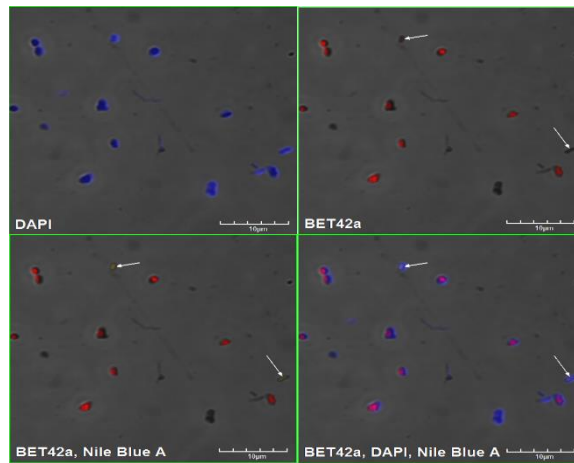
ภาพที่ 17 BET42a (B35)



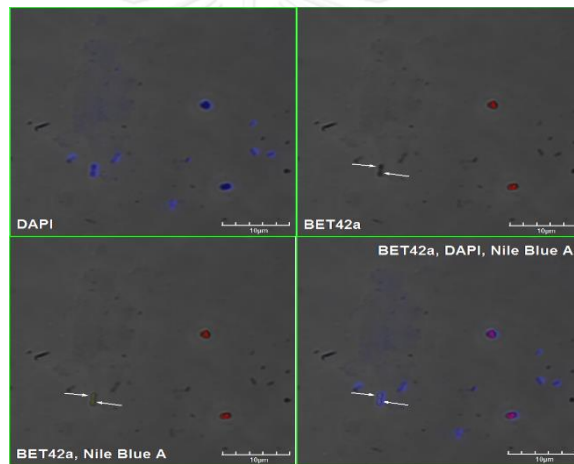
ภาพที่ 18 BET42a (B36)



ภาพที่ 19 BET42a (B37)



ภาพที่ 20 BET42a (B38)

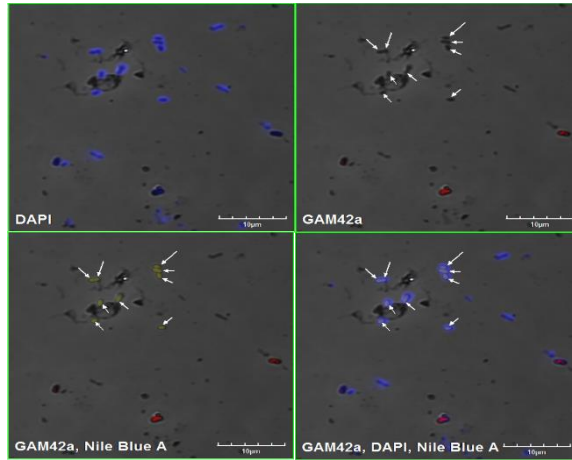


### Gammaproteobacteria Probe (GAM42a)

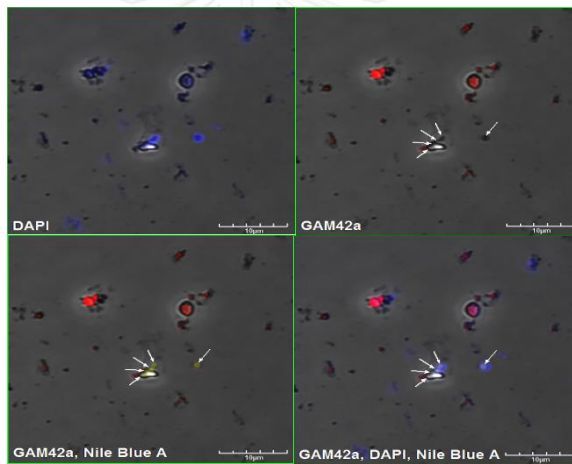
ตารางที่ 4 จำนวนเซลล์ที่นับได้จาก Gammaproteobacteria Probe (GAM42a)

ภาพที่	GAM42a				
	Number	Dapi	Cy3	Nile blue A	Match
1	G1	32	8	10	0
2	G3	52	43	5	0
3	G4	78	44	1	0
4	G5	85	30	1	0
5	G7	49	6	22	0
6	G8	21	14	3	0
7	G9	25	4	8	0
8	G10	34	20	7	0
9	G11	26	9	5	0
10	G12	42	15	3	0
11	G13	12	1	10	0
12	G14	20	6	2	0
13	G16	23	11	3	0
14	G17	33	13	3	0
15	G18	25	7	9	0
16	G19	54	25	2	0
17	G20	26	8	3	0
18	G21	28	17	3	0
19	G25	16	3	6	0
20	G28	51	25	4	0
	รวม	<b>732</b>	<b>309</b>	<b>110</b>	<b>0</b>

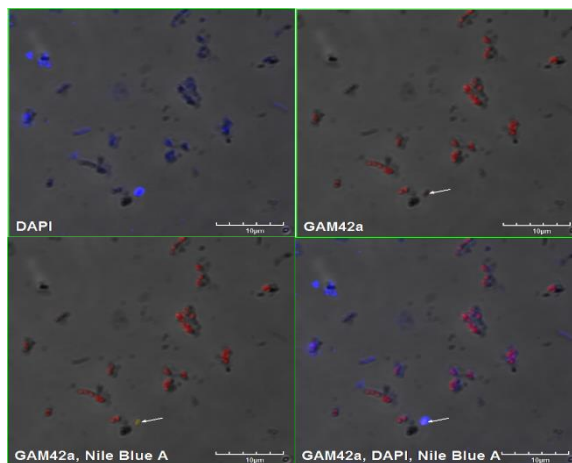
ภาพที่ 1 GAM42a (G1)



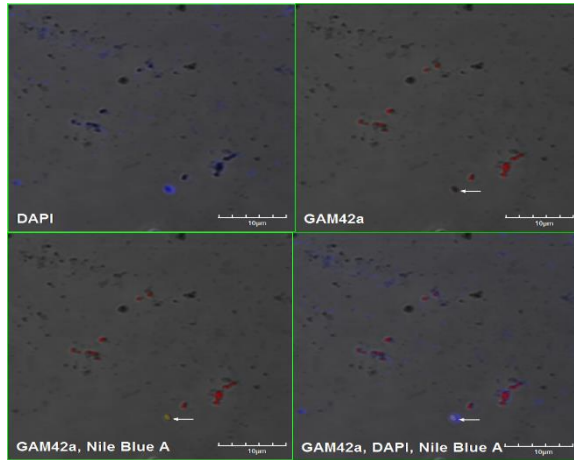
ภาพที่ 2 GAM42a (G3)



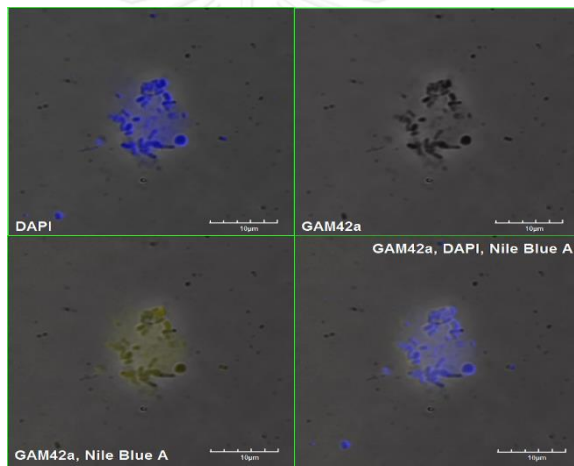
ภาพที่ 3 GAM42a (G4)



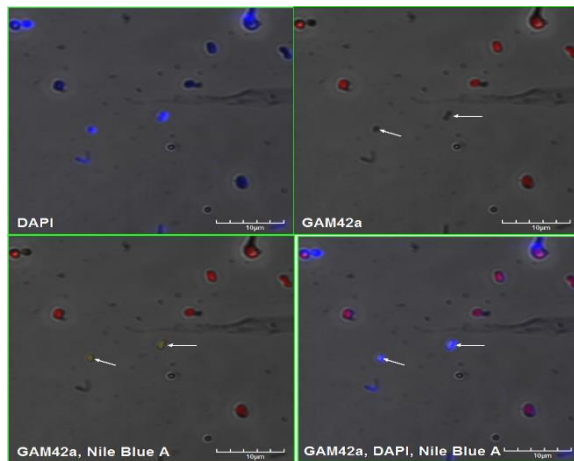
ภาพที่ 4 GAM42a (G5)



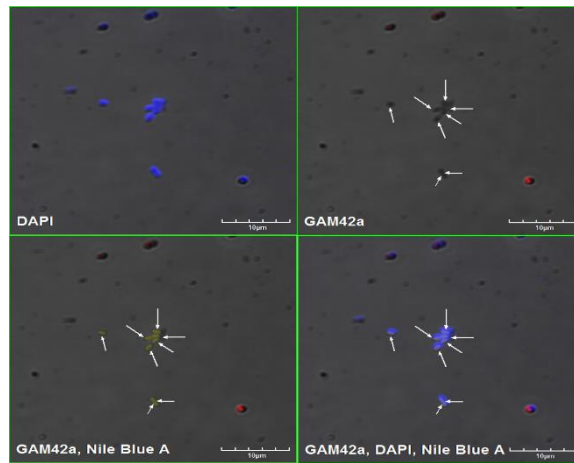
ภาพที่ 5 GAM42a (G7)



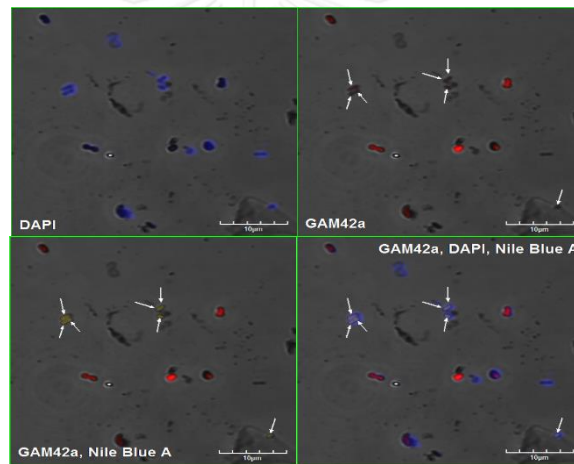
ภาพที่ 6 GAM42a (G8)



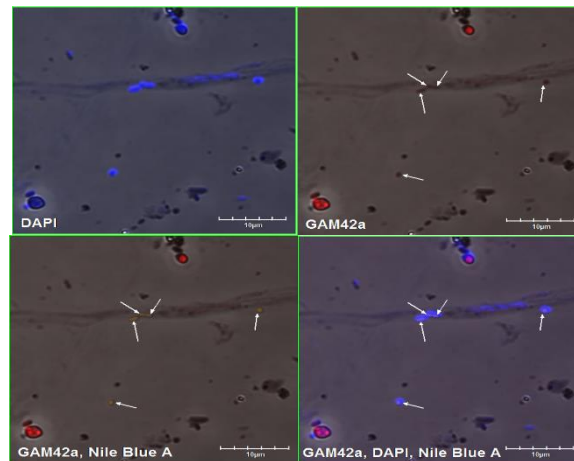
ภาพที่ 7 GAM42a (G9)



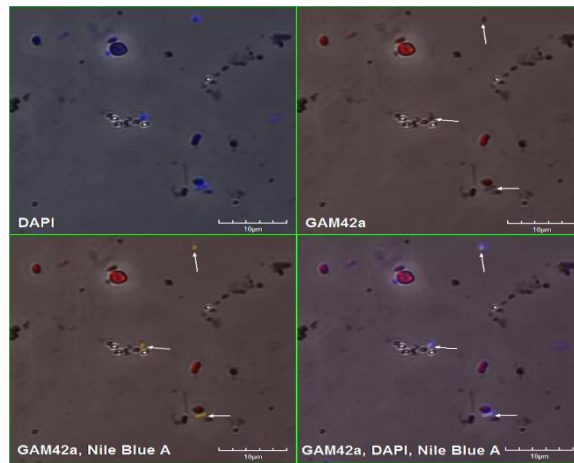
ภาพที่ 8 GAM42a (G10)



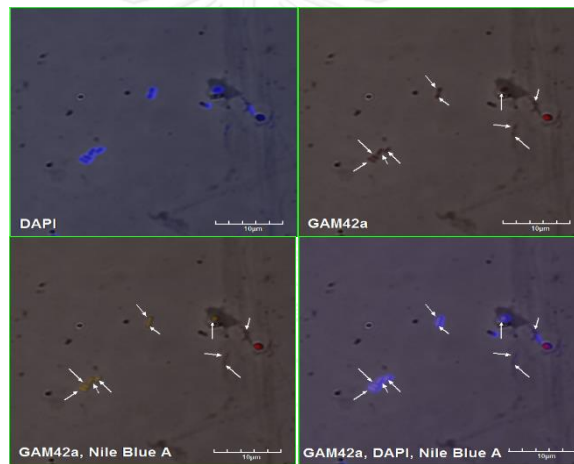
ภาพที่ 9 GAM42a (G11)



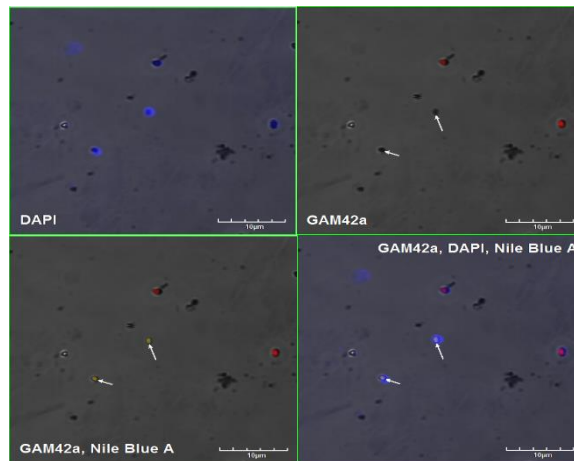
ภาพที่ 10 GAM42a (G12)



ภาพที่ 11 GAM42a (G13)



ภาพที่ 12 GAM42a (G14)





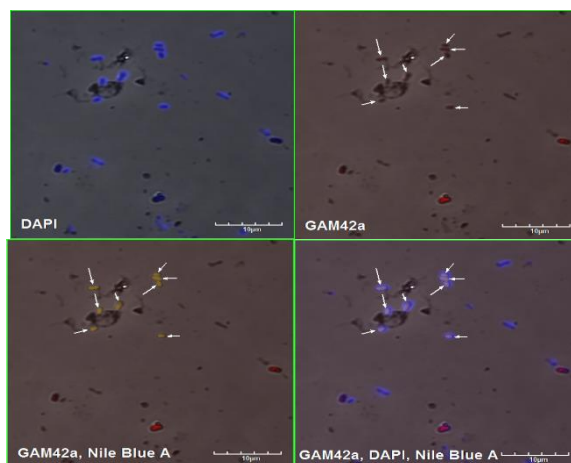
ภาพที่ 13 GAM42a (G16)



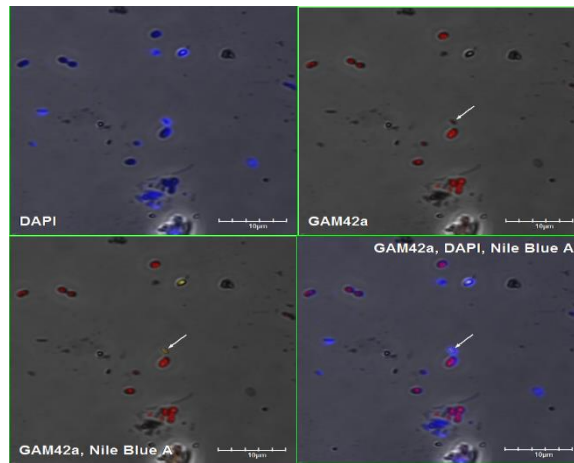
ภาพที่ 14 GAM42a (G17)



ภาพที่ 15 GAM42a (G18)



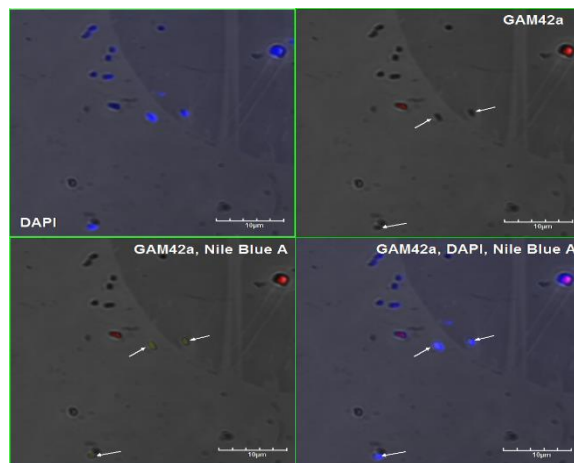
ภาพที่ 16 GAM42a (G19)



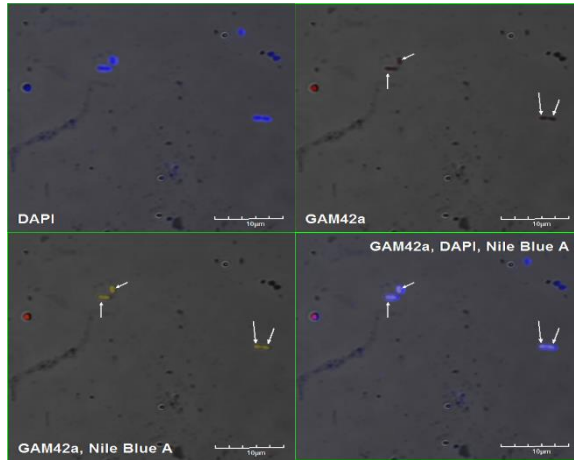
ภาพที่ 17 GAM42a (G20)



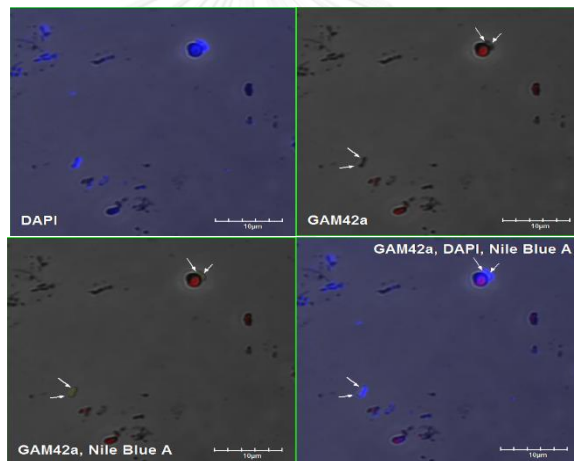
ภาพที่ 18 GAM42a (G21)



ภาพที่ 19 GAM42a (G25)



ภาพที่ 20 GAM42a (G28)



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวดลหทัย สรววมศิริ เกิดวันที่ 12 มิถุนายน 2534 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (เกียรตินิยมอันดับ 2) ในปี 2556 จากนั้นเข้าศึกษาหลักสูตรภาษาอังกฤษระยะสั้นเป็นเวลา 6 เดือนที่เมืองซิดนีย์ ประเทศออสเตรเลีย (เดือนมกราคมถึงมิถุนายน ปี 2557) และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2557 เดือนสิงหาคม

#### การเผยแพร่วิทยานิพนธ์

ดลหทัย สรววมศิริ ภริณดา ทยานุกูล และเบญจพร สุวรรณศิลป์. (2560). กลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตพีเอชเอในตะกอนจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมภายใต้สภาวะการให้อาหารแบบเกินพอสลับกับขาดแคลน (Groups of Microorganisms that Produced PHA in Mixed Microbial Cultures under Feast/Famine Feeding Condition). เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 16 ณ โรงแรมทวินทาวเวอร์ กรุงเทพมหานคร. 17-18 พฤษภาคม 2560. หน้า 19-20.