

การแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลจาก
บริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรี

ISOLATION OF BUTANOL PRODUCING *Clostridium* spp.
FROM AGRICULTURAL AREA IN CHONBURI PROVINCE



โครงการพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลจาก
บริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรี

ISOLATION OF BUTANOL PRODUCING *Clostridium* spp.
FROM AGRICULTURAL AREA IN CHONBURI PROVINCE



โครงการพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF BUTANOL PRODUCING *Clostridium* spp.
FROM AGRICULTURAL AREA IN CHONBURI PROVINCE



A SPECIAL PROJECT REPORT SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลจากบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรี
Isolation of butanol producing *Clostridium* spp. from agricultural area in Chonburi province

ชื่อนักศึกษา นางสาวพลอยไพลิน บางทราย รหัสนักศึกษา 56051033
นางสาวมนทกานติ คัดสม รหัสนักศึกษา 56051052
นายสรารุช จิตรอาษา รหัสนักศึกษา 56051085

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ	
ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การแยกเชื้อ <i>Clostridium</i> spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลจากบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรี
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพลอยไพลิน บางทราย รหัสนักศึกษา 56051033 นางสาวมนทกานติ คัดสม รหัสนักศึกษา 56051052 นายสรารุช จิตรอาษา รหัสนักศึกษา 56051085
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะ เป็น *Clostridium* spp. จากแหล่งดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรีที่มีคุณสมบัติในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยคัดแยกแบคทีเรียได้ 129 ไอโซเลท จากแหล่งดิน 15 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่คาดว่าจะ เป็น *Clostridium* spp. จำนวน 54 ไอโซเลท โดยมีทั้งหมด 14 ไอโซเลท ได้แก่ CN 1.22, CN 1.23, MG 1.21, MG 1.32, MG 2.11, MG 2.12, MG 2.22, MG 2.23, MA 2.14, MA 2.22, MA 2.32, FR 1.32 FR 2.21 และ FR 2.32 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ได้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้เครื่องตรวจวัดแบบดัชนีหักเหแล้ว พบว่า CN 1.22 ผลิตปริมาณบิวทานอลมากที่สุด คือ 0.2453 กรัมต่อลิตร CN 1.23 สร้างอะซิโตนความเข้มข้นมากที่สุด คือ 2.0966 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ MA 2.32 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 0.5388 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมสูงสุดคือ CN 1.22 เท่ากับ 2.2733 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วยอะซิโตน 1.9230 กรัมต่อลิตร บิวทานอล 0.2453 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.1050 กรัมต่อลิตร เนื่องจากอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่บิวทานอลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ การเคลื่อนที่ การสร้างแก๊ส การทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโทส เซลโลไบโอส และไซโลส การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและเอนไซม์ไฮโดรโมอกซิเดส พบว่า MG 2.12 MG 2.23 และ MA 2.14 มีคุณสมบัติดังกล่าวใกล้เคียงกับ *Clostridium* spp. มากที่สุด และพบว่า CN 1.22 สามารถย่อยน้ำตาลมอลโทส ไซโลส เซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังสร้างแก๊สในระหว่างการเจริญเติบโต มีการเคลื่อนที่ มีการสร้างเอนไซม์แคตาเลส แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรโมอกซิเดส

คำสำคัญ : การคัดแยก คอลอสตรีเคียม บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of butanol producing <i>Clostridium</i> spp. from agricultural area in Chonburi province
Students	Miss Ploypailin Bangsai Student ID 56051033 Miss Monthakan Kidsom Student ID 56051052 Mr. Sarawut Chitasa Student ID 56051085
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.

Abstract

This research's objective was to isolate bacteria assuming to be *Clostridium* spp., which have ability to produce organic solvents (acetone butanol ethanol) from agricultural area in Chonburi province. From screening result, 129 isolates were obtained from 15 sources of soil, however, only 54 isolates could be *Clostridium* spp. From these 54 isolates, 14 isolates (CN 1.22, CN 1.23, MG 1.21, MG 1.32, MG 2.11, MG 2.12, MG 2.22, MG 2.23, MA 2.14, MA 2.22, MA 2.32, FR 1.32 FR 2.21 and FR 2.32) were gram positive, rod shaped and spore forming. When analyzing the concentrations of acetone butanol butanol (ABE) using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), CN 1.22 produced the maximum level of butanol (0.2453 g/L). of the highest concentration of acetone was 2.0966 g/L obtained from CN 1.23. MA 2.32 produced the maximum concentration ethanol (0.5388 g/L). However, the highest ABE concentration was achieved from CN 1.22 (2.2733 g/L: 1.9230 g/L acetone, 0.2453 g/L butanol and 0.1050 g/L ethanol). This concentration of ABE had no significant difference with CN 1.23, but the concentration of butanol from CN 1.22 and CN 1.23 had significant difference. Afterwards, the biochemical characteristics of 14 isolates were tested for motility, gas producing, maltose xylose and cellobiose fermentation ability, catalase test and oxidase test. It has been found that MG 2.12 MG 2.23 and MA 2.14 had the biochemical characteristics closed to *Clostridium* spp., CN 1.22 can hydrolyze maltose xylose and cellobiose, produce gas during their growing , motile and enzyme catalase producing but can't produce enzyme oxidase

Keywords : Isolation, *Clostridium* spp., Acetone, Butanol, Ethanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากหลายๆฝ่าย โดยเฉพาะอาจารย์ที่ปรึกษาคือ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ซึ่งได้ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงาน คอยให้คำแนะนำและความคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานอีกด้วย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างยิ่งและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานและกรรมการสอบ ซึ่งได้ช่วยชี้แนะเกี่ยวกับการจัดทำรูปเล่มของโครงการ รวมถึงส่วนของเนื้อหาให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณมาก กองแก้ว เจ้าของสวนลำไย คุณชนนพิศ บุญทวี เจ้าของไร่ข้าวโพด และ หจก.คุณอนันต์ บริการ เป็นอย่างสูง สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่างดิน เพื่อนำไปใช้ในการวิจัย และทำให้วิทยานิพนธ์เรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวบุษบา บัวเขียว สำหรับข้อแนะนำและความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่เปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือ แนะนำ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา จนสำเร็จการศึกษา

พลอยไพลิน บางทราย
มนทกานติ คิตสม
สรารุช จิตรอาษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 บิวทานอล	3
2.1.1 ข้อมูลทั่วไป	3
2.1.2 คุณสมบัติทั่วไปของบิวทานอล	3
2.1.3 การผลิตไบโอบิวทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ	3
2.1.4 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลว	4
2.1.5 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้	5
2.2 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE fermentation)	6
2.2.1 ประวัติและที่มา	6
2.2.2 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the Fermentation)	6
2.3 <i>Clostridium</i> spp.	9
2.3.1. อนุกรมวิธาน	9
2.3.1.1 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	10
2.3.1.2 <i>Clostridium beijerinckii</i>	11
2.3.1.3 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	12
2.4 การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อ <i>Clostridium</i> spp.	12
2.4.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส (Gas produced test)	12
2.4.2 การทดสอบการหมักน้ำตาล (Sugar fermentation test)	13
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	16
3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี	16
3.1.1 อุปกรณ์	16
3.1.2 สารเคมี	16
3.2 การเก็บตัวอย่าง	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 การเตรียมอาหาร	17
3.4 การคัดแยกเชื้อ	17
3.5 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย	18
3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล	18
3.7 การทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี (Biochemical test)	18
3.7.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส	18
3.7.2 การทดสอบการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส	18
3.7.3 การทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโทส	19
3.7.4 การทดสอบการหมักน้ำตาลไซโลส	19
3.7.5 การทดสอบการเคลื่อนที่	19
3.7.6 การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)	19
3.7.7 การทดสอบไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase test)	19
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ	19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	20
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดิน	20
4.2 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ	21
4.3 ค่าความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้	33
4.4 การทดสอบทางชีวเคมี	35
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	41
ภาคผนวก ก	42
ภาคผนวก ข	43
ภาคผนวก ค	47
ภาคผนวก ง	48
ภาคผนวก จ	49
ภาคผนวก ฉ	50
ภาคผนวก ช	85
ภาคผนวก ซ	99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล	4
2.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ <i>Clostridium</i> spp. สายพันธุ์ต่างๆ	13
4.1 สถานที่เก็บตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรี	20
4.2 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรีทั้งหมด 128 ไอโซเลท	22
4.3 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมที่วิเคราะห์ได้จากเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะเป็น <i>Clostridium</i> spp. 30 ไอโซเลท	34
4.4 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น <i>Clostridium</i> spp. 14 ไอโซเลท ซึ่งผ่านการทดสอบการย่อยน้ำตาลมอลโตส ไซโลส เซลโลไบโอส ทดสอบการสร้างแก๊ส ทดสอบการเคลื่อนที่ การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส และการทดสอบไฮโดโครมออกซิเดส	36
ช.1 พื้นที่ใต้กราฟตัวทำละลายอินทรีย์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง HPLC	85
ช.2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ทางสถิติ	88
ช.3 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลในรูปแบบตาราง ANOVA จากการวิเคราะห์สถิติ	92
ช.4 ความเข้มข้นของอะซิโตนเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan	93
ช.5 ความเข้มข้นของบิวทานอลเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan	94
ช.6 ความเข้มข้นของเอทานอลเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan	95
ช.7 ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan	97
ช.1 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น <i>Clostridium</i> spp.	99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล	3
2.2 กระบวนการผลิตไบโอบิวทานอล	4
2.3 (ก) กลไกของระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acetogenesis)	
(ข) กลไกของระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenesis)	7
2.4 ลักษณะของเชื้อ <i>Clostridium</i> spp.	10
2.5 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ <i>C. acetobutylicum</i>	10
2.6 ลักษณะโคโลนี <i>C. acetobutylicum</i> ที่ปรากฏบนอาหาร RCM	11
2.7 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ <i>C. beijerinckii</i>	11
2.8 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	12
ข.1 กราฟสารละลายมาตรฐานอะซีโตน	44
ข.2 กราฟสารละลายมาตรฐานบิวทานอล	45
ข.3 กราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอล	46
ง.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี Cross streak plate	48
ฉ.1 ลักษณะดินสวนลำใย 1	50
ฉ.2 ลักษณะดินสวนลำใย 2	50
ฉ.3 ลักษณะดินสวนลำใย 3	50
ฉ.4 ลักษณะดินไร่ข้าวโพด 1	51
ฉ.5 ลักษณะดินไร่ข้าวโพด 2	51
ฉ.6 ลักษณะดินไร่ข้าวโพด 3	51
ฉ.7 ลักษณะดินสวนผสม 1	52
ฉ.8 ลักษณะดินสวนผสม 2	52
ฉ.9 ลักษณะดินสวนผสม 3	52
ฉ.10 ลักษณะดินสวนฮวงซุ้ย 1	53
ฉ.11 ลักษณะดินสวนฮวงซุ้ย 2	53
ฉ.12 ลักษณะดินสวนฮวงซุ้ย 3	53
ฉ.13 ลักษณะดินป่า 1	54
ฉ.14 ลักษณะดินป่า 2	54
ฉ.15 ลักษณะดินป่า 3	54
ฉ.16 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.21	55
ฉ.17 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.31	55
ฉ.18 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.32	56
ฉ.19 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.33	56
ฉ.20 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.34	57
ฉ.21 ลักษณะโคโลนีของ CN 1.11	57
ฉ.22 ลักษณะโคโลนีของ CN 1.13	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ฉ.23 ลักษณะโคลนนิ่งของ CN 1.21	58
ฉ.24 ลักษณะโคลนนิ่งของ CN 1.22	59
ฉ.25 ลักษณะโคลนนิ่งของ CN 1.23	59
ฉ.26 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 1.21	60
ฉ.27 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 1.31	60
ฉ.28 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 1.32	61
ฉ.29 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 1.33	61
ฉ.30 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 2.11	62
ฉ.31 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 2.12	62
ฉ.32 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 2.21	63
ฉ.33 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 2.22	63
ฉ.34 ลักษณะโคลนนิ่งของ MG 2.23	64
ฉ.35 ลักษณะโคลนนิ่งของ MA 2.11	64
ฉ.36 ลักษณะโคลนนิ่งของ MA 2.13	65
ฉ.37 ลักษณะโคลนนิ่งของ MA 2.14	65
ฉ.38 ลักษณะโคลนนิ่งของ MA 2.22	66
ฉ.39 ลักษณะโคลนนิ่งของ MA 2.32	66
ฉ.40 ลักษณะโคลนนิ่งของ FR 1.32	67
ฉ.41 ลักษณะโคลนนิ่งของ FR 2.12	67
ฉ.42 ลักษณะโคลนนิ่งของ FR 2.21	68
ฉ.43 ลักษณะโคลนนิ่งของ FR 2.23	68
ฉ.44 ลักษณะโคลนนิ่งของ FR 2.31	69
ฉ.45 ลักษณะโคลนนิ่งของ FR 2.32	69
ฉ.46 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส LG 2.21	70
ฉ.47 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส LG 2.31	70
ฉ.48 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส LG 2.32	71
ฉ.49 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส LG 2.33	71
ฉ.50 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส LG 2.34	72
ฉ.51 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส CN 1.11	72
ฉ.52 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส CN 1.13	73
ฉ.53 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส CN 1.21	73
ฉ.54 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส CN 1.22	74
ฉ.55 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส CN 1.23	74
ฉ.56 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส MG 1.21	75
ฉ.57 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหัส MG 1.31	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ฉ.58 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MG 1.32	76
ฉ.59 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MG 1.33	76
ฉ.60 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MG 2.11	77
ฉ.61 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MG 2.12	77
ฉ.62 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MG 2.21	78
ฉ.63 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MG 2.22	78
ฉ.64 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MG 2.23	79
ฉ.65 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MA 2.11	79
ฉ.66 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MA 2.13	80
ฉ.67 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MA 2.14	80
ฉ.68 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MA 2.22	81
ฉ.69 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส MA 2.32	81
ฉ.70 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส FR 1.32	82
ฉ.71 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส FR 2.12	82
ฉ.72 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส FR 2.21	83
ฉ.73 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส FR 2.23	83
ฉ.74 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส FR 2.31	84
ฉ.75 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อรหีส FR 2.32	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัญหาสิ่งแวดล้อมและวิกฤตพลังงาน พลังงานทางเลือกเป็นทางออกที่น่าสนใจ เชื้อเพลิงทางเลือกเหลวซึ่งเป็นที่นิยมในขณะนี้ ได้แก่ เอทานอล และบิวทานอล บิวทานอลจัดเป็นเชื้อเพลิงหมุนเวียนที่ดี เนื่องจากให้พลังงานและสามารถผสมกับก๊าซโซลีนได้มากกว่าเอทานอลโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ บิวทานอลที่ผลิตกระบวนการผลิตทางชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์ได้ในอนาคตอันใกล้ ถึงแม้ว่าในขณะนี้ด้วยเหตุผลหลายประการ เอทานอลยังคงเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่นิยมในปัจจุบันมากกว่าก็ตาม อย่างไรก็ตาม บิวทานอลจัดเป็นสารที่มีข้อดีกว่าเอทานอลหลายประการ เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี รวมถึงคุณสมบัติทางระดับพลังงานที่ดีกว่าเอทานอล กล่าวคือ บิวทานอลมีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับก๊าซโซลีนมากกว่าเอทานอล นอกจากนี้ บิวทานอลมีความเป็นขี้ผึ้งต่ำกว่า จึงสามารถผสมกับก๊าซโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ การใช้บิวทานอลมีการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และการปล่อยสารพิษ NO_x ลดลงมากซึ่งเป็นเรื่องสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมของโลก (ชนิกา และคณะ, 2555)

คลอสทริเดียม (*Clostridium* spp.) จัดเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลในภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งกลมและรี สามารถพบได้ในรูปสปอร์กระจายทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ของเสีย ลำไส้ ของมนุษย์และสัตว์ มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะบิวทานอล นอกจากนี้ยังมีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายอื่น คือ อะซิโตนและเอทานอล เกิดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมกับบิวทานอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าและนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อีกด้วย (ชนิกา และคณะ, 2555) โดยกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เรียกว่า Acetone-Butanol- Ethanol fermentation หรือ ABE fermentation

ดังนั้น การคัดเลือกและคัดแยกสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตบิวทานอลจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและจำแนก *Clostridium* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากดินแหล่งต่าง ๆ ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางให้เกิดความก้าวหน้าในการนำกระบวนการทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ โดยทดแทนเชื้อเพลิงธรรมชาติที่กำลังจะหมดไปและสามารถพัฒนาให้เกิดประโยชน์แก่อุตสาหกรรมอื่นๆ ต่อไปได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกเชื้อที่คาดว่าจะ เป็น *Clostridium* spp. ซึ่งสามารถผลิตบิวทานอลได้
- 2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test) เบื้องต้นของเชื้อ *Clostridium* spp.

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างดินมาจากพื้นที่การเกษตรต่างๆ ในจังหวัดชลบุรี เช่น สวนลำไย ไร่ข้าวโพด สวนผสม เป็นต้น จากนั้นนำตัวอย่างดินมาใส่ลงในอาหาร RMC (Reinforce Clostridium medium) และทำการ Heat shock และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่เจริญขึ้นบนอาหาร ทำการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. โดยนำไป streak ลงบนเพลทที่มีอาหาร RCM agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อลงบนอาหาร T6 นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อดูการผลิตบิวทานอล และทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test) เบื้องต้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้เชื้อที่คาดว่าจะจะเป็น *Clostridium* spp. และสามารถสร้างบิวทานอลได้
- 2) เพื่อเป็นการทราบคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อที่สามารถคัดแยกได้

ความสนใจอย่างกว้างขวาง กระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและเชื้อเพลิงเหลว เป็นที่รู้จักกันดีในชื่อของ ABE Fermentation ซึ่งมีมาตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 เนื่องจากความจำเป็นในการใช้ตัวทำละลายเหล่านี้เพื่อผลิตอาวุธ ส่งผลให้มีการเปิดโรงงานหมักเอซีโทนขึ้น โดยแบคทีเรียสกุลที่นำมาใช้เพื่อผลิต คือ *Clostridium* กระบวนการผลิตไบโอบิวทานอลและการนำไปใช้แสดงดังรูปที่ 2.2

แต่เนื่องจากการใช้น้ำมันปิโตรเลียมที่สูงขึ้น ราคาที่พุ่งขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อทดแทนบางส่วนของการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิล เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งทั่วโลก เมื่อเปรียบเทียบเชื้อเพลิง ทดแทนทั้งหมดแล้ว ไบโอบิวทานอลจึงมีบทบาทสำคัญ ในยุคต่อไปของเชื้อเพลิงชีวภาพโดยที่การผลิตเอซีโทน และบิวทานอลจากการหมักของจุลินทรีย์ในสกุลนี้ จากของเสียจำพวกสารชีวภาพทางการเกษตร เช่น เศษไม้ ซังข้าวโพด ฟางข้าว และกากชานอ้อย กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในโรงงานต่างๆ ในยุโรปและ อเมริกา เนื่องจากการผลิตสารละลายอินทรีย์ โดย กระบวนการทางชีวภาพ จากการใช้จุลินทรีย์หมักสารชีวมวลเป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมโดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ปัจจุบันบิวทานอล เป็นสารเคมีที่สำคัญที่ผลิตได้ประมาณ 5-10 ล้านตันและถูก คาดการณ์ในอนาคตไว้ว่า อัตราการเพิ่มการผลิตบิวทานอล จะสูงขึ้นถึง 3 เพอร์เซ็นต์ต่อปีใน 5 ปีข้างหน้า (ชนิกา และคณะ, 2555)



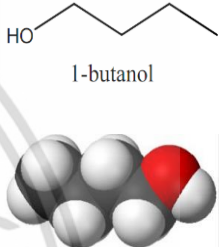
รูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตไบโอบิวทานอล
ที่มา: ชนิกา และคณะ (2555)

2.1.4 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลว

ไบโอบิวทานอล เป็นบิวทานอลที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นและกระบวนการทางชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์ได้ แม้ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดบางประการทำให้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่เป็นที่นิยมมากกว่า (Hansen และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี รวมถึงค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอล เนื่องจากบิวทานอลมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน (น้ำมันเบนซิน) มากกว่าเอทานอล นอกจากนี้บิวทานอลมีความเป็นขี้ตัวดำกว่าจึงสามารถผสมกับแก๊สโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ ดังนั้นการใช้บิวทานอลจึงไม่จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์ มีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนแก๊สโซลีน พบว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องยนต์สามารถขับเคลื่อนได้ปกติ โดยที่มีการใช้ชีวทานอลสูงกว่าแก๊สโซลีนร้อยละ 9 ถึงแม้ว่ารถยนต์ใช้ชีวทานอลในปริมาณที่สูงกว่าแก๊สโซลีน แต่พบว่าการใช้ไบโอบิวทานอลมีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สไฮโดรเจน และสารพิษ NO_x ลดลงมาก ซึ่งเป็นเรื่องสำคัญอย่างมากต่อสิ่งแวดล้อมของโลก (Atsumi และคณะ, 2008)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล

คุณสมบัติ	บิวทานอล	โครงสร้างทางเคมี
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}\text{C}$)	-89.3	 <p>HO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃ 1-butanol</p>
ความถ่วงจำเพาะ	0.810-0.812	
อุณหภูมิที่ติดไฟ ($^{\circ}\text{C}$)	35-37	
อุณหภูมิที่สามารถติดไฟได้เอง ($^{\circ}\text{C}$)	343-345	
จุดวาบไฟ ($^{\circ}\text{C}$)	25-29	
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (น้ำ: 1.0)	0.81	
ความดันวิกฤต (hPa)	48.4	
อุณหภูมิวิกฤต ($^{\circ}\text{C}$)	287	
ขีดจำกัดของการระเบิด (vol. % ในอากาศ)	1.4-11.3	
ความสามารถในการละลายน้ำ (9.0 mL/100 mL)	7.7 g/100 mL ที่ 20 $^{\circ}\text{C}$	
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (อากาศ: 1.0)	2.6	
ความดันไอ (kPa ที่ 20 $^{\circ}\text{C}$)	0.58	

ที่มา: Devis และ Morton (2008)

2.1.5 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้

นอกจากการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงเหลวใช้กับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีมากมาย บิวทานอลส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ (Ester Derivative) เช่น บิวทิล อะคริเลท (Butyl Acrylate) ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมีเป็นสารเคลือบผิว และเป็นสารผสมในสี นอกจากนี้บิวทานอลยังเป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเป็นตัวทำละลายสำหรับสารเคลือบไม้ และวัสดุต่างๆ ในอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ (Acid Curable Lacquers และ Baking Finish) การใช้ประโยชน์จากบิวทานอลและสารประกอบอื่นๆ คือ เป็นทินเนอร์ สำหรับผสมสี (Paint Thinner) เป็นตัวทำละลายในสี (Solvent for Dyes) เช่น หมึกพรี้นท์ และเป็นสารสกัดในกระบวนการผลิตยาและสารธรรมชาติ เช่น ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ฮอโมน (Hormones) และวิตามิน (Vitamins) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้บิวทานอลในประโยชน์ด้าน อื่นๆ เช่น กระจกนิรภัย (Safety Glass) สารทำความสะอาด (Detergents) อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ เช่น สารตกแต่งตา (Eye Makeup) ยาทาเล็บ สารในผลิตภัณฑ์การโกนหนวด ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพอนามัย นอกจากนี้เป็นสารสำหรับการสกัด และอุตสาหกรรมอาหารและกลิ่น (ชนิกา และคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE fermentation)

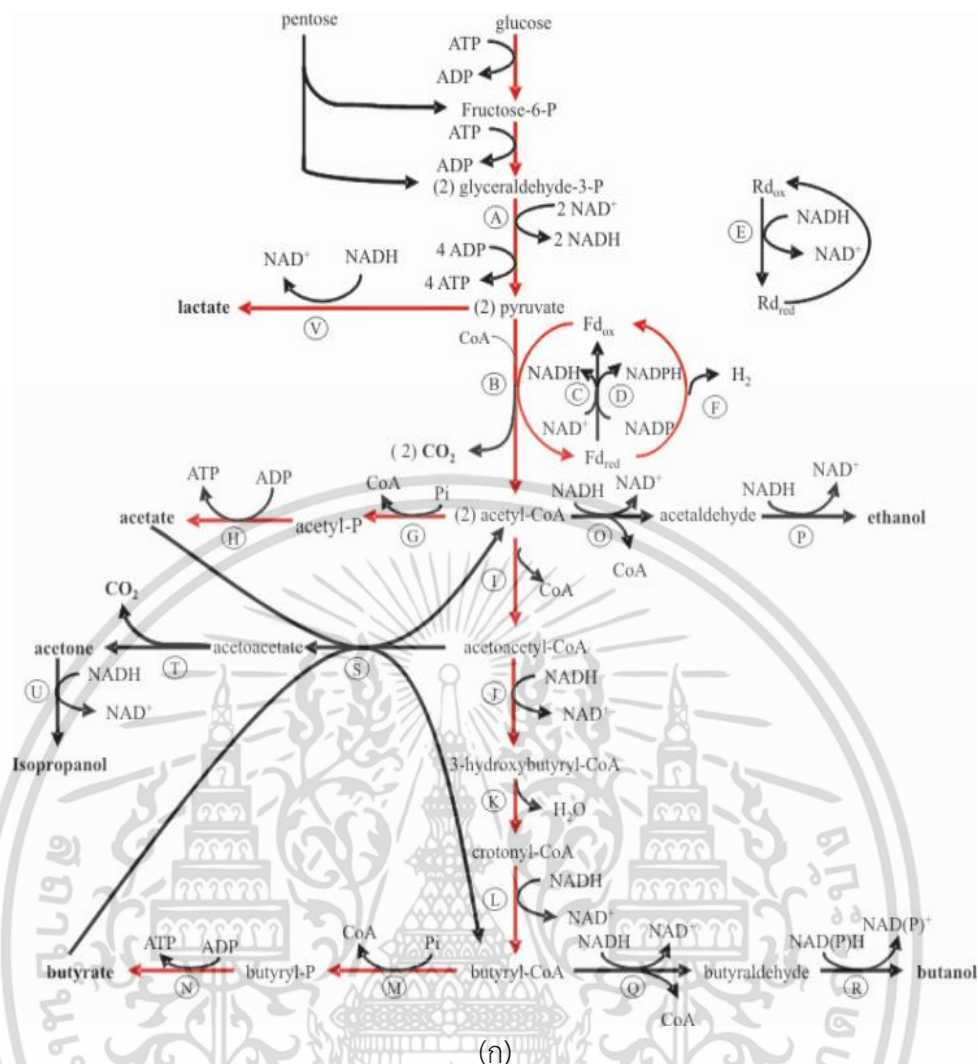
2.2.1 ประวัติและที่มา

การผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพหรือการหมักด้วยจุลินทรีย์ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1862 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส หลุยส์ ปาสเตอร์ (Louis Pasteur) ต่อมาในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 รัฐบาลอังกฤษมีความต้องการผลิตดินระเบิด ทำให้นำไปสู่งานวิจัยของ Chaim Weizmann จากการศึกษาการหมักน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม เป็นแหล่งที่มาของอะซิโตนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตระเบิด (ค.ศ. 1915) โดยการใช้จุลินทรีย์ที่ทนกรด *Clostridium acetobutylicum* นอกจากนี้แบคทีเรียยังมีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อื่น คือ บิวทานอล และเอทานอลอีกด้วย หรือเป็นที่รู้จักกันดีในชื่อของ ABE Fermentation ซึ่งบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตปีตาไดอิน เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตยางสังเคราะห์ แต่ในยุคนั้นความสามารถในการผลิตบิวทานอลยังอยู่ในปริมาณที่จำกัด เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ภายหลังจากสงครามโลกยุติลงความต้องการอะซิโตนจึงลดน้อยลง แต่กลับมาให้ความสนใจอีกครั้งในปีค.ศ. 1979 เนื่องจากราคาน้ำมันดิบของโลกเริ่มมีราคาสูงขึ้น ทำให้เกิดการค้นคว้าและพัฒนาเกี่ยวกับเชื้อเพลิงชีวภาพเป็นพลังงานทดแทน เช่น ไบโอบิวทานอล และไบโอเอทานอล แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักดังกล่าวยังมีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการบวกรสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Jones และ Woods, 1986)

2.2.2 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the Fermentation)

กระบวนการหมักของแบคทีเรีย *Clostridium* spp. สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenesis phase) และระยะสร้างตัวทำละลายสารอินทรีย์ (Solventogenesis phase) วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมถึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจนอีกด้วย โดยขั้นแรกน้ำตาลกลูโคสจะถูกดึงเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhoff pathway (EMP) เปลี่ยนให้เป็นไพรูเวท โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะสามารถเปลี่ยนไพรูเวทได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ $\text{NADH}^+ \text{H}^+$ จำนวน 2 โมเลกุล ส่วนน้ำตาลเพนโทส (Pentose, C 5) ถูกเมทาบอลิซ (metabolized) ด้วยวิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) เกิดการสร้าง Fructose-6-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนเข้าสู่วิถี EMP ไพรูเวทที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) คาร์บอนไดออกไซด์ และรีดิวซ์เฟอริดอกซิน (Reduce ferredoxin) โดยเอนไซม์ Pyruvate ferredoxinoxidoreductase โดยมีโคเอนไซม์เอ (Coenzyme A) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งอะซิติลโคเอที่เกิดขึ้นจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก โดยอะซิติลโคเอ 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนอะซิติลโคเอ (Acetoacetyl-CoA) เพื่อการสร้างกรดบิวทริก ค่า pH ของการหมักในช่วงนี้จะลดลง นอกจากนี้ยังใช้เพื่อการสร้างอะซิเตท ซึ่งอะซิเตทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตน และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ Acetoacetate decarboxylase โดยปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาผันกลับไม่ได้ (Jones และ Woods, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

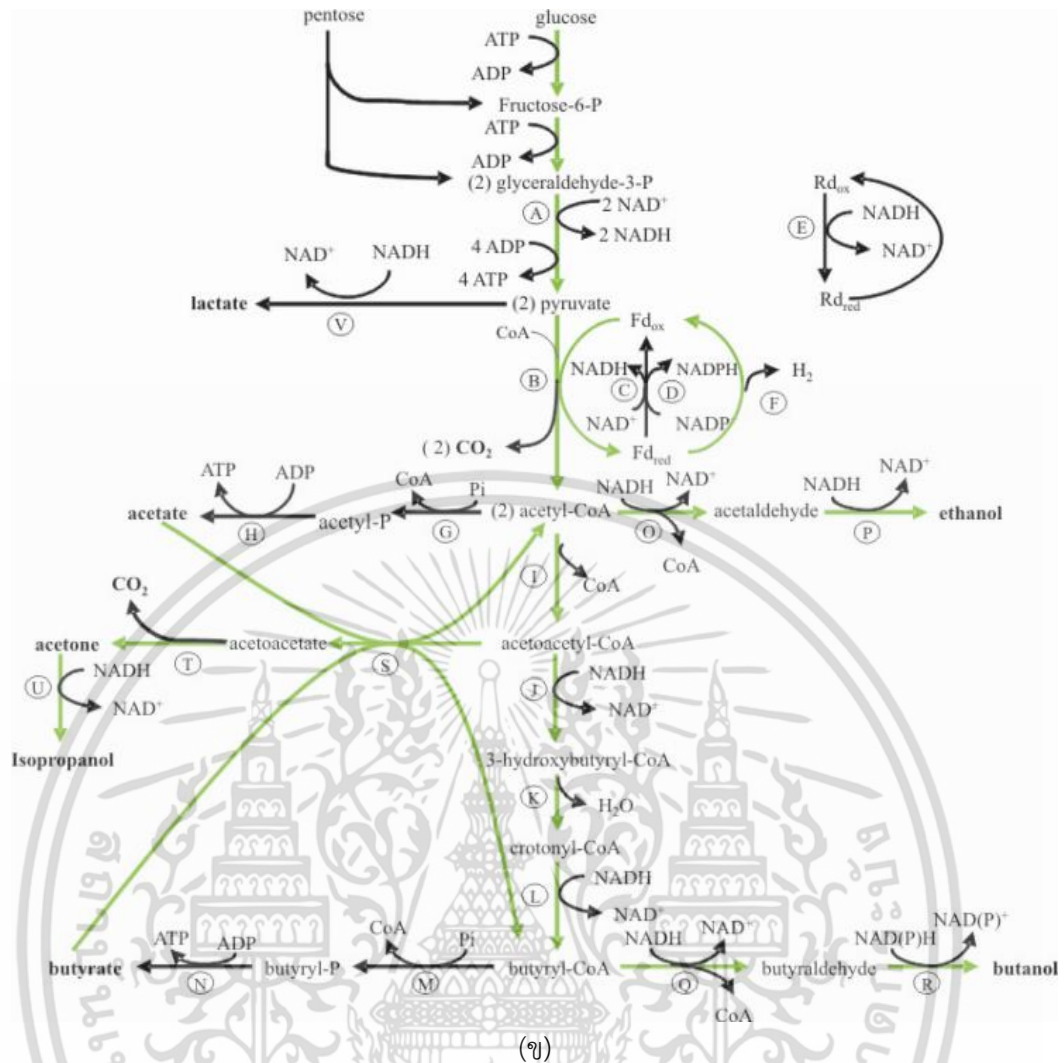


รูปที่ 2.3 (ก) กลไกของระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acetogenesis) ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางการสร้างกรด (ข) กลไกของระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenesis) ลูกศรสีเขียวนแสดงทิศทางการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์

ที่มา : <http://www.intechopen.com/book/liquid-gaseous-and-biofuels-conversion-techniques/biobutanol-from-renewable-agricultural-and-lignocellulose-resources-and-its-perspectives-as-alternat> (20 พฤศจิกายน 2559)

หมายเหตุ : (A) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, (B) pyruvate ferredoxinoxidoreductase, (C) NADH ferredoxinoxidoreductase, (D) NADPH ferredoxinoxidoreductase, (E) NADH rubredoxinoxidoreductase, (F) hydrogenase, (G) phosphate acetyltransferase, (H) acetate kinase, (I) thiolase, (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, (K) crotonase, (L) butyryl-CoA dehydrogenase, (M) phosphate butyltransferase, (N) butyrate kinase, (O) acetaldehyde dehydrogenase, (P) ethanol dehydrogenase, (Q) butylaldehyde dehydrogenase, (R) butanol dehydrogenase, (S) acetoacetyl-CoA, (T) acetoacetate decarboxylase, (U) phosphoglucomutase, (V) ADP-glucose pyrophosphorylase, (W) granulose synthase, (X) granulose phosphorylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 (ต่อ) (ก) กลไกของระยะการสังเคราะห์กรดอินทรีย์ (Acetogenesis) ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางการสังเคราะห์ (ข) กลไกของระยะการสังเคราะห์ตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenesis) ลูกศรสีเขียวแสดงทิศทางการสังเคราะห์ตัวทำละลายอินทรีย์

ที่มา : <http://www.intechopen.com/book/liquid-gaseous-and-biofuels-conversion-techniques/biobutanol-from-renewable-agricultural-and-lignocellulose-resources-and-its-perspectives-as-alternat> (20 พฤศจิกายน 2559)

หมายเหตุ : (A) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, (B) pyruvate ferredoxinoxidoreductase, (C) NADH ferredoxinoxidoreductase, (D) NADPH ferredoxinoxidoreductase, (E) NADH rubredoxinoxidoreductase, (F) hydrogenase, (G) phosphate acetyltransferase, (H) acetate kinase, (I) thiolase, (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, (K) crotonase, (L) butyryl-CoA dehydrogenase, (M) phosphate butyltransferase, (N) butyrate kinase, (O) acetaldehyde dehydrogenase, (P) ethanol dehydrogenase, (Q) butyraldehyde dehydrogenase, (R) butanol dehydrogenase, (S) acetoacetyl-CoA, (T) acetoacetate decarboxylase, (U) phosphoglucomutase, (V) ADP-glucose pyrophosphorylase, (W) granulose synthase, (X) granulose phosphorylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนเพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ และช่วยกำจัดปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD^+ แบบที่เรียจะมีกลไกในการเปลี่ยนบิวทิเรท (Butyrate) กลับไปเป็นบิวทิริลโคเอ (Butyryl-CoA) แล้วบิวทิริลโคเอ จะลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าในกระบวนการหมักสามารถผลิตบิวทานอลได้มากกว่าเอทานอลอย่างมาก ซึ่งเอทานอลสร้างจากอะซิโตนอะซิetylโคเอ (Acetoacetyl-CoA) โดยผ่าน 2 ปฏิกิริยาเริ่มจากอะซิโตนอะซิetylโคเอจะถูกลดรูปเป็นอะซิทาลดีไฮด์ (Acetaldehyde) โดยเอนไซม์อะซิทาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Acetaldehyde dehydrogenase) ก่อนที่จะเปลี่ยนอะซิทาลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์เอทานอลดีไฮโดรจีเนส (Ethanol dehydrogenase) พร้อมกับการใช้ $NADH^+ H^+$ 2 โมเลกุล เพื่อสร้าง NAD^+ ด้วย (Jones และ Woods, 1986)

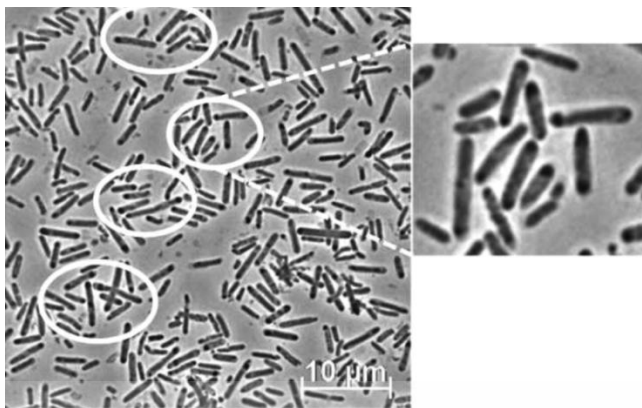
2.3 *Clostridium* spp.

2.3.1. อนุกรมวิธาน

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Firmicutes
 Class : Clostridia
 Order : Clostridiales
 Family : Clostridiaceae
 Genus : *Clostridium*

Clostridium spp. เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia รูปร่างแท่ง ดังรูปที่ 2.4 แกรมบวก มีทั้งสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้และไม่ได้ เมื่อเคลื่อนที่โดยปกติเซลล์จะอาศัยแฟลกเจลลาที่ยื่นออกมารอบๆ เซลล์ (Peritrichous flagella) ในการเคลื่อนที่ สามารถสร้างสปอร์ได้ ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (Oval) หรือรูปทรงกลม (Spherical) การทนความร้อนของสปอร์แบคทีเรีย (Bacterial spore) ค่อนข้างสูงเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน จัดเป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic) เจริญเติบโตและผลิตสารอินทรีย์ได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ค่า pH ประมาณ 5.6-6.7 ไม่เจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 หรือ น้ำดีร้อยละ 20 (Prazmowski, 1880)

ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียจำพวก Chemoorganotrophic บางสายพันธุ์จัดเป็น Chemoautotrophic หรือ Chemolithotrophic อีกด้วย มีความสามารถในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดให้กลายเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล กระบวนการหมักของแบคทีเรียกลุ่มนี้ แบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ซึ่งสายพันธุ์ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum*, *C. saccharoperbutyl-acetonicum* และ *C. beijerinckii* เป็นต้น (ธีระนัย และคณะ, 2556)



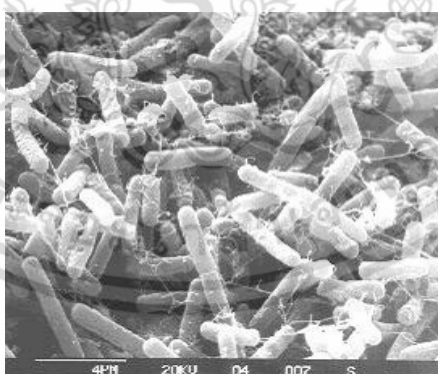
รูปที่ 2.4 ลักษณะของเชื้อ *Clostridium* spp.

ที่มา : <http://jb.asm.org/content/193/10/2429/F6.expansion.html> (29 ธันวาคม 2559)

2.3.1.1 *Clostridium acetobutylicum*

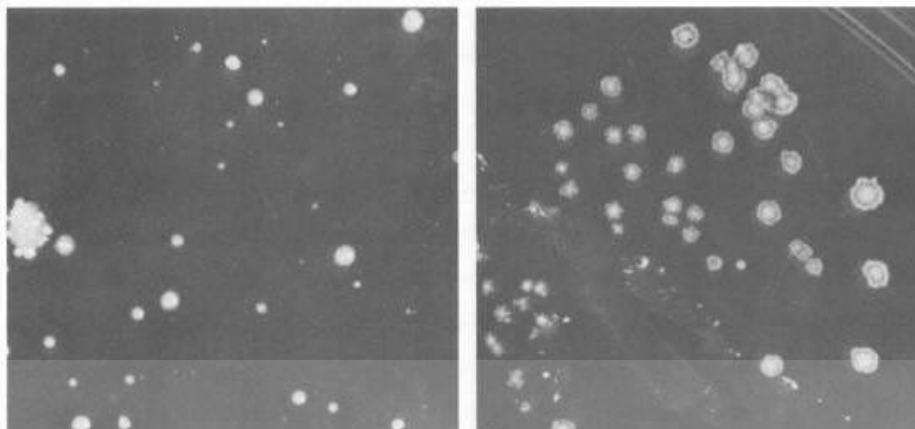
Clostridium acetobutylicum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งตรง สามารถเคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาที่ยื่นออกมารอบเซลล์ เซลล์มีขนาดประมาณ $0.5-0.9 \times 1.6-6.4$ ไมโครเมตร เซลล์บวมเล็กน้อย สปอร์รูปไข่ และอยู่เกือบปลายค่อนไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (Subterminal spore) ดังรูปที่ 2.5 โคลีนีบนจานอาหาร RCM มีลักษณะแบนเรียบเกือบนูน ขอบหยัก ขนาด 1-5 มิลลิเมตร เป็นเม็ดเล็ก โปร่งแสงจนถึงกึ่งทึบแสง ดังรูปที่ 2.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 37 องศาเซลเซียส

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดแลคติก บิวทานอล อะซิโตน แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจนจำนวนมาก อาจเกิดกรดซัคซินิก (Succinic acid) เล็กน้อย ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ไม่พบเอทานอล (McCoy และคณะ, 1926)



รูปที่ 2.5 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. acetobutylicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ที่มา : <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/26> (29 ธันวาคม 2559)



รูปที่ 2.6 ลักษณะโคโลนี *C. acetobutylicum* ที่ปรากฏบนอาหาร RCM
ที่มา : Sandra และคณะ (2532)

2.3.1.2 *Clostridium beijerinckii*

Clostridium beijerinckii เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งตรงส่วนปลายโค้งมน ดังรูปที่ 2.7 สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ขนาดประมาณ 0.5-1.7 x 1.7-8.0 ไมโครเมตร คัดแยกได้จากอุจจาระ และดิน สปอร์รูปไข่ โคโลนีบนจานอาหาร blood agar ขนาด 1-5 มิลลิเมตร ลักษณะกลม โปร่งแสง สีเทาเป็นมันเงา เรียบ อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อ คือ 37 องศาเซลเซียส

สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กรดบิวทิริก กรดอะซิติก กรดซัคซินิก กรดแลคติก และกรดฟอร์มิก กรดโทพโอนิกเล็กน้อยจนเกือบไม่พบ อะซิโตน บิวทานอล แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจน (Donker, 1926)



รูปที่ 2.7 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. beijerinckii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : <http://genome.jgi.doe.gov/clobe/clobe.home.html> (29 ธันวาคม 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.3 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

Clostridium saccharoperbutylacetonicum รูปร่างเป็นแท่งตรง ดังรูปที่ 2.8 ขนาดประมาณ 0.4-0.8 ไมโครเมตร โคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง *Clostridium basal* (CBM agar) มีลักษณะกลม ผิวเรียบ ขอบเป็นคลื่น เส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

กระบวนการหมักของ *C. saccharoperbutylacetonicum* ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส แมนโนส เซลโลไบโอส แลคโตส มอลโทส ซูโครส เมลิไบโอส ราฟฟิโนส ทรีฮาโลส ซาลิซิน ทูแรนโนส อะมิคตาลิน แป้ง ไกลโคซิน เดกซ์ทริน เพคติน เมเลไซโทส ดี-อะราบิทอล แอล-อะราบิทอล และอินซูลิน ไม่พบการหมักของไรโบสและกลีเซอรอล แต่พบการหมักซอร์บิทอล คัลซิทอล และอินซิทอลได้บางสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถหมักแรมโนสได้เล็กน้อย กระบวนการหมักได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ อะซิโตน บิวทอล เอทานอล แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สไฮโดรเจน กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก (Keis, Shaheen และ Jones, 2001)



รูปที่ 2.8 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : <http://www.swbpc.usu.edu/html/current-research-and-projects/aceton-butanol-and-ethanol-abe-production-from-algal-biomass> (30 ธันวาคม 2559)

2.4 การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อ *Clostridium* spp.

2.4.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส (Gas produced test)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากกระบวนการหมักของเชื้อ *Clostridium* spp. สายพันธุ์ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล นอกจากนี้ยังได้แก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้อีกด้วย ซึ่งแก๊สไฮโดรเจนมีคุณสมบัติในการติดไฟ สามารถทดสอบได้โดยนำหลอดทดลองที่เชื้อแบคทีเรียเปิดฝาวางใกล้เปลวไฟ สังเกตการติดไฟ (สุธาทิพย์ และ นฤมล, 2554) หรือทดสอบการสร้างแก๊สผสมด้วยการใช้หลอดดักแก๊ส (Durham tube) ซึ่งเป็นหลอดทดลองขนาดเล็กประมาณ 5x50 มิลลิเมตร ใช้คว่ำลงในหลอดทดลองขนาดปกติที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ แก๊สที่เกิดจะลอยตัวขึ้น จึงทำให้มีแก๊สจำนวนหนึ่งเข้าไปแทนที่ของเหลวภายในหลอดดักแก๊ส (ที่มา <http://GlasswareChemical.com/tag/durham-tube%E0%B8%84%E0%B7%E0%B8%AD/>, วันที่สืบค้น 27 มกราคม 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การทดสอบการหมักน้ำตาล (Sugar fermentation test)

ตารางที่ 2.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

คุณสมบัติ	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. saccharobutylicum</i>	<i>C. aurantibutylicum</i>	<i>C. pasteurianum</i>	<i>C. roseum</i>	<i>C. tetanomorphum</i>
การเคลื่อนที่	+	+	±	+	+	-/+	-/+	
การผลิตแก๊สไฮโดรเจน	4	4	4	+	4	4	4	+
การสร้างอินโดล	-	-	+	-	-	-	-	+/-
การสร้างเอนไซม์เลซิติเนส	NT	-	-	NT	-	-	-	-
การสร้างเอนไซม์ไลเปส	NT	-	-	NT	+	-	-	NT
การย่อยเอสคูลิน	+	+	+	+	+	-	+	NT
การย่อยแป้ง	NT	±	+	+	+	-	-	NT
การสร้างสารผลิตภัณฑ์								
อะราบีโนส	+	±	d	+	w	w	+	-
เซลโลไบโอส	+	+	+	+	+	-	+	+
กาแลกโตส	NT	+	+	NT	w	w-	+	-
ไกลโคเจน	-	d	d	+	w	-	-	-/+
อินนูลิน	+/-	d	-	-/+	-	-	-	NT
แลกโตส	+	+	d	+	+	-w	+	-
มอลโทส	+	+	+	+	+	+	-	+
แมนนิทอล	-/+	d	-/+	-/+	-	+	-	NT
แมนโนส	NT	+	+	+	w	+	+	+/-
เมลิไบโอส	+	d	-	+	w	+	-	NT
แรฟฟิโนส	+	±	+	+	+	+	-	NT
ไรโบส	w	-/+	-	w	-	-	-	+
ซอร์บิทอล	-	-/+	-	-	-	+	-	+
แป้ง	+	±	+	+	w	-w	+	NT
ซูโครส	NT	+	+	NT	+	+	+	NT
ไซโลส	NT	+	±	NT	-	w	+	+

ที่มา : Cato และคณะ (1986)

หมายเหตุ : + คือ ร้อยละ 90-100 ของสายพันธุ์ เกิดปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวก; - คือ ร้อยละ 90-100 ของสายพันธุ์ เกิดปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นลบ; ± คือ ร้อยละ 61-89 ของสายพันธุ์ เกิดปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวก, -/+ คือ ร้อยละ 11-39 ของสายพันธุ์ เกิดปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวก; d คือ ร้อยละ 40-60 ของสายพันธุ์ เกิดปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวก; w คือ พบการเกิดปฏิกิริยาในปริมาณน้อย; ตัวเลข 1-4 คือ ปริมาณแก๊ส ; NT คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในแต่ละสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* spp. จะมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งทดสอบด้วยวิธีต่างๆ แสดงให้เห็นดังตารางที่ 2.2

Clostridium spp. เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ ดังนั้นการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นกลูโคสจะถูกเมทาบอลิซึม ผ่าน Embden-Meyerhof pathway ได้ ATP และกรดไพรูวิก ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์อีกหลายชนิดได้แก่ แอลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน กรดแลคติก กรดอินทรีย์และพลังงาน

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Montoya และคณะ (2000) ศึกษาแบคทีเรียที่เรียกว่า 178 ชนิดที่สามารถผลิตบิวทานอลและอะซิโตนได้นั้นมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia ที่สามารถย่อยน้ำตาล ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งทางการเกษตรในประเทศโคลัมเบีย เชื้อที่คัดแยกได้ 13 ชนิด ผลิตตัวทำละลายทั้งหมดได้มากกว่า *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงสุดจากที่คัดแยกได้ คือ IBUN 125C และ IBUN 18A ซึ่งให้ค่าผลผลิตตัวทำละลายทั้งหมด 25.2 และ 29.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เชื้อที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่จะหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (Exoenzyme) เพื่อย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) ไซแลน กรดพอลิกลูตาติก กรดอินูลิน และโคโคซาน สายพันธุ์ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงมีประโยชน์ต่อกระบวนการหมักชีวมวลโดยตรง จากการศึกษาลักษณะทางสรีระของเชื้อ พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ จำแนกให้อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* และ *Clostridium saccharobutylicum* NCP 262

Berezina และคณะ (2009) ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตตัวทำละลายจากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส โดยเชื้อเหล่านี้ผลิตอะซิโตนและบิวทานอล โดยมีปริมาณบิวทานอลคิดเป็นร้อยละ 80 ของตัวทำละลายทั้งหมด การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของ 16s rDNA พบว่าร้อยละ 99 มีความใกล้เคียงกับ *Clostridium saccharobutylicum* ในระยะสุดท้ายของการผลิตตัวทำละลาย ยีนที่เกี่ยวข้องจะเกิดการแสดงออกและมีการเข้ารหัสของยีน Crotonase, Butyryl-CoA dehydrogenase, Electron-transport protein subunits A และ B, 3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, Alcohol dehydrogenase, CoA-transferase (subunits A and B), Acetoacetate decarboxylase และ Aldehyde dehydrogenase ซึ่งใช้ในการจัดจำแนกเชื้อเพื่อให้ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ คือ *Clostridium saccharobutylicum* Ox29 และโคลนยีนเข้าสู่ *Escherichia coli* ยีนของ Crotonase, Butyryl-CoA dehydrogenase, Electron-transport protein subunits A และ B, 3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase เป็นองค์ประกอบบน *bcs* operon ในส่วนของ operon ที่มียีนเพียงยีนเดียว (Monocistronic operon) คือ ยีน Alcohol dehydrogenase ซึ่งอยู่บริเวณส่วนท้ายของ *bcs* operon ส่วนยีนของ Aldehyde dehydrogenase, CoA-transferase (subunits A and B) และ acetoacetate decarboxylase จะอยู่บน *sol* operon อีกทั้งยังพบว่าลำดับพันธุกรรมและการจัดเรียงยีนบน *sol* และ *bcs* operon ของ *C. saccharobutylicum* Ox29 นี้มีความใกล้เคียงกันกับ *Clostridium beijerinckii* มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Al-shorgani และคณะ (2015) ได้ทำการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* จากกระบวนการหมักโดยใช้ของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเป็นวัตถุดิบที่คัดแยกได้จากดินที่ใช้เพาะปลูกข้าว โดยการวิเคราะห์จาก 16s rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งมีลำดับพันธุกรรมคล้ายกัน 96% จึงเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ชื่อว่า *Clostridium acetobutylicum* YM1 ที่สามารถผลิตไบโอบิวทานอลจากแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ไซโลส อะราบิโนส กลีเซอรอล แล็กโตส เซลโลไบโอส แมนนิทอล มอลโตส กาแล็กโตส ซูโครส และแมนโนส โดยการคัดแยกจะใช้พอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แป้งและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) เป็นสารตั้งต้น ความสามารถของสายพันธุ์ YM1 ในการผลิตไบโอบิวทานอลจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรยังใช้ประเมินคุณภาพของรำข้าว น้ำทิ้งจากการผลิตปาล์มน้ำมันและกากเนื้อผลปาล์ม ในกระบวนการหมัก อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะทำให้เชื้อสามารถผลิตไบโอบิวทานอลความเข้มข้นสูงสุดถึง 7.27 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (ABE) ทั้งหมดเท่ากับ 10.23 กรัมต่อลิตร

Al-Shorgani และคณะ (2016) *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้จะถูกคัดแยกได้จากดินในทุ่งนาที่ Ban 9, Parit 3, Sekinchan, Selangor ประเทศ Malaysia โดยการนำตัวอย่างดินที่เก็บมาได้มาใส่ในอาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในขวดซีรัมขนาด 100 ml ที่กีดด้วยไนโตรเจนเพื่อให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยมีปริมาตร RCM 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะสามารถพบการเกิดแก๊สเมื่อระยะเวลาการบ่มผ่านไป 5 วัน จากนั้นเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตแก๊สได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว RCM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้ชุดควบคุมภาวะไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว RCM และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะไร้อากาศจากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ โดยจะเลือกเชื้อที่เป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนและสามารถผลิตแก๊สได้เท่านั้นไปทำการศึกษาต่อ และเพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตอะซิโตน จึงทำการทดสอบอะซิโตนของแต่ละไอโซเลทก่อน โดยเชื้อที่สามารถผลิตอะซิโตนได้จะสามารถเห็นได้จากการเปลี่ยนสีของโคโลนีหรืออาหารจากสีเหลืองเป็นสีม่วงหลังจากใส่สารละลาย 5% โซเดียมไนโตรพลัสไซด์ 1 มิลลิลิตร และ 40% แอมโมเนีย ซึ่งจากการทดสอบข้างต้น พบเชื้อทั้งหมด 28 ไอโซเลท ที่แสดงลักษณะแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง สามารถสร้างสปอร์ได้และสามารถผลิตอะซิโตนได้ นอกเหนือจากนี้ ยังทำการวิเคราะห์การผลิตไบโอบิวทานอลโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี และจาก 28 ไอโซเลท ที่พบมีเพียง YM1 เท่านั้นที่สามารถผลิตไบโอบิวทานอลได้สูงสุด คือได้ ของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (ABE) และ ไบโอบิวทานอล เท่ากับ 5.78 กรัมต่อลิตร และ 3.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

ปีกเกอร์	แท่งแก้ว
ปิเปตต์	ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
ไมโครปิเปตต์	ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
จุกยาง	ตะเกียงแอลกอฮอล์
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ	เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
หลอดทดลอง	ถุงซีป
ที่วางหลอดทดลอง (Rack)	ภาชนะเลี้ยงจุลินทรีย์สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)
ขวด Duran	โถดูดความชื้น (Desiccator)
ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)	เครื่องเขย่าความเร็วสูง (Vortex mixer)
เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)	เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
จอบ และเสียม	ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อแบบปลอดออกซิเจน (Anaerobic chamber)
ซ็อนต์กสาร	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)
กระบอกตวง	
หลอดดักแก๊ส	

3.1.2 สารเคมี

ทริปโตเน (Tryptone)	สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)
กลูโคส (Glucose)	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
วุ้น (Agar)	ไอร์รอน(II)ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
สารละลายอะซิโตน	สารละลายกรดซัลฟูริก 0.005 โมลาร์
สารละลายบิวทานอล	สารละลายกรดซिटริก ร้อยละ 2
สารละลายเอทานอล	น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
สารละลายเมทานอล	อาหารสำเร็จรูป Reinforced Clostridial Medium (RCM)
น้ำตาลเซลโลไบโอส	อาหารสำเร็จรูป Nutrient broth
น้ำตาลมอลโทส (maltose)	อาหาร YM agar
น้ำตาลไซโลส (Xylose)	สารละลายไอโอดีน
เปปโตน (Peptone)	พาราฟิน ออยล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจากแหล่งดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรี คือ บริเวณพื้นที่การเกษตร สวนลำไย ไร่ข้าวโพด สวนผสม บริเวณดินฮวงซุ้ย และพื้นที่ป่าในจังหวัดชลบุรี ขุดดินให้ลึกจากผิวน้ำดินลงไปประมาณ 0.5 - 1 เมตร ณ สถานที่เดียวกันจะขุดทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ซึ่งมีระยะห่างกันอย่างน้อย 10.0 เมตร เก็บใส่ถุงซิปล็อคอากาศออกจนหมด โดยเก็บในโถดูดความชื้น (Desiccator) ไม่เกิน 1 วัน สำหรับการนำไปคัดแยกต่อไป

3.3 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM) (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก) ละลายอาหารสำเร็จรูป RCM ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนจนอาหารละลายจนหมด ปรับ pH ของอาหารด้วย NaOH ให้มีค่าประมาณ 6.8 ± 0.2 ใส่ในหลอดอาหารที่มีฝาเกลียวปิดมิดชิด ปริมาตร 9 และ 10 มิลลิลิตรเพื่อใช้ในการคัดแยก จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เตรียมอาหาร T6 (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนจนอาหารละลายหมด ปรับ pH ของอาหารด้วย NaOH ให้มีค่าประมาณ 6.5 นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และการเตรียมอาหารแข็ง T6 ให้เติมวุ้นลงไป 1.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารที่เตรียม นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทอาหารลงจานเพาะเลี้ยง

3.4 การคัดแยกเชื้อ

ตัดตัวอย่างดินปริมาณ 1 กรัม ลงหลอดอาหาร RCM ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตต์พาราฟิโนออยล์ปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตรที่บลงผิวหน้าหลอดอาหาร เหลว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันในสภาวะไร้ออกซิเจน หลังจากนั้นปิเปตต์เชื้อจากหลอด 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร RCM ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตต์พาราฟิโนออยล์ 1 มิลลิลิตรที่บลงในหลอดอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันเช่นเดียวกัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

จากนั้นนำเชื้อ *Clostridium* spp. มาคัดแยกลงในจานอาหาร RCM agar โดยการ Cross streak บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน ในสภาวะไร้ออกซิเจน ให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นทำการ Re-streak plate จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย ตามหัวข้อ 3.5 สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ให้ถ่ายเชื้อ 1 ลูบใส่ลงในหลอดอาหารเหลว T6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบการสร้างสารผลิตภัณฑ์นั้นคือ การทดสอบอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (รายละเอียดอยู่ในหัวข้อ 3.6)

3.5 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อจากหลอดอาหาร RCM 9 มิลลิลิตร ทำการย้อมสีแกรม (Gram staining) (Gram, 1884) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ทำความสะอาดสไลด์ให้ปราศจากไขมัน ใช้หวงเชียวเชื้อจากหลอดอาหารแต่ละบนสไลด์และเกลี่ยให้เชื้อกระจายตรงบริเวณที่มีหยดน้ำ รอให้แห้งแล้วนำไปทำการตรึงเซลล์ให้ติดแน่นด้วยการผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างสีออกโดยการผ่านน้ำ 2-3 วินาที จากนั้นหยดสีแกรมไอโอดีน ให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ห้ามเกิน 20 วินาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำอีกครั้ง ย้อมทับด้วยสี Safranin O ให้ท่วมรอยทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำ ชับน้ำออกให้แห้ง นำไปตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย และลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 100 เท่า

3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำส่วนที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมาผสมกับสารละลายกรดซิตริก ความเข้มข้นร้อยละ 2 สำหรับเป็น Internal standard ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทำการกรองสารละลายด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex fermentation monitor ขนาด Particle size 9 ไมครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ สารละลายกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส ความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยวัดค่า Refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสงใช้ Run time 30 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตรงตามสารมาตรฐานอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้า แล้วจึงคำนวณหาความเข้มข้นของสารต่างๆ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.7 การทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี (Biochemical test)

3.7.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส

นำไอโซเลตที่ผ่านการทดสอบการสร้างสารผลิตภัณฑ์แล้ว มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง T6 agar เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะไร้ออกซิเจน สังเกตการสร้างแก๊สโดยนำไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว T6 ที่มีหลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยปิเปตต์ทับด้วย Mineral oil 1 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทดสอบการสร้างแก๊สโดยสังเกตฟองภายในหลอดดักแก๊ส

3.7.2 การทดสอบการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส

ใช้ลูปเชียวเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูป ใส่หลอดอาหาร Phenol red cellobiose broth (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ค) ซึ่งประกอบไปด้วย อาหาร NB ที่มีเซลโลไบโอสร้อยละ 1.0 ใช้ Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปิเปตต์ทับด้วย Mineral

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

oil 1 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจสอบผลโดยสีของหลอดอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงไปเป็นสีเหลือง แสดงว่าให้ผลบวก

3.7.3 การทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโทส

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูป ใส่หลอดอาหาร Phenol red maltose broth (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ค) ซึ่งประกอบไปด้วย อาหาร NB ที่มีมอลโทสร้อยละ 1.0 ใช้ Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปิเปตต์ทับด้วย Mineral oil 1 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจสอบผลโดยสีของหลอดอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงไปเป็นสีเหลือง แสดงว่าให้ผลบวก

3.7.4 การทดสอบการหมักน้ำตาลไซโลส

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูป ใส่หลอดอาหาร Phenol red xylose broth (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ค) ซึ่งประกอบไปด้วย อาหาร NB ที่มีไซโลสร้อยละ 1.0 ใช้ Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปิเปตต์ทับด้วย Mineral oil 1 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจสอบผลโดยสีของหลอดอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงไปเป็นสีเหลือง แสดงว่าให้ผลบวก

3.7.5 การทดสอบการเคลื่อนที่

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ แหง (Stab) ลงในหลอดอาหารวุ้นกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งประกอบไปด้วย ทริปโตส 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม และวุ้น 5 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ค) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน โดยปิเปตต์ทับด้วย Mineral oil 1 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน สังเกตการเจริญเติบโตโดยการแพร่กระจายของเชื้อออกจากบริเวณรอบรอยที่แทงลงไป

3.7.6 การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยด 3% H_2O_2 สังเกตว่ามีฟองอากาศหรือไม่ และสังเกตผลทันที หากมีการเกิดฟอง O_2 แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลส (ผลเป็นบวก) โดยในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์แคตาเลสจะมีอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น (ดวงพร, 2537)

3.7.7 การทดสอบไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase test)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ แล้วป้ายบนกระดาษกรองขนาดเล็ก จากนั้นจึงหยด Kovac's oxidase reagent (tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) ซึ่งเป็นสารสีไม่มีสี โดยแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้จะให้ผลบวก (สีม่วงเข้ม) โดยสังเกตปฏิกิริยาภายใน 10 วินาที

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และตัวทำละลายรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS โดยวิเคราะห์ตาราง ANOVA และใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's เพื่อดูความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลที่วิเคราะห์ได้จากแต่ละไอโซเลท

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดิน

จากการตัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ จากแหล่งดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรี โดยการเก็บตัวอย่างจากแหล่งดิน ทำการขุดลึกจากผิวหน้าดินลงไป 0.5 ถึง 1 เมตร ณ สถานที่เดียวกันจะขุดทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ซึ่งมีระยะห่างกันอย่างน้อย 10.0 เมตร ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งดิน 15 แห่ง ได้แก่ บริเวณพื้นที่การเกษตร สวนลำไย (LG) ไร่ข้าวโพด (CN) สวนผสม (MF) บริเวณดินฮวงซุ้ย (MA) และพื้นที่ป่าในจังหวัดชลบุรี (FR)

ตารางที่ 4.1 สถานที่การเก็บตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรี

สถานที่	รหัสของตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง
สวนลำไย จุดที่ 1	LG 1.1	ดินร่วน สีน้ำตาล
	LG 1.2	ดินร่วน สีน้ำตาล
	LG 1.3	ดินร่วน สีน้ำตาล
สวนลำไย จุดที่ 2	LG 2.1	ดินร่วน สีน้ำตาล
	LG 2.2	ดินร่วน สีน้ำตาล
	LG 2.3	ดินร่วน สีน้ำตาล
สวนลำไย จุดที่ 3	LG 3.1	ดินร่วน สีน้ำตาล
	LG 3.2	ดินร่วน สีน้ำตาล
	LG 3.3	ดินร่วน สีน้ำตาล
ไร่ข้าวโพด จุดที่ 1	CN 1.1	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
	CN 1.2	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
	CN 1.3	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
ไร่ข้าวโพด จุดที่ 2	CN 2.1	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
	CN 2.2	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
	CN 2.3	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
ไร่ข้าวโพด จุดที่ 3	CN 3.1	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
	CN 3.2	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
	CN 3.3	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม
สวนผสม จุดที่ 1	MG 1.1	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาล
	MG 1.2	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาล
	MG 1.3	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาล
สวนผสม จุดที่ 2	MG 2.1	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาล
	MG 2.2	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาล
	MG 2.3	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้มีการทำ
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) สถานที่การเก็บตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรี

สถานที่	รหัสของตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง
สวนผสม จุดที่ 3	MG 3.1	ดินร่วนละเอียด สีดำ
	MG 3.2	ดินร่วนละเอียด สีดำ
	MG 3.3	ดินร่วนละเอียด สีดำ
สวนขุ่ย จุดที่ 1	MA 1.1	ดินทราย เปี้ยก สีน้ำตาลแดง
	MA 1.2	ดินทราย เปี้ยก สีน้ำตาลแดง
	MA 1.3	ดินทราย เปี้ยก สีน้ำตาลแดง
สวนขุ่ย จุดที่ 2	MA 2.1	ดินทราย สีน้ำตาลแดง
	MA 2.2	ดินทราย สีน้ำตาลแดง
	MA 2.3	ดินทราย สีน้ำตาลแดง
สวนขุ่ย จุดที่ 3	MA 3.1	ดินทราย สีน้ำตาลแดง
	MA 3.2	ดินทราย สีน้ำตาลแดง
	MA 3.3	ดินทราย สีน้ำตาลแดง
ป่า จุดที่ 1	FR 1.1	ดินร่วนละเอียด สีดำ
	FR 1.2	ดินร่วนละเอียด สีดำ
	FR 1.3	ดินร่วนละเอียด สีดำ
ป่า จุดที่ 2	FR 2.1	ดินร่วนละเอียด สีดำ
	FR 2.2	ดินร่วนละเอียด สีดำ
	FR 2.3	ดินร่วนละเอียด สีดำ
ป่า จุดที่ 3	FR 3.1	ดินร่วนปนเหนียว สีน้ำตาล
	FR 3.2	ดินร่วนปนเหนียว สีน้ำตาล
	FR 3.3	ดินร่วนปนเหนียว สีน้ำตาล

หมายเหตุ : สวนลำไย (LG) ไร่ข้าวโพด (CN) สวนผสม (MF) บริเวณดินสวนขุ่ย (MA) และพื้นที่ป่าในจังหวัดชลบุรี (FR)

4.2 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ

จากการเก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรี เป็นจำนวนทั้งสิ้น 15 แห่ง และได้ทำการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเชื้อ โดยคัดเลือกจากลักษณะของโคโลนีบนเพลทอาหาร รูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การติดสีย้อมแกรมและการติดสีย้อมสปอร์ โดยเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp. จะต้องมิลักษณะใกล้เคียงกับคุณสมบัติดังนี้ รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อต้องมีลักษณะเป็นรูปแท่งตรงส่วนปลายโค้งมน มีการสร้างสปอร์บริเวณส่วนปลายของเซลล์ ตัวเซลล์ติดสีม่วงหรือแกรมบวก ซึ่งไอโซเลทที่มีลักษณะสอดคล้องกับคุณสมบัติเหล่านี้ มีเพียง 54 ไอโซเลท จาก 129 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
LG 1.1	LG 1.11	โคโลนีรูปร่างกลม มันวาว สีขาว ชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	LG 1.12	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหนามันวาว สีครีมชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	LG 1.13	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีขาว ขอบเรียบ	กลม	+	ไม่สร้างสปอร์	
	LG 1.14	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหนามันวาว สีครีมชุ่ม ขอบเรียบ	กลม	+	ไม่สร้างสปอร์	
LG 1.2	LG 1.21	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว สีขาวชุ่ม ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์	✓
	LG 1.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	LG 1.23	โคโลนีรูปร่างกลม มันวาว สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
LG 1.3	LG 1.31	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวชุ่ม ขอบหยัก	ท่อนยาว	-	สร้างสปอร์	
	LG 1.32	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวชุ่ม ขอบหยัก	กลม	-	ไม่สร้างสปอร์	
	LG 1.33	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีแดง ขอบเรียบ	ท่อน	-	สร้างสปอร์	
	LG 1.34	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาว ขอบเรียบ	ท่อน	-	สร้างสปอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
LG 2.1	LG 2.11	โคโลนีรูปร่างกลม มันวาว สีขาว ขอบหยัก	ท่อน	-	สร้างสปอร์	✓
	LG 2.12	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
LG 2.2	LG 2.21	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
	LG 2.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
	LG 2.23	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
	LG 2.24	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
LG 2.3	LG 2.31	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
	LG 2.32	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
	LG 2.33	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
	LG 2.34	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
LG 3.1	LG 3.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	LG 3.13	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
LG 3.2	LG 3.21	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์เท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นได้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
LG 3.2 (ต่อ)	LG 3.22	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีขาว ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
LG 3.3	LG 3.31	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	LG 3.32	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีขาว ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
CN 1.1	CN 1.11	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	CN 1.12	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	CN 1.13	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
CN 1.2	CN 1.21	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	CN 1.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	CN 1.23	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
CN 1.3	CN 1.31	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีขาว ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	CN 1.32	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีแดง ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
CN 2.1	CN 2.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ในประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
CN 2.1 (ต่อ)	CN 2.12	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	CN 2.13	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
CN 2.2	CN 2.21	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	CN 2.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
CN 2.3	CN 2.31	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	CN 2.32	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
CN 3.1	CN 3.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	CN 3.12	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
	CN 3.13	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
CN 3.2	CN 3.21	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
	CN 3.22	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
CN 3.3	CN 3.31	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
MG 1.1	MG 1.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MG 1.12	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีครีม ชุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MG 1.13	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
MG 1.2	MG 1.21	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวชุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	MG 1.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวชุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MG 1.23	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีแดง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
MG 1.3	MG 1.31	โคโลนีรูปร่างกลม ชุ่น ผิวหน้ามันวาว สีขาวชุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	MG 1.32	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวชุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	MG 1.33	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวชุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
MG 2.1	MG 2.11	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวชุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	MG 2.12	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวชุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
MG 2.1 (ต่อ)	MG 2.13	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MG 2.14	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
MG 2.2	MG 2.21	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหนามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
	MG 2.22	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหนามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
	MG 2.23	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหนามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
MG 2.3	MG 2.31	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหนามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	MG 2.32	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหนามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MG 2.33	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหนามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
MG 3.1	MG 3.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MG 3.12	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	✓
	MG 3.13	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
MG 3.2	MG 3.21	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ในประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
MG 3.2 (ต่อ)	MG 3.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มีมันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MG 3.23	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
MG 3.3	MG 3.31	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MG 3.32	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีม ชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์	✓
MA 1.1	MA 1.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาว ชุ่ม ขอบเว้าและหยัก	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 1.12	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีม ชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 1.13	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันและเรียบ สีขาว ชุ่ม เรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	MA 1.14	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์	✓
MA 1.2	MA 1.21	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มีมันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 1.22	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีม ชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 1.23	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีม ชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
MA 1.3	MA 1.31	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มีมันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ในประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
MA 1.3 (ต่อ)	MA 1.32	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	สร้างสปอร์	✓
	MA 1.33	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
MA 2.1	MA 2.11	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	MA 2.12	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 2.13	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	MA 2.14	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	MA 2.15	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวชุ่ม ขอบหยัก	กลม	+	ไม่สร้างสปอร์	
MA 2.2	MA 2.21	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวชุ่ม ขอบหยัก	กลม	+	สร้างสปอร์	✓
	MA 2.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวชุ่ม ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
MA 2.3	MA 2.31	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 2.32	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	MA 2.33	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ในประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
MA 3.1	MA 3.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	กลม	+	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 3.12	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 3.13	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
MA 3.2	MA 3.21	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	สร้างสปอร์	✓
	MA 3.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	สร้างสปอร์	✓
	MA 3.23	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อนยาว	-	สร้างสปอร์	✓
MA 3.3	MA 3.31	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 3.32	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	MA 3.33	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
FR 1.1	FR 1.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 1.12	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ในประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
FR 1.1 (ต่อ)	FR 1.14	โคโลนีรูปร่างกลม ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
FR 1.2	FR 1.21	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ ไม่มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 1.22	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีม ชุ่ม ขอบเรียบ	ท่อนยาว	-	สร้างสปอร์	✓
	FR 1.23	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันและเรียบ สีขาว ชุ่ม ขอบเรียบ	กลม	+	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 1.24	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	กลม	+	ไม่สร้างสปอร์	
FR 1.3	FR 1.31	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีม ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 1.32	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาว ชุ่ม ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์	✓
	FR 1.33	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 1.34	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีขาว ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	สร้างสปอร์	✓
FR 2.1	FR 2.11	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีม ชุ่ม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 2.12	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาว ชุ่ม ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ในประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่การเกษตร จังหวัดชลบุรีทั้งหมด 129 ไอโซเลท

รหัสของเชื้อ	Isolate	ลักษณะเชื้อ	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ทดสอบอาหาร T6
FR 2.1 (ต่อ)	FR 2.13	โคโลนีกลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	สร้างสปอร์	✓
FR 2.2	FR 2.21	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	FR 2.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้า ขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	กลม	+	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 2.23	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
FR 2.3	FR 2.31	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์	✓
	FR 2.32	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันวาว เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
FR 3.1	FR 3.11	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างสปอร์	✓
	FR 3.12	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์	
FR 3.2	FR 3.21	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน ยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 3.22	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน ยาว	+	ไม่สร้างสปอร์	
FR 3.3	FR 3.31	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน ยาว	-	ไม่สร้างสปอร์	
	FR 3.32	โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้า มันและเรียบ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน ยาว	-	ไม่สร้างสปอร์	

หมายเหตุ : ติดสีแกรม + คือ เชื้อแกรมบวก, ติดสีแกรม - คือ เชื้อแกรมลบ,

✓ คือ ไอโซเลทของเชื้อที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว T6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 ข้างต้น พบเชื้อจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะจะเป็น *Clostridium* spp. เพียง 54 ไอโซเลท เนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับเชื้อ *Clostridium* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การย้อมติดสีของแกรมบวกและการสร้างสปอร์ของเซลล์ ซึ่งแต่โคโลนีของเชื้อจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน ซึ่งส่วนใหญ่แล้วโคโลนีมีลักษณะกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น และขอบเรียบ โดยพบเชื้อจุลินทรีย์ในบริเวณต่างๆ แตกต่างกันไป ดังนี้ สวนลำไย 12 ไอโซเลท ไร่ข้าวโพด 7 ไอโซเลท สวนผสม 13 ไอโซเลท บริเวณดินฮวงซู่ย 12 ไอโซเลท และพื้นที่ป่า 10 ไอโซเลท โดยพบเชื้อจุลินทรีย์จากบริเวณดินสวนผสมมากที่สุด

ในการศึกษาของ Abd-Alla และคณะ (2014) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลได้ โดยคัดแยกจากดินที่ใช้ในการเพาะปลูก ประเทศอียิปต์ พบว่า เชื้อที่ให้ผลผลิต ABE ทั้งหมดมีรูปร่างเป็นท่อน แกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ และโคโลนีบาง ไอโซเลทจะมีสีที่ไม่เหมือนกันกับโคโลนีของไอโซเลทอื่นๆ เช่น เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในเพลทอาหาร RCM พบว่าเชื้อรหัส ASU 10 มีโคโลนีสีขาว แกรมบวก แต่เมื่อเซลล์แก่จะติดสีแกรมลบ เชื้อรหัส ASU 55 มีโคโลนีสีขาว กลม ขอบเรียบ แกรมบวก ส่วนเชื้อรหัส ASU 58 มีโคโลนีสีขาวจนถึงสีชมพู ผิวหน้าเรียบ ไม่มีรูปร่างที่แน่นอน

4.3 ค่าความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้

จากการคัดเลือกเชื้อด้วยลักษณะทางกายภาพแล้ว (ตารางที่ 4.2) เชื้อที่มีคุณสมบัติในการติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์และมีรูปร่างเป็นท่อน จะนำมาทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว T6 จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ดังผลที่ปรากฏในตารางที่ 4.3 พบว่า เชื้อ CN 1.22 สามารถผลิตบิวทานอลที่มีความเข้มข้น 0.2453 กรัมต่อลิตร เชื้อที่ผลิตอะซิโตนให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ CN 1.23 (2.0966 กรัมต่อลิตร) ส่วนความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงที่สุดจะผลิตได้จาก MA 2.32 (0.5388 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ LG 2.21, LG 2.31, LG 2.32, LG 2.33, LG 2.34, CN 1.11, CN 1.13, CN 1.21, MG 1.31, MG 1.33, MG 2.21, MA 2.11, MA 2.13, FR 2.12, FR 2.23 และ FR 2.31 กลับไม่พบปริมาณบิวทานอล เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมแล้ว เชื้อที่ให้ความเข้มข้นสูงสุดคือ CN 1.23 มีความเข้มข้น 2.4520 กรัมต่อลิตร ซึ่งโดยทั่วไปผลผลิตรวม ABE ของ *Clostridium* spp. มีค่าตั้งแต่ 0.900 จนถึงสูงสุด 20.000 กรัมต่อลิตร และความสามารถในการผลิต คือ 0.040 จนถึง 0.240 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง ความสามารถในการผลิต ABE ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ ชีวมวลที่ใช้ อุณหภูมิ สปีชีส์ของ *Clostridium* spp. (ชนิกา และคณะ, 2555) นอกจากนี้ ยังรวมถึงระยะเวลาในการตรวจสอบปริมาณของบิวทานอล โดยระหว่างการเจริญเติบโตในระยะ Stationary phase เชื้อจะมีความสามารถผลิตบิวทานอลและอะซิโตนได้สูงสุด ซึ่งโปรเวทที่ได้จากระยะ Exponential phase จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตท บิวทิเรทและบิวทานอล ดังนั้น เมื่อเชื้อเข้าสู่สภาวะ Stationary phase ให้ทำการเก็บเชื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อไม่ให้ปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ลดลง จึงไม่ให้ทำค่าความเข้มข้นของสารคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง (Cato และคณะ, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและความเข้มข้นของตัวทำละลายรวม
ที่วิเคราะห์ได้จากเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะจะเป็น *Clostridium* spp. 30 ไอโซเลท

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น อะซิโตน (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้น บิวทานอล (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้น เอทานอล (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นของตัวทำ ละลายรวม (กรัม/ลิตร)
LG 2.21	0.2948 ^{efgh} ±0.0773	0.0000 ^d ±0.0000	0.0934 ^{jk} ±0.0226	0.3882 ^{ij} ±0.0999
LG 2.31	0.0093 ^h ±0.0088	0.0000 ^d ±0.0000	0.3345 ^{efghi} ±0.0696	0.3438 ^{ij} ±0.0784
LG 2.32	0.0071 ^h ±0.0076	0.0000 ^d ±0.0000	0.4112 ^{bcdefg} ±0.0167	0.4183 ^{hij} ±0.0243
LG 2.33	0.0000 ^h ±0.0000	0.0000 ^d ±0.0000	0.3831 ^{cdefgh} ±0.0759	0.3831 ^{ij} ±0.0759
LG 2.34	0.0101 ^h ±0.0104	0.0000 ^d ±0.0000	0.4279 ^{bcde} ±0.0063	0.4380 ^{hij} ±0.0167
CN 1.11	0.7258 ^{bcde} ±0.1697	0.0000 ^d ±0.0000	0.0678 ^{jk} ±0.0144	0.7936 ^{cdefghi} ±0.1841
CN 1.13	0.1524 ^{gh} ±0.0365	0.0000 ^d ±0.0000	0.4330 ^{bcde} ±0.0002	0.5864 ^{fghij} ±0.0367
CN 1.21	0.6796 ^{bcdef} ±0.1425	0.0000 ^d ±0.0000	0.0591 ^k ±0.0165	0.7387 ^{defghi} ±0.1590
CN 1.22	1.923 ^a ±0.5662	0.2453 ^a ±0.0727	0.1050 ^{jk} ±0.0268	2.2733 ^a ±0.6657
CN 1.23	2.0966 ^a ±0.5681	0.1885 ^b ±0.0560	0.1669 ^j ±0.0514	2.4520 ^a ±0.6755
MG 1.21	2.0838 ^a ±0.5710	0.2133 ^{ab} ±0.0694	0.1036 ^{jk} ±0.0160	2.4007 ^a ±0.6564
MG 1.31	0.0090 ^h ±0.0083	0.0000 ^d ±0.0000	0.0534 ^k ±0.0023	0.0624 ^j ±0.0106
MG 1.32	0.8618 ^{bcd} ±0.1963	0.0450 ^{cd} ±0.0106	0.4109 ^{bcdefg} ±0.0027	1.3177 ^{bcd} ±0.2096
MG 1.33	0.4064 ^{defgh} ±0.0980	0.0000 ^d ±0.0000	0.3141 ^{fghi} ±0.0155	0.7205 ^{efghi} ±0.1135
MG 2.11	0.4116 ^{defgh} ±0.0931	0.0068 ^d ±0.0063	0.4084 ^{bcdefg} ±0.0030	0.8268 ^{cdefghi} ±0.1024
MG 2.12	0.9184 ^{bc} ±0.2270	0.0343 ^{cd} ±0.0089	0.4208 ^{bcdefg} ±0.0096	1.3735 ^{bc} ±0.2455
MG 2.21	0.1689 ^{gh} ±0.1629	0.0000 ^d ±0.0000	0.4248 ^{bcdef} ±0.0340	0.5937 ^{fghij} ±0.1969
MG 2.22	0.6642 ^{bcdef} ±0.1815	0.0197 ^{cd} ±0.0186	0.3981 ^{bcdefg} ±0.0795	1.0820 ^{bcdefg} ±0.2796
MG 2.23	0.6739 ^{bcdef} ±0.6408	0.0319 ^{cd} ±0.0303	0.4561 ^{abcd} ±0.1319	1.1619 ^{bcdef} ±0.8030
MA 2.11	0.0124 ^a ±0.0108	0.0000 ^d ±0.0000	0.3545 ^{defghi} ±0.0298	0.3669 ^{ij} ±0.0406
MA 2.13	0.0068 ^h ±0.0074	0.0000 ^d ±0.0000	0.3124 ^{ghi} ±0.0568	0.3192 ^{ij} ±0.0642
MA 2.14	0.1907 ^{fgh} ±0.2414	0.0063 ^d ±0.0067	0.2888 ^{hi} ±0.1521	0.4858 ^{hij} ±0.4002
MA 2.22	0.7524 ^{bcde} ±0.0836	0.0323 ^{cd} ±0.0305	0.4965 ^{ab} ±0.0944	1.2812 ^{bcde} ±0.2085
MA 2.32	0.9321 ^{bc} ±0.2055	0.0631 ^c ±0.0222	0.5388 ^a ±0.0139	1.5340 ^b ±0.2416
FR 1.32	0.6841 ^{bcdef} ±0.3863	0.0308 ^{cd} ±0.0333	0.4825 ^{abc} ±0.0639	1.1974 ^{bcde} ±0.4835
FR 2.12	0.3488 ^{efgh} ±0.1168	0.0000 ^d ±0.0000	0.3825 ^{cdefgh} ±0.0081	0.7313 ^{defghi} ±0.1249
FR 2.21	0.5985 ^{cdefg} ±0.2521	0.0193 ^{cd} ±0.0192	0.3820 ^{cdefgh} ±0.0903	0.9998 ^{bcdefgh} ±0.3616
FR 2.23	0.1126 ^{gh} ±0.0705	0.0000 ^d ±0.0000	0.4037 ^{bcdefg} ±0.0648	0.5163 ^{ghij} ±0.1353
FR 2.31	0.1298 ^{gh} ±0.1196	0.0000 ^d ±0.0000	0.4229 ^{bcdefg} ±0.0386	0.5597 ^{ghij} ±0.1582
FR 2.32	1.1437 ^b ±0.2337	0.0571 ^c ±0.0116	0.2749 ⁱ ±0.0192	1.4757 ^b ±0.2645

หมายเหตุ : a, b, c, d, e, f, g, h, i, j และ k ในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05); ค่าที่แสดง
ในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Montoya และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่เรียกว่า 178 ชนิดที่สามารถผลิตบิวทานอล และอะซิโตนได้นั้นมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia ที่สามารถย่อยน้ำตาล ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งทางการเกษตรในประเทศโคลัมเบีย เชื้อที่คัดแยกได้ 13 ชนิด ผลิตตัวทำละลายทั้งหมดได้มากกว่า *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงสุดจากที่คัดแยกได้ คือ IBUN 125C และ IBUN 18A ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของ ABE เท่ากับ 25.200 และ 29.100 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

4.4 การทดสอบทางชีวเคมี

ไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Clostridium* spp. ได้แก่ CN 1.22 MG 2.12 MG 2.23 และ MA 2.14 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่คัดแยกได้จาก ไร่ข้าวโพด จุดที่ 1 สวนผสม จุดที่ 2 และดินฮวงซุ้ย จุดที่ 2 ตามลำดับ โดยไอโซเลททั้ง 4 ตัวอย่างนี้สามารถย่อยน้ำตาลมอลโตส ไซโลส เซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังสร้างแก๊สในระหว่างการเจริญเติบโต มีการเคลื่อนที่ และยังมีการสร้างเอนไซม์แคตาเลสและเอนไซม์ไฮโดรโมอกซิเดสอีกด้วย ดังตารางที่ 4.3

ในการศึกษาของ Nomura และคณะ (2013) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนและเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์ โดยทำการคัดแยกจากสลัดจ์ที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นตรวจสอบเชื้อทางกายภาพ ได้แก่ การติดสีแกรม และการติดสีสปอร์ ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง PGY การสร้างคะตะเลสและออกซิเดส การทำงานของเอนไซม์ต่อคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API20A ซึ่งพบว่า เชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อแกรมบวก รูปร่างท่อน สามารถสร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ โคโลนีบนอาหารแข็ง PGY มีลักษณะกลมเรียบ สีเหลืองอ่อน พบการสร้างคะตะเลสและเบต้ากลูโคซิเดส แต่ไม่พบการสร้างออกซิเดส ยูรีเอส และเจลาติเนส นอกจากนี้ยังสามารถหมักน้ำตาล D-กลูโคส, D-มอลโตส, D-ไซโลส, D-เซลโลไบโอส, D-แมนนิทอล, D-แลกโตส, D-แมนโนส, D-ทรีฮาโลส และ L-อะราบิโนส ในทางกลับกันเชื้อไม่สามารถหมักกลีเซอรอลได้

นอกจากเชื้อ *C. acetobutylicum* แล้ว เชื้อที่สามารถหมักน้ำตาลมอลโตสและเซลโลไบโอสได้คือ *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* และ *C. saccharobutylicum* ส่วนน้ำตาลไซโลส *C. beijerinckii* สามารถหมักได้ แต่ *C. saccharoperbutylacetonicum* และ *C. saccharobutylicum* ยังไม่มีการทดสอบการหมักน้ำตาลไซโลส

ตารางที่ 4.4 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp. 14 ไอโซเลท ซึ่งผ่านการทดสอบการย่อยน้ำตาลมอลโตส ไฮโลส เซลโลโบโอส ทดสอบการสร้างแก๊ส ทดสอบการเคลื่อนที่ การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส และการทดสอบไซโตโครมออกซิเดส

รหัสของเชื้อ	ทดสอบการย่อยน้ำตาล			ทดสอบการสร้างแก๊ส	ทดสอบการเคลื่อนที่	Catalase test	Cytochrome oxidase test
	มอลโตส	ไฮโลส	เซลโลโบโอส				
<i>C. acetobutylicum</i>	+	+	±	+	±	+	-
<i>C. beijerinckii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	+	+	+	+	+	+	-
CN 1.22	+	+	+	+	+	+	+
CN 1.23	+	+	+	+	+	+	+
MG 1.21	+	+	+	+	+	+	+
MG 1.32	+	+	-	+	+	+	-
MG 2.11	+	-	-	+	+	+	+
MG 2.12	+	+	+	+	+	+	-
MG 2.22	+	-	-	+	+	+	-
MG 2.23	+	+	+	+	+	+	-
MA 2.14	+	+	+	+	+	+	-
MA 2.22	+	+	-	+	+	+	-
MA 2.32	+	+	-	+	+	+	+
FR 1.32	+	+	+	+	+	-	+
FR 2.21	+	+	-	+	+	+	+
FR 2.32	+	+	-	+	+	-	-

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ที่มาของ *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* คือ Whitman (1986)

Bellido และคณะ (2014) ยังศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลไฮโลสและกลูโคสด้วยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* โดยเลือกใช้วัตถุดิบที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกศึกษาการหมักน้ำตาลไฮโลส เนื่องจาก *Clostridium* sp. สามารถให้ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงเมื่อใช้วัตถุดิบเป็นน้ำตาลเพนโทส

การเคลื่อนที่ของ *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum* รวมถึง *Clostridium* spp. สายพันธุ์อื่นๆ พบว่ามีความสามารถในการเคลื่อนที่ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีแฟลกเจลลารอบตัวเซลล์ (Peritrichous flagella) (Cato และคณะ, 1986) จึงทำให้การทดสอบการเคลื่อนที่มีผลเป็นบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอล โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรี ซึ่งแหล่งดินที่ทำการสำรวจ ได้แก่ บริเวณพื้นที่การเกษตร สวนลำไย ไร่ข้าวโพด สวนผสม บริเวณดินฮวงซุ้ย และพื้นที่ป่าในจังหวัดชลบุรี โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ซึ่งคัดแยกได้ 129 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Clostridium* spp. มีทั้งหมด 54 ไอโซเลท ซึ่งมีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเชื้ออ้างอิง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การย้อมติดสีของแกรมบวกและการสร้างเอนโดสปอร์บริเวณส่วนปลายของเซลล์ แต่ลักษณะของโคโลนีจะแตกต่างกันออกไป

เมื่อนำตัวอย่างที่วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยามาตรวจสอบหาปริมาณความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยนับเหรียญด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบสารผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ 3 อันดับที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด ได้แก่ รหัส CN 1.22 MG 1.21 และ CN 1.23 ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอลเท่ากับ 0.2453 0.2133 และ 0.1885 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเชื้อ CN 1.22 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 0.2453 กรัมต่อลิตร เชื้อ CN 1.23 สามารถผลิตอะซิโตนให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 2.0966 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อที่ผลิตเอทานอลที่ได้ความเข้มข้นสูงสุดจะผลิตได้จาก MA 2.32 คือ 0.5388 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมแล้ว เชื้อที่ให้ความเข้มข้นสูงสุดคือ CN 1.22 มีความเข้มข้น 2.2733 กรัมต่อลิตร เนื่องจากอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไอโซเลท CN 1.23 แต่บิวทานอลที่เชื้อ CN 1.22 ผลิต 0.2453 กรัมต่อลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับบิวทานอลที่เชื้อ CN 1.23 ผลิต 0.1885 กรัมต่อลิตรได้

จากนั้นนำเชื้อมาทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น โดยทำการหมักน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ มอลโตส ไซโลสและเซลโลไบโอส การสร้างแก๊ส การเคลื่อนที่ การสร้างเอนไซม์แคตาเลสและเอนไซม์ไฮโดรโมออกซิเดส พบว่า เชื้อรหัส MG 2.12 MG 2.23 และ MA 2.14 มีคุณสมบัติดังกล่าวใกล้เคียงกับ *Clostridium* spp. มากที่สุด และพบว่า CN 1.22 สามารถย่อยน้ำตาลมอลโตส ไซโลส เซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังสร้างแก๊สในระหว่างการเจริญเติบโต มีการเคลื่อนที่ มีการสร้างเอนไซม์แคตาเลสแต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรโมออกซิเดส โดยเชื้อทั้ง CN 1.22 MG 2.12 MG 2.23 และ MA 2.14 นี้คัดแยกได้จากจาก ไร่ข้าวโพด จุดที่ 1 สวนผสมจุดที่ 2 และดินฮวงซุ้ย จุดที่ 2 ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่มุ่งเน้นไปที่การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสกุล *Clostridium* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งก็คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยคัดแยกได้จากแหล่งดินบริเวณพื้นที่การเกษตรจังหวัดชลบุรี จากการวิเคราะห์แหล่งดินบริเวณพื้นที่การเกษตรในจังหวัดชลบุรี พบว่า การเก็บตัวอย่างดินในแต่ละพื้นที่ไม่ครอบคลุม ส่งผลให้เชื้อที่คัดแยกได้ไม่มีความหลากหลายหรือมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และได้เชื้อที่ได้อาจเป็นเชื้อตัวเดียวกัน นอกจากนี้ถ้าหากต้องการศึกษาต่อยอดงานวิจัยควรต้องศึกษาถึงระดับพันธุศาสตร์ของเชื้อเพื่อให้สามารถระบุจีโนสและสปีชีส์ได้ จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ 16s rRNA และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอย่างละเอียด อันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในครั้งต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูษ วิภูษานนท์ และ วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล. 2555. ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 22(3) : 703-709
- ธีระนัย สามะหาดไทย, ปาริฉัตร คำชาย และ อรรถพล ประทีปทอง. 2556. การศึกษาผลของน้ำตาลโมเลกุลคู่ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462. โครงการพิเศษ. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุชาติพิทย์ ตรีพลอักษร และ นฤมล ทองไว. 2554. “การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน.” การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 23 เชียงใหม่ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 237-257.
- อภิญา จันทรวัดนะ หลักปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/sub.php>. (วันที่สืบค้น: 1 เมษายน 2560)
- Abd-Alla, M. H., Ahmed Zohri Abdel-Naser, El-Enany Abdel-Wahab Elsadek, Ali S. M. 2014. Acetone/butanol/ethanol Production from Substandard and Surplus Dates by Egyptian Native *Clostridium* Strains. *Anaerobe*. 32: 77–86.
- Al-Shorgani, N. K. N., Isa Mohd Hafez Mohd, Yusoff Wan Mohtar Wan, Kalil Mohd Sahaid, Hamid Aidil Abdul. 2016. Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* Strain and Characterization of Its Fermentation Performance on Agricultural Wastes. *Renewable Energy*. 86: 459-465.
- Atsumi, S., Hanai, T. & Liao, J.C. 2008. Non-fermentative Pathways for Synthesis of Branched Chain higher Alcohols as Biofuels. *Nature*. 451: 86–89.
- Bellido, C., Infante C., Coca M., González-Benito G., Lucas S. and García-Cubero M. T. 2015. Efficient Acetone–Butanol–Ethanol Production by *Clostridium beijerinckii* from Sugar Beet Pulp. *Bioresource Technology*. 190: 332 – 338.
- Bellido, C., Pinto M. L., Coca M., González-Benito G. and García-Cubero M. T. 2014. Acetone–butanol–ethanol (ABE) Production by *Clostridium beijerinckii* from Wheat Straw Hydrolysates : Efficient Use of Penta and Hexa Carbohydrates. *Bioresource Technology*. 190: 332 – 338.
- Berezina, Oksana V., Brandt Agnieszka, Yarotsky Sergey, Schwarz Wolfgang H., Zverlov Vladimir V. 2009. Isolation of A New Butanol-producing *Clostridium* strain: Highlevel of Hemicellulosic Activity and Structure of Solventogenesis Genes of A New *Clostridium saccharobutylicum* Isolate. *Systematic and Applied Microbiology*. 32: 449–459.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Davis, S. E., and Morton, S., A. III. 2008. Investigation of Ionic Liquids for The Separation of Butanol and Water. *Separation Science and Technology* 43: 2460-2472.
- Gram, C. 1884. The Differential Staining of Schizomycetes in Tissue Sections and in Dried Preparations. *Fortschritte der Medicin*. 2: 185-189.
- Hansen, Alan C., Qin Zhang, Peter, W.L. Lyne. 2005. Ethanol Diesel Fuel Blends A Review. *Bioresource Technology*. 96: 277-285.
- Jones, D. T., and Woods, D. R. 1986. Acetone-butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*. 50: 484-524.
- Lee, S.-M., Cho, M. O., Park, C. H., Chung, Y.-C., Kim, J. H., Sang, B.-I., and Um, Y. 2008a. Continuous Butanol Production Using Suspended and Immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with Supplementary Butyrate. *Energy and Fuels*. 22: 3459-3464.
- McCoy, E., E. B. Fred, W. H. Peterson, and E. G. Hastings. 1926. A Cultural Study of the Acetone Butyl Alcohol Organism. *J. Infect. Dis.* 39: 457-483.
- Montoya, Dolly, Spitia Sandra, Silva Edelberto, Schwarz Wolfgang H. 2000. Isolation of Mesophilic Solvent-producing Clostridia from Colombian Sources: Physiological Characterization. Solvent Production and Polysaccharide Hydrolysis. *Journal of Biotechnology*. 79: 117-126.
- Najeeb Kaid Nasser Al-Shorgani, Mohd Hafez Mohd Isa, Wan Mohtar Wan Yusoff, Mohd Sahaid Kalil, Aidil Abdul Hamid. 2016. Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes. *Renewable Energy*. 86: 459-465
- Nomura, Toshiyuki, Naimen Azusa, Toyoda Syunsuke, Kuriyama Yuta, Tokumoto Hayato, Konishi Yasuhiro. 2013. Isolation and Characterization of A Novel Hydrogen-producing Strain *Clostridium* sp. Suitable for Immobilization. *International Journal of Hydrogen energy*. 39: 1280-1287.
- Tankeshwar Acharya. 2010. Cultivation of Aerobic and Anaerobic Bacteria [Online]. Available : <http://microeonline.com/cultivation-of-aerobic-and-anaerobic-bacteria/> (วันที่สืบค้น: 22 ธันวาคม 2560).
- Tankeshwar Acharya. 2013. Commonly used anaerobic media for anaerobic bacteriology [Online]. Available : <http://microbeonline.com/commonly-used-anaerobic-media-for-anaerobic-bacteriology/> (วันที่สืบค้น: 22 ธันวาคม 2560).
- William B. Whitman. 1986. *Bergey's Manual Trust Department of Microbiology* 527. Biological Sciences Building University of Georgia Athens, USA. P. 749-810



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด เตรียมโดยผสมกับน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารด้วย NaOH จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้ได้ pH ตามต้องการ

1. Reinforced Clostridial Medium (RCM)

Peptone	10.0	กรัม
Beef Extract	10.0	กรัม
Yeast Extract	10.0	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Soluble Starch	1.0	กรัม
Cystein HCl	0.5	กรัม
Sodium Acetate	3.0	กรัม
Agar	0.5	กรัม
pH	6.5 ± 0.2	

*หมายเหตุ ผสมอาหารสำเร็จรูป 30.05 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

กรณีต้องการเตรียมอาหาร RCM agar ให้เติมวุ้น 1.5 - 2.0 % ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ

2. T6 Medium (ปรับปรุงมาจากอาหาร TYA, Al-Shorgani และคณะ 2016)

Tryptone	6.0	กรัม
Yeast Extract	2.0	กรัม
Glucose	30.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3	กรัม
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10.0	มิลลิกรัม
Ammonium Acetate	3.0	กรัม
Cystein Hydrochloride	0.5	กรัม
pH	6.5 ± 0.2	

กรณีต้องการเตรียมอาหาร T6 agar ให้เติมวุ้น 1.5 - 2.0 % ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารอินทรีย์และสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วย HPLC และกราฟมาตรฐาน

1. สารละลายกรดซิตริก ร้อยละ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ซั่งผงซิตริก 2 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดซัลฟิวริก

เตรียมเตรียมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปต H_2SO_4 0.272 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

3. อะซิโตน

เตรียมอะซิโตน ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตอะซิโตน 7.34 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. เอทานอล

เตรียมเอทานอล ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตเอทานอล 5.87 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

5. บิวทานอล

เตรียมบิวทานอล ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตบิวทานอล 0.92 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายอินทรีย์ในการวิเคราะห์

เตรียมสารละลายเอทานอล อะซิโตน และบิวทานอล ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 โมลาร์ โดยปิเปตสารละลายจาก Stock ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 0.10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ

นำสารละลายทั้งหมดกรองผ่านชุดกรองระบบสุญญากาศ ใช้เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายโมบายเฟสและน้ำกลั่นปราศจากไอออน (De-ionized water) แล้วนำกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่อง Sonicator bath เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC

กราฟสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายอะซิโตน (Acetone) มาตรฐาน

ความเข้มข้นอะซิโตนคือ 99.98% มวลโมเลกุล 58.05 และความหนาแน่นที่ 25°C คือ 0.791 คำนวณความเข้มข้นอะซิโตนจากสูตรดังต่อไปนี้

$$C = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} = \frac{10 \times 0.791 \times 99.98}{58.05} = 13.62 \text{ โมลาร์}$$

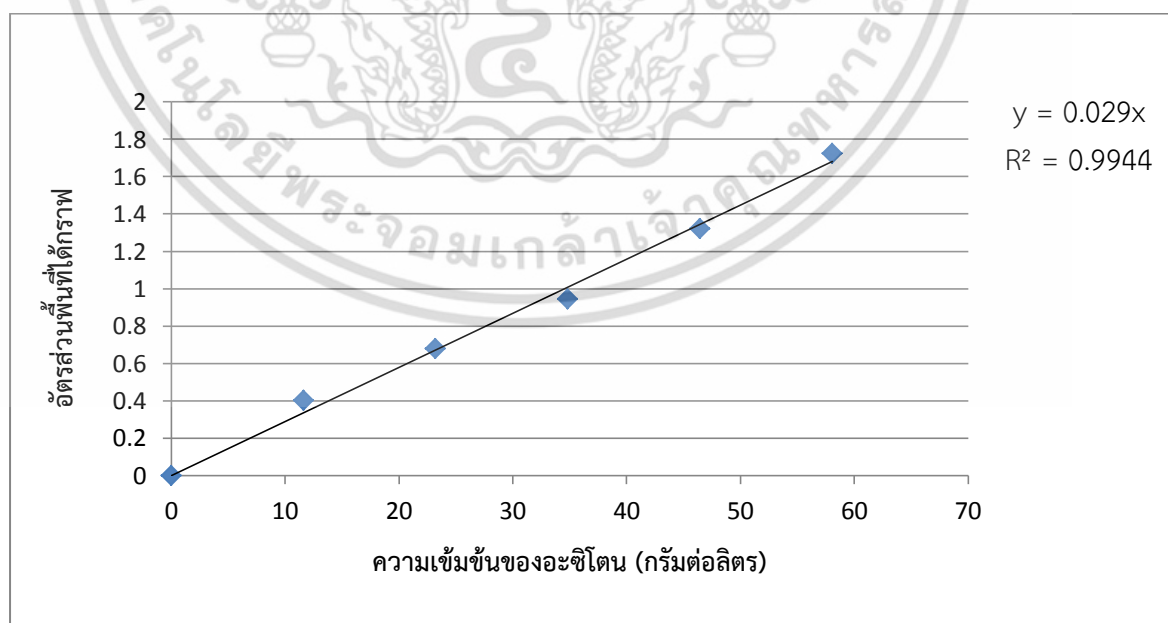
- เตรียมสารละลาย (Stock) อะซิโตนความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร คำนวณจาก สูตรดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (13.62 \text{ M})(v_1) &= (1.0 \text{ M})(25 \text{ ml}) \\ v_1 &= 1.89 \text{ ml} \end{aligned}$$

- เตรียมสารละลาย (Standard) อะซิโตนความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1.0 \text{ M})(v_1) &= (0.2 \text{ M})(10 \text{ ml}) \\ v_1 &= 2 \text{ ml} \end{aligned}$$

ดังนั้น สารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ใช้อะซิโตนความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร



รูปที่ ข.1 กราฟสารละลายมาตรฐานอะซิโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายบิวทานอล (Butanol) มาตรฐาน

ความเข้มข้นบิวทานอลคือ 99.7% มวลโมเลกุล 74.12 ความหนาแน่นที่ 25°C คือ 0.81
คำนวณความเข้มข้นจากสูตรดังต่อไปนี้

$$C = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} = \frac{10 \times 0.81 \times 99.7}{74.12} = 10.90 \text{ โมลาร์}$$

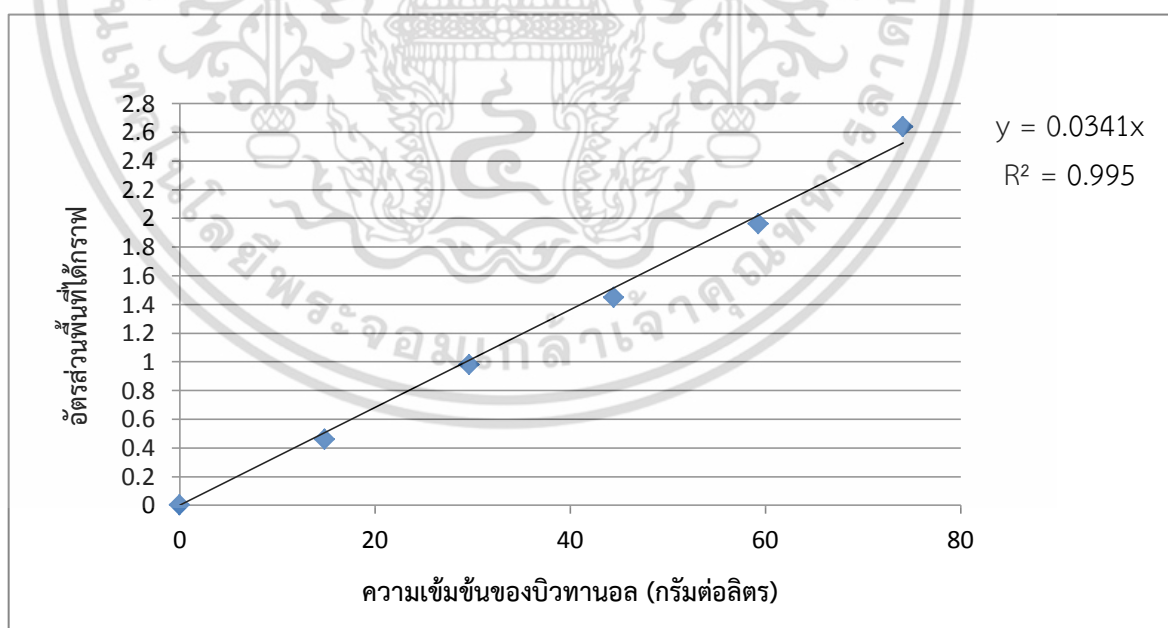
- เตรียมสารละลาย (Stock) บิวทานอลความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (10.90 \text{ M})(v_1) &= (1.0 \text{ M})(10 \text{ ml}) \\ v_1 &= 0.92 \text{ ml} \end{aligned}$$

- เตรียมสารละลาย (Standard) บิวทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1.0 \text{ M})(v_1) &= (0.2 \text{ M})(1 \text{ ml}) \\ v_1 &= 0.2 \text{ ml} \end{aligned}$$

ดังนั้น สารละลายบิวทานอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ใช้บิวทานอลความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร



รูปที่ ข.2 กราฟสารละลายมาตรฐานบิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายเอทานอล (Ethanol) มาตรฐาน

ความเข้มข้นของเอทานอลคือ 99.5% มวลโมเลกุล 46.08 และความหนาแน่นที่ 25°C คือ 0.789 คำนวณความเข้มข้นของเอทานอลจากสูตรดังต่อไปนี้

$$C = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} = \frac{10 \times 0.789 \times 99.5}{46.08} = 17.04 \text{ โมลาร์}$$

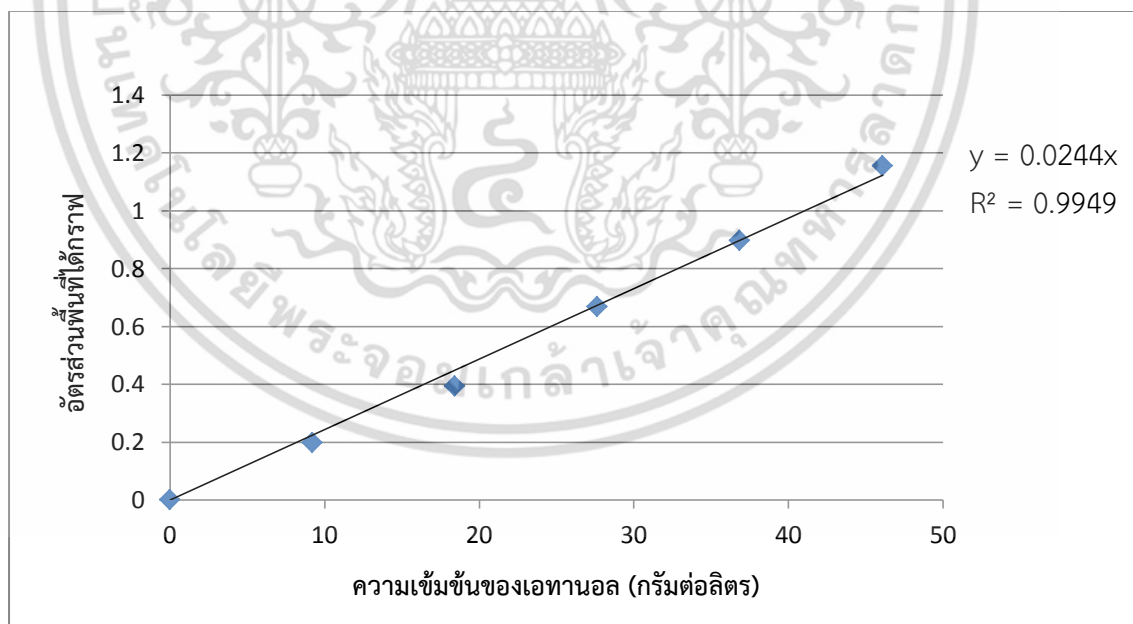
- เตรียมสารละลาย (Stock) เอทานอลความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (17.04 \text{ M})(v_1) &= (1.0 \text{ M})(100 \text{ ml}) \\ v_1 &= 5.87 \text{ ml} \end{aligned}$$

- เตรียมสารละลาย (Standard) เอทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1.0 \text{ M})(v_1) &= (0.2 \text{ M})(1 \text{ ml}) \\ v_1 &= 0.2 \text{ ml} \end{aligned}$$

ดังนั้น สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ใช้เอทานอลความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร



รูปที่ ข.3 กราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

อาหารที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมี

1. Phenol red cellobiose broth

Cellobiose	0.5-1.0	เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Phenol red	0.0189	มิลลิกรัม

2. Phenol red maltose broth

Maltose	0.5-1.0	เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Phenol red	0.0189	มิลลิกรัม

3. Phenol red xylose broth

Xylose	0.5-1.0	เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Phenol red	0.0189	มิลลิกรัม

4. Yeast Mold (YM) agar

Starch soluble	0.1	เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	20	กรัม

5. Motility test medium

Tryptose	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	5	กรัม

วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี

ส่วนผสมของแต่ละอาหารให้นำมาผสมกับน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันโดยใช้เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) แล้วเปิดลงสู่หลอดทดลองด้วยปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

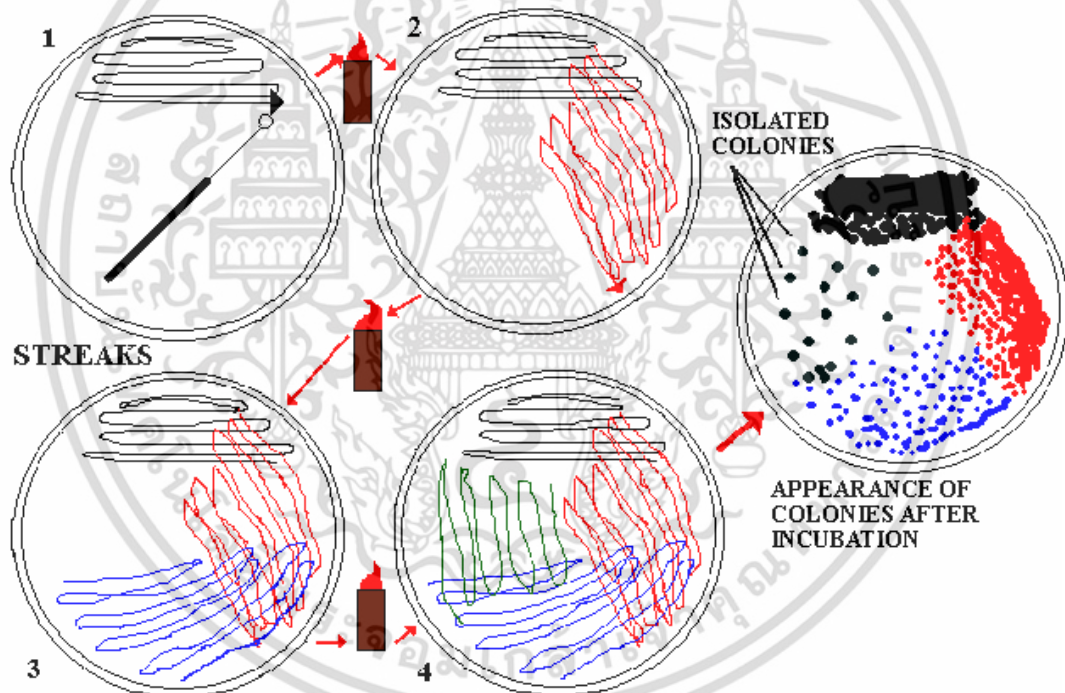
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

เทคนิคการตัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

Streak-Plate Technique

เทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์คือ วิธี Cross streak plate ซึ่งทำได้โดยใช้ Loopแตะตัวอย่างแล้วลากหรือขีด (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Agar plate) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำหัววงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ ดังรูป ง.1 (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา, 2556)



รูป ง.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี Cross streak plate
ที่มา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา (2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การย้อมสีแบคทีเรีย

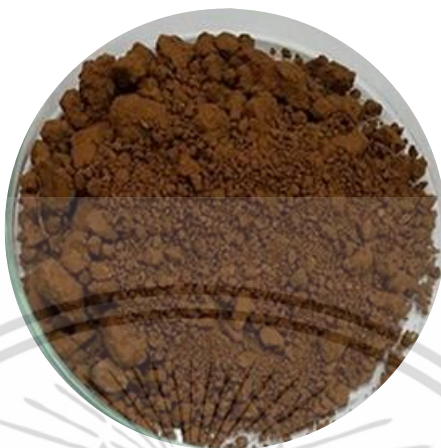
การย้อมสีแบบแกรม (Gram staining)

1. นำห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะหยดน้ำ น้ำมาแตะวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด
2. นำห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะเชื้อ ในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด
3. Smear เชื้อที่อยู่ในหยดน้ำให้กระจายออกเป็นบริเวณบาง ๆ
4. ปลอ่ยสไลด์ทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง (Air dry)
5. ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ โดยใช้ความร้อน (Heat fixed) คือ นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ ประมาณ 2-3 ครั้ง ปลอ่ยให้สไลด์เย็นลง
6. หยดสี Crystal violet ลงบนแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ
7. หยด Gram iodine ลงบนแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ
8. ล้างแผ่นสไลด์ด้วย Acetone-alcohol (Decolorizer) ให้ Iodine ออกเหลือจาง ๆ แล้วล้างออกด้วยน้ำ
9. ย้อมทับด้วยสี Safranin O เป็นเวลา 30-60 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง
10. ทำการตรวจดูรูปร่างเชื้อแบคทีเรีย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า

* หมายเหตุ : แบคทีเรียที่เป็นแกรมบวก จะติดสีม่วง ของ Crystal violet
แบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ จะติดสีแดง ของ Safranin o

ภาคผนวก ฉ

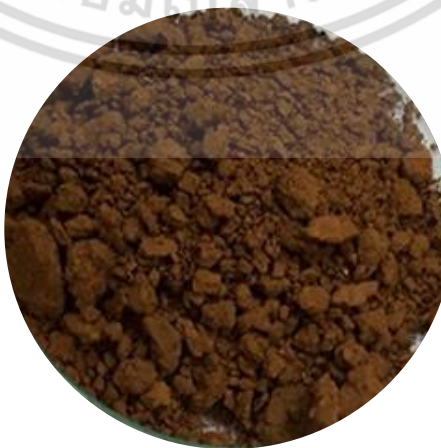
ลักษณะทางกายภาพ



รูปที่ ฉ.1 ลักษณะดินสวนลำไย 1



รูปที่ ฉ.2 ลักษณะดินสวนลำไย 2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้รูปที่ ฉ.3 ลักษณะดินสวนลำไย 3 ญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๔.4 ลักษณะดินไร่ข้าวโพด 1



รูปที่ ๕.5 ลักษณะดินไร่ข้าวโพด 2



รูปที่ ๕.6 ลักษณะดินไร่ข้าวโพด 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.๗ ลักษณะดินสวนผสม 1



รูปที่ ๑.๘ ลักษณะดินสวนผสม 2

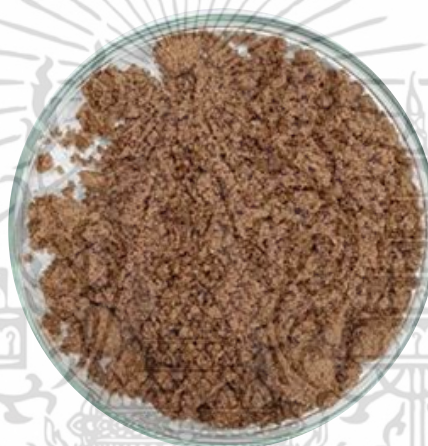


รูปที่ ๑.๙ ลักษณะดินสวนผสม 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.10 ลักษณะดินฮวงซู่ย 1



รูปที่ ฉ.11 ลักษณะดินฮวงซู่ย 2



รูปที่ ฉ.12 ลักษณะดินฮวงซู่ย 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.13 ลักษณะดินป่า 1

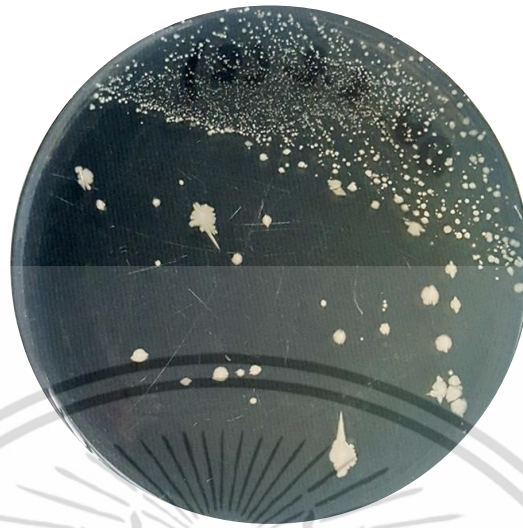


รูปที่ ๑.14 ลักษณะดินป่า 2



รูปที่ ๑.15 ลักษณะดินป่า 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.16 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.21

โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ำมันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ



รูปที่ ฉ.17 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.31

โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ำมันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.18 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.32
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ



รูปที่ ฉ.19 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.33
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.20 ลักษณะโคโลนีของ LG 2.34
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.21 ลักษณะโคโลนีของ CN 1.11
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

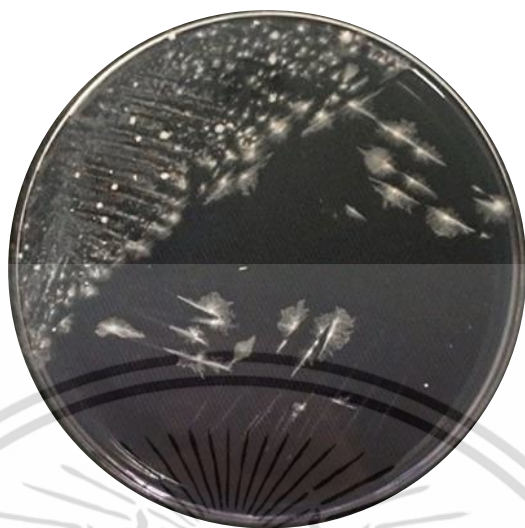


รูปที่ ฉ.22 ลักษณะโคโลนีของ CN 1.13
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.23 ลักษณะโคโลนีของ CN 1.21
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

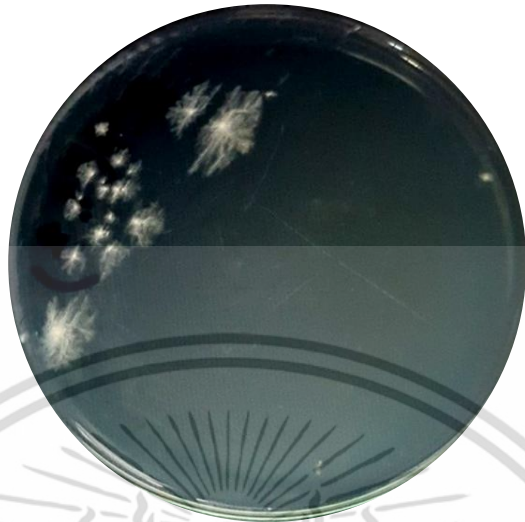


รูปที่ ฉ.24 ลักษณะโคโลนีของ CN 1.22
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



ปที่ ฉ.25 ลักษณะโคโลนีของ CN 1.23
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.26 ลักษณะโคโลนีของ MG 1.21
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.27 ลักษณะโคโลนีของ MG 1.31
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

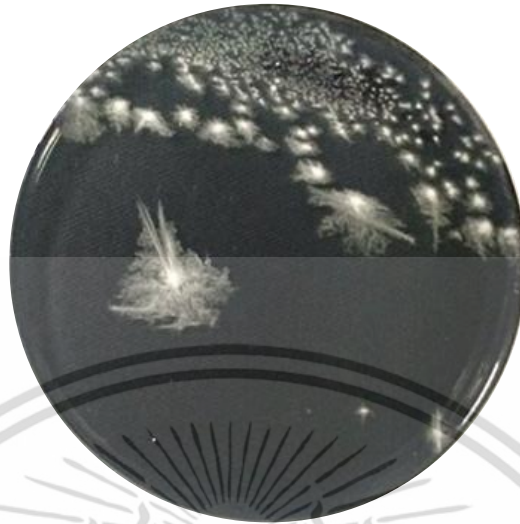


รูปที่ ฉ.28 ลักษณะโคโลนีของ MG 1.32
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.29 ลักษณะโคโลนีของ MG 1.33
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

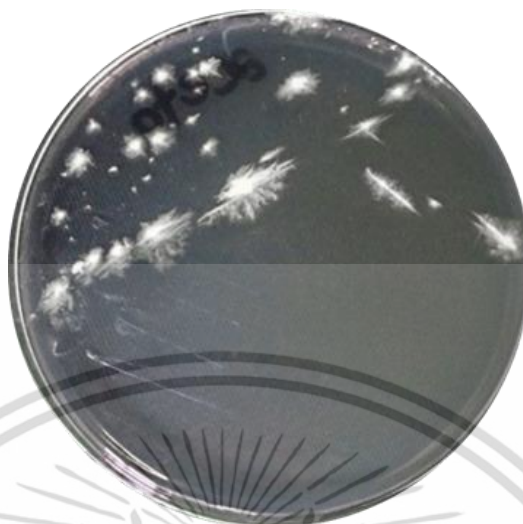


รูปที่ ฉ.30 ลักษณะโคโลนีของ MG 2.11
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.31 ลักษณะโคโลนีของ MG 2.12
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.32 ลักษณะโคโลนีของ MG 2.21
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.33 ลักษณะโคโลนีของ MG 2.22
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

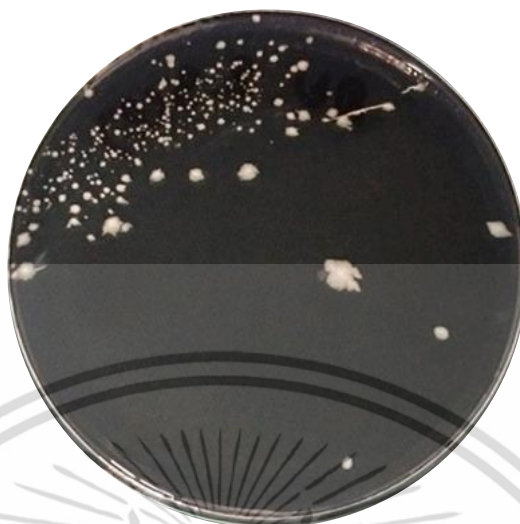


รูปที่ ฉ.34 ลักษณะโคโลนีของ MG 2.23
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.35 ลักษณะโคโลนีของ MA 2.11
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.36 ลักษณะโคโลนีของ MA 2.13
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ



รูปที่ ๑.37 ลักษณะโคโลนีของ MA 2.14
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

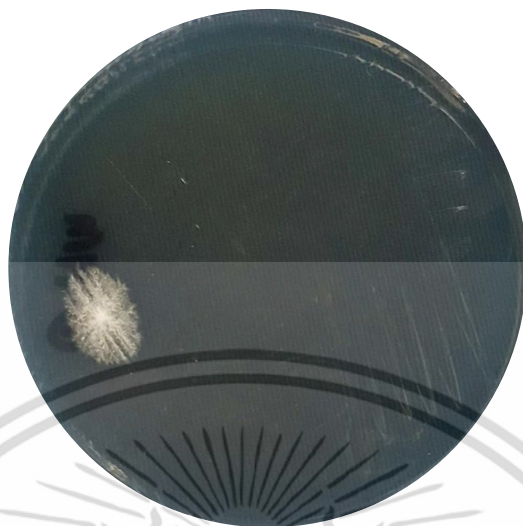


รูปที่ ฉ.38 ลักษณะโคโลนีของ MA 2.22
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.39 ลักษณะโคโลนีของ MA 2.32
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

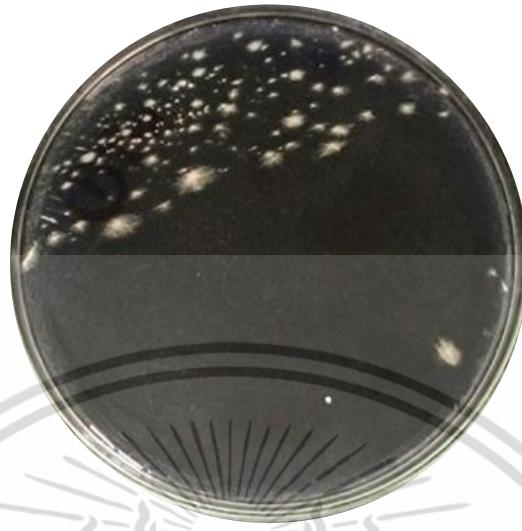


รูปที่ ฉ.40 ลักษณะโคโลนีของ FR FR 1.32
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก



รูปที่ ฉ.41 ลักษณะโคโลนีของ FR 2.12
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.42 ลักษณะโคโลนีของ FR 2.21
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ



รูปที่ ฉ.43 ลักษณะโคโลนีของ FR 2.23
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.44 ลักษณะโคโลนีของ FR 2.31
โคโลนีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบเรียบ



รูปที่ ฉ.45 ลักษณะโคโลนีของ FR 2.32
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

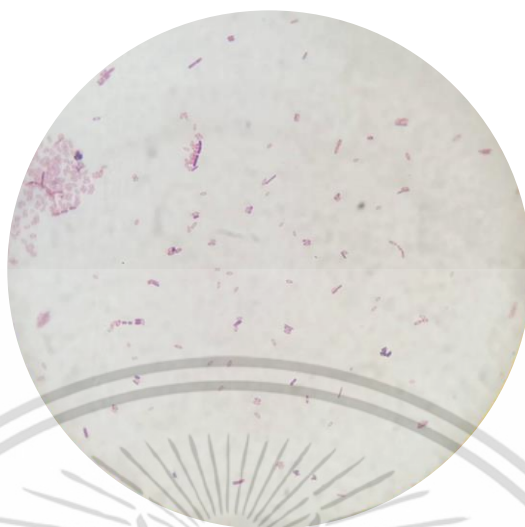
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๔.๔๖ การติดสีย้อมแกรมของเชอร์ทัส LG 2.21

รูปที่ ๔.๔๗ การติดสีย้อมแกรมของเชอร์ทัส LG 2.31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.48 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส LG 2.32



รูปที่ ฉ.49 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส LG 2.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.50 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส LG 2.34

รูปที่ ๑.51 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส CN 1.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๕.52 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์ทัส CN 1.13

รูปที่ ๕.53 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์ทัส CN 1.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.54 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส CN 1.22

รูปที่ ๑.55 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส CN 1.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๕.56 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์หัท MG 1.21

รูปที่ ๕.57 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์หัท MG 1.31

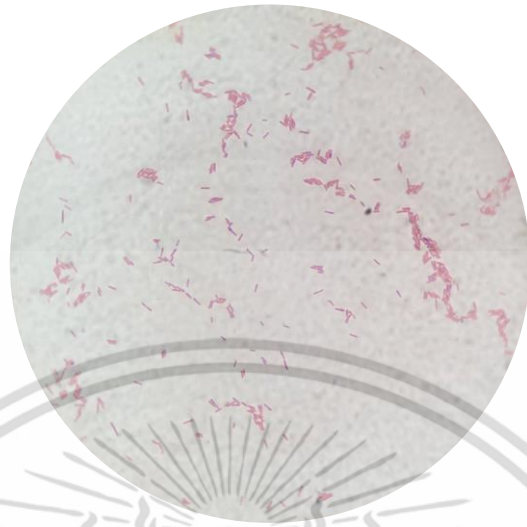
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๕.58 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์หัทส MG 1.32

รูปที่ ๕.59 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์หัทส MG 1.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.60 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส MG 2.11



รูปที่ ๑.61 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส MG 2.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.62 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์ทัส MG 2.21

รูปที่ ๑.63 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์ทัส MG 2.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.64 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์ทัส MG 2.23

รูปที่ ๑.65 การติดสีย้อมแกรมของเชอร์ทัส MA 2.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.66 การติดสีย้อมแกรมของเชีอรหัส MA 2.13

รูปที่ ๑.67 การติดสีย้อมแกรมของเชีอรหัส MA 2.14

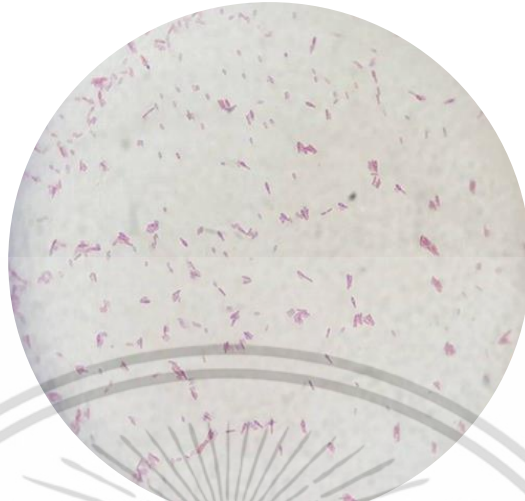
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.68 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรห้ส MA 2.22

รูปที่ ๑.69 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรห้ส MA 2.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ.70 การติดสีย้อมแกรมของเซอรหัส FR 1.32



รูปที่ ฉ.71 การติดสีย้อมแกรมของเซอรหัส FR 2.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๗.๗๒ การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส FR 2.21

รูปที่ ๗.๗๓ การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส FR 2.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๗.74 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส FR 2.31

รูปที่ ๗.75 การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส FR 2.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์
และการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตาราง ข.1 พื้นที่ใต้กราฟตัวทำละลายอินทรีย์ของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง HPLC

รหัสเชื้อ	จำนวนซ้ำ	พื้นที่ใต้กราฟ			
		กรดซิตริก	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
LG 2.21	1	3682043	23845	0	6509
	2	2426455	26511	0	6948
	3	3054249	25178	0	6728
LG 2.31	1	3544514	0	0	35306
	2	5251760	2658	0	34575
	3	4398137	1351	0	34940
LG 2.32	1	3534609	0	0	36842
	2	2746475	1202	0	26396
	3	3140542	572	0	31619
LG 2.33	1	3516923	0	0	29213
	2	2725917	0	0	22486
	3	3121420	0	0	35850
LG 2.34	1	3470804	0	0	36759
	2	3165118	1901	0	32554
	3	3317961	931	0	34656
CN 1.11	1	3444534	56976	0	6799
	2	2161372	56846	0	2761
	3	2802953	56911	0	4780
CN 1.13	1	3543092	12189	0	37415
	2	2351387	13035	0	24852
	3	2947239	12612	0	31133
CN 1.21	1	3585525	56590	0	6539
	2	2694364	64725	0	2755
	3	3139945	60658	0	4647

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.1 (ต่อ) พื้นที่ใต้กราฟตัวทำละลายอินทรีย์ของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง HPLC

รหัสเชื้อ	จำนวนซ้ำ	พื้นที่ใต้กราฟ			
		กรดซิตริก	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
CN 1.22	1	4829315	202924	30362	9725
	2	1993177	147400	22140	6553
	3	3411246	175162	26251	8139
CN 1.23	1	3297261	151140	15267	17184
	2	1989178	156065	16999	5429
	3	2643220	153602	16133	11306
MG 1.21	1	3286725	149060	16822	7074
	2	2004924	156696	19662	5953
	3	2645825	152878	18242	6513
MG 1.31	1	5425994	2555	0	6804
	2	2614763	0	0	3564
	3	4020378	1245	0	5184
MG 1.32	1	4457890	88677	5400	44953
	2	2518080	78396	4851	25065
	3	3487985	83537	5125	35009
MG 1.33	1	4571944	42423	0	36563
	2	2393160	35596	0	17362
	3	3482552	39009	0	26962
MG 2.11	1	4459907	42569	1877	44723
	2	2386013	35465	0	23588
	3	3422960	39017	927	34155
MG 2.12	1	4482076	93665	4065	45114
	2	2219134	75054	3329	23352
	3	3350605	84360	3697	34233
MG 2.21	1	3453943	32562	0	33059
	2	2727926	0	0	30622
	3	3090935	16281	0	31840
MG 2.22	1	3994848	96373	5023	45965
	2	2617198	35787	0	20034
	3	3306023	66080	2510	32999
MG 2.23	1	4259662	0	0	33788
	2	2508629	92792	5166	27817
	3	2143740	46396	2583	30802

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการดำเนินงานที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาเพื่อประโยชน์ของเกษตรกร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.1 (ต่อ) พื้นที่ใต้กราฟตัวทำละลายอินทรีย์ของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง HPLC

รหัสเชื้อ	จำนวนซ้ำ	พื้นที่ใต้กราฟ			
		กรดซิตริก	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
MA 2.11	1	4381979	2239	0	40725
	2	2343457	0	0	18419
	3	3362718	1910	0	29572
MA 2.13	1	4268377	0	0	27102
	2	2706350	1137	0	24626
	3	3487364	586	0	25864
MA 2.14	1	3574172	47894	1635	39183
	2	5173873	0	0	18520
	3	4373023	13947	811	28851
MA 2.22	1	3426690	83355	7095	48901
	2	2397459	46720	0	23231
	3	2912075	63037	3588	36066
MA 2.32	1	3406300	72970	4907	43693
	2	2445727	81411	7203	33024
	3	2926014	77190	6055	38358
FR 1.32	1	3700277	35109	0	38230
	2	2425231	76959	5476	32571
	3	3062754	56034	2738	35400
FR 2.12	1	3619223	25135	0	33111
	2	2536705	34710	0	24200
	3	3077964	29923	0	28655
FR 2.21	1	3316997	81730	4343	38202
	2	3241888	32475	0	23046
	3	3279443	57102	2171	30624
FR 2.23	1	3853705	20785	0	43693
	2	2762945	3633	0	22633
	3	3308325	10209	0	33163
FR 2.31	1	3507663	1593	0	33041
	2	2709247	19974	0	30612
	3	3108455	10783	0	31826
FR 2.32	1	3161326	84922	4987	19826
	2	2139710	86309	5061	15409
	3	2650518	85615	5024	17617

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในคณะกรรมาธิการเพื่อประโยชน์ในการดำเนินงาน

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ทางสถิติ

สารอินทรีย์	หมายเลขตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
ความเข้มข้นอะซีโตน	1	3	.294775	.0772589	.0446054
	2	3	.009348	.0087924	.0050763
	3	3	.007124	.0075810	.0043769
	4	3	.000000	.0000000	.0000000
	5	3	.010129	.0103628	.0059829
	6	3	.725814	.1697371	.0979978
	7	3	.152448	.0365104	.0210793
	8	3	.679580	.1425354	.0822929
	9	3	1.923217	.5662056	.3268990
	10	3	2.096630	.5681069	.3279967
	11	3	2.083777	.5710808	.3297137
	12	3	.008972	.0082521	.0047643
	13	3	.861785	.1962934	.1133300
	14	3	.406371	.0980279	.0565964
	15	3	.411576	.0930971	.0537496
	16	3	.918351	.2270159	.1310677
	17	3	.168906	.1629161	.0940596
	18	3	.664205	.1814807	.1047779
	19	3	.673927	.6408156	.3699751
	20	3	.012402	.0107851	.0062268
	21	3	.006760	.0072917	.0042098
	22	3	.190682	.2413756	.1393583
	23	3	.752406	.0835723	.0482505
	24	3	.932066	.2054852	.1186370
	25	3	.684094	.3862844	.2230214
	26	3	.348847	.1167735	.0674192
	27	3	.598496	.2521166	.1455596
	28	3	.112578	.0705235	.0407168
	29	3	.129835	.1196101	.0690569
	30	3	1.143687	.2337443	.1349523
Total		90	.566960	.6316271	.0665793

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.2 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ทางสถิติ

สารอินทรีย์	หมายเลข ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
ความเข้มข้นบิวทานอล	1	3	.000000	.0000000	.0000000
	2	3	.000000	.0000000	.0000000
	3	3	.000000	.0000000	.0000000
	4	3	.000000	.0000000	.0000000
	5	3	.000000	.0000000	.0000000
	6	3	.000000	.0000000	.0000000
	7	3	.000000	.0000000	.0000000
	8	3	.000000	.0000000	.0000000
	9	3	.245262	.0726947	.0419703
	10	3	.188460	.0579954	.0334837
	11	3	.213291	.0694182	.0400786
	12	3	.000000	.0000000	.0000000
	13	3	.045036	.0106205	.0061317
	14	3	.000000	.0000000	.0000000
	15	3	.006761	.0062551	.0036114
	16	3	.034315	.0088616	.0051162
	17	3	.000000	.0000000	.0000000
	18	3	.019713	.0185685	.0107205
	19	3	.031908	.0303403	.0175170
	20	3	.000000	.0000000	.0000000
	21	3	.000000	.0000000	.0000000
	22	3	.006284	.0067473	.0038956
	23	3	.032284	.0305418	.0176333
	24	3	.063099	.0221600	.0127941
	25	3	.030810	.0333457	.0192521
	26	3	.000000	.0000000	.0000000
	27	3	.019270	.0191986	.0110843
	28	3	.000000	.0000000	.0000000
	29	3	.000000	.0000000	.0000000
	30	3	.057070	.0116222	.0067101
Total		90	.033119	.0673551	.0070999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.2 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ทางสถิติ

สารอินทรีย์	หมายเลข ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
ความเข้มข้นเอทานอล	1	3	.093361	.0226102	.0130540
	2	3	.334543	.0696391	.0402062
	3	3	.411231	.0166902	.0096361
	4	3	.383067	.0759039	.0438232
	5	3	.427884	.0062660	.0036177
	6	3	.067713	.0143950	.0083110
	7	3	.432958	.0001882	.0001086
	8	3	.059101	.0164734	.0095109
	9	3	.105019	.0268474	.0155003
	10	3	.166916	.0513832	.0296661
	11	3	.103594	.0169032	.0097591
	12	3	.053366	.0022800	.0013164
	13	3	.410860	.0026961	.0015566
	14	3	.314127	.0154589	.0089252
	15	3	.408360	.0029501	.0017032
	16	3	.420839	.0095536	.0055158
	17	3	.424834	.0339715	.0196134
	18	3	.398119	.0794890	.0458930
	19	3	.456133	.1318987	.0761517
	20	3	.354475	.0298316	.0172233
	21	3	.312368	.0568186	.0328042
	22	3	.288796	.1521344	.0878349
	23	3	.496523	.0943557	.0544763
	24	3	.538786	.0139071	.0080293
	25	3	.482513	.0639492	.0369211
	26	3	.382491	.0080598	.0046533
	27	3	.382022	.0903344	.0521546
	28	3	.403738	.0647647	.0373919
	29	3	.422914	.0386187	.0222965
	30	3	.274856	.0191760	.0110713
Total		90	.327050	.1499097	.0158019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.2 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ทางสถิติ

สารอินทรีย์	หมายเลข ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
ความเข้มข้น ABE รวม	1	3	.388136	.0998691	.0576595
	2	3	.343891	.0608474	.0351302
	3	3	.418355	.0091133	.0052615
	4	3	.383067	.0759039	.0438232
	5	3	.438013	.0040979	.0023659
	6	3	.793527	.1553421	.0896868
	7	3	.585406	.0366985	.0211879
	8	3	.738681	.1260620	.0727819
	9	3	2.273499	.6657477	.3843696
	10	3	2.452006	.5747191	.3318142
	11	3	2.400662	.6574022	.3795513
	12	3	.062338	.0059726	.0034483
	13	3	1.317681	.2042178	.1179052
	14	3	.720499	.0825690	.0476713
	15	3	.826697	.0838922	.0484352
	16	3	1.373505	.2454310	.1416997
	17	3	.593740	.1289446	.0744462
	18	3	1.082037	.2795382	.1613914
	19	3	1.161969	.7545491	.4356391
	20	3	.366877	.0398494	.0230070
	21	3	.319128	.0641096	.0370137
	22	3	.485762	.3985541	.2301053
	23	3	1.281212	.2077847	.1199646
	24	3	1.533951	.2415523	.1394603
	25	3	1.197417	.4835793	.2791946
	26	3	.731337	.1248333	.0720725
	27	3	.999789	.3616496	.2087985
	28	3	.516316	.1347965	.0778248
	29	3	.552748	.1582288	.0913534
	30	3	1.475614	.2645425	.1527337
Total		90	.927129	.6674443	.0703548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.3 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล
ในรูปแบบตาราง ANOVA จากการวิเคราะห์ทางสถิติ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความเข้มข้น อะซิโตน	Between Groups	31.482	29	1.086	16.181	.000
	Within Groups	4.025	60	.067		
	Total	35.507	89			
ความเข้มข้น บิวทานอล	Between Groups	.368	29	.013	21.075	.000
	Within Groups	.036	60	.001		
	Total	.404	89			
ความเข้มข้น เอทานอล	Between Groups	1.809	29	.062	19.593	.000
	Within Groups	.191	60	.003		
	Total	2.000	89			
ความเข้มข้น ABE รวม	Between Groups	34.036	29	1.174	12.548	.000
	Within Groups	5.612	60	.094		
	Total	39.648	89			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.4 ความเข้มข้นของอะซิโตนเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan

ตัวอย่าง ที่	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
4	3	.000000							
21	3	.006760							
3	3	.007124							
12	3	.008972							
2	3	.009348							
5	3	.010129							
20	3	.012402							
28	3	.112578	.112578						
29	3	.129835	.129835						
7	3	.152448	.152448						
17	3	.168906	.168906						
22	3	.190682	.190682	.190682					
1	3	.294775	.294775	.294775	.294775				
26	3	.348847	.348847	.348847	.348847				
14	3	.406371	.406371	.406371	.406371	.406371			
15	3	.411576	.411576	.411576	.411576	.411576			
27	3		.598496	.598496	.598496	.598496	.598496		
18	3			.664205	.664205	.664205	.664205	.664205	
19	3			.673927	.673927	.673927	.673927	.673927	
8	3			.679580	.679580	.679580	.679580	.679580	
25	3			.684094	.684094	.684094	.684094	.684094	
6	3				.725814	.725814	.725814	.725814	
23	3				.752406	.752406	.752406	.752406	
13	3					.861785	.861785	.861785	
16	3						.918351	.918351	
24	3						.932066	.932066	
30	3							1.143687	
9	3								1.923217
11	3								2.083777
10	3								2.096630
Sig.		.116	.056	.052	.074	.074	.192	.060	.445

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.5 ความเข้มข้นของบิวทานอลเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan

ตัวอย่างที่	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	.000000			
2	3	.000000			
3	3	.000000			
4	3	.000000			
5	3	.000000			
6	3	.000000			
7	3	.000000			
8	3	.000000			
12	3	.000000			
14	3	.000000			
17	3	.000000			
20	3	.000000			
21	3	.000000			
26	3	.000000			
28	3	.000000			
29	3	.000000			
22	3	.006284			
15	3	.006761			
27	3	.019270	.019270		
18	3	.019713	.019713		
25	3	.030810	.030810		
19	3	.031908	.031908		
23	3	.032284	.032284		
16	3	.034315	.034315		
13	3	.045036	.045036		
30	3		.057070		
24	3		.063099		
10	3			.188460	
11	3			.213291	.213291
9	3				.245262
Sig.		.074	.067	.220	.116

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.6 ความเข้มข้นของเอทานอลเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan

ตัวอย่างที่	N	Subset for alpha = 0.05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
12	3	.053366												
8	3	.059101												
6	3	.067713	.067713											
1	3	.093361	.093361											
11	3	.103594	.103594											
9	3	.105019	.105019											
10	3		.166916											
30	3			.274856										
22	3			.288796	.288796									
21	3			.312368	.312368	.312368								
14	3			.314127	.314127	.314127	.314127							
2	3			.334543	.334543	.334543	.334543	.334543						
20	3			.354475	.354475	.354475	.354475	.354475	.354475					
27	3				.382022	.382022	.382022	.382022	.382022	.382022				
26	3				.382491	.382491	.382491	.382491	.382491	.382491	.382491			
4	3				.383067	.383067	.383067	.383067	.383067	.383067	.383067			
18	3					.398119	.398119	.398119	.398119	.398119	.398119	.398119		
28	3					.403738	.403738	.403738	.403738	.403738	.403738	.403738	.403738	

ตาราง ข.6 (ต่อ) ความเข้มข้นของเอทานอลเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan

ตัวอย่างที่	N	Subset for alpha = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
15	3					.408360	.408360	.408360	.408360	.408360	.408360	
13	3					.410860	.410860	.410860	.410860	.410860	.410860	
3	3					.411231	.411231	.411231	.411231	.411231	.411231	
16	3					.420839	.420839	.420839	.420839	.420839	.420839	
29	3					.422914	.422914	.422914	.422914	.422914	.422914	
17	3						.424834	.424834	.424834	.424834	.424834	
5	3							.427884	.427884	.427884	.427884	
7	3							.432958	.432958	.432958	.432958	
19	3								.456133	.456133	.456133	.456133
25	3									.482513	.482513	.482513
23	3										.496523	.496523
24	3											.538786
Sig.		.336	.058	.136	.084	.051	.051	.084	.074	.077	.081	.106

ตาราง ข.7 ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10									
12	3	.062338																		
21	3	.319128	.319128																	
2	3	.343891	.343891																	
20	3	.366877	.366877																	
4	3	.383067	.383067																	
1	3	.388136	.388136																	
3	3	.418355	.418355	.418355																
5	3	.438013	.438013	.438013																
22	3	.485762	.485762	.485762																
28	3	.516316	.516316	.516316	.516316															
29	3	.552748	.552748	.552748	.552748															
7	3	.585406	.585406	.585406	.585406	.585406														
17	3	.593740	.593740	.593740	.593740	.593740														
14	3		.720499	.720499	.720499	.720499	.720499	.720499												
26	3		.731337	.731337	.731337	.731337	.731337	.731337	.731337											
8	3		.738681	.738681	.738681	.738681	.738681	.738681	.738681	.738681										
6	3		.793527	.793527	.793527	.793527	.793527	.793527	.793527	.793527	.793527									
15	3		.826697	.826697	.826697	.826697	.826697	.826697	.826697	.826697	.826697	.826697								

ตาราง ข.7 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Duncan

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
27	3			.999789	.999789	.999789	.999789	.999789	.999789	.999789	.999789		
18	3				1.082037	1.082037	1.082037	1.082037	1.082037	1.082037	1.082037		
19	3					1.161969	1.161969	1.161969	1.161969	1.161969	1.161969		
25	3						1.197417	1.197417	1.197417	1.197417	1.197417		
23	3						1.281212	1.281212	1.281212	1.281212	1.281212		
13	3							1.317681	1.317681	1.317681	1.317681		
16	3								1.373505	1.373505	1.373505		
30	3											1.475614	
24	3											1.533951	
9	3												2.273499
11	3												2.400662
10	3												2.452006
Sig.		.083	.102	.057	.062	.055	.062	.051	.052	.074			.506

ภาคผนวก ซ

ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ

ตาราง ซ.1 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าจะน่าจะเป็น *Clostridium* spp.

รหัสของเชื้อ	ทดสอบการย่อยน้ำตาล			ทดสอบการสร้างแก๊ส	ทดสอบการเคลื่อนที่	Catalase test	Cytochrome oxidase test
	มอลโตส	ไซโลส	เซลโลไบโอส				
LG 2.21	-	-	-	-	+	-	-
LG 2.31	-	-	-	+	+	-	-
LG 2.32	-	-	-	+	+	-	-
LG 2.33	-	-	-	+	+	-	-
LG 2.34	-	-	-	+	+	-	-
CN 1.11	-	-	-	+	+	-	-
CN 1.13	-	-	-	+	+	-	+
CN 1.21	-	-	-	-	+	-	-
CN 1.22	+	+	+	+	+	+	+
CN 1.23	+	+	+	+	+	+	+
MG 1.21	+	+	+	+	+	+	+
MG 1.31	-	-	-	-	+	-	+
MG 1.32	+	+	-	+	+	+	-
MG 1.33	-	-	-	+	+	+	-
MG 2.11	+	-	-	+	+	+	+
MG 2.12	+	+	+	+	+	+	-
MG 2.21	-	+	-	+	+	+	-
MG 2.22	+	-	-	+	+	+	-
MG 2.23	+	+	+	+	+	+	-
MA 2.11	-	-	-	-	-	-	-
MA 2.13	-	-	-	-	-	-	-
MA 2.14	+	+	+	+	+	+	-
MA 2.22	+	+	-	+	+	+	-
MA 2.32	+	+	-	+	+	+	+
FR 1.32	+	+	+	+	+	-	+
FR 2.12	-	-	-	+	+	-	-
FR 2.21	+	+	-	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ซ.1 (ต่อ) การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าจะ เป็น *Clostridium* spp.

รหัสของเชื้อ	ทดสอบการย่อยน้ำตาล			ทดสอบการสร้างแก๊ส	ทดสอบการเคลื่อนที่	Catalase test	Cytochrome oxidase test
	มอลโตส	ไซโลส	เซลโลไบโอส				
FR 2.23	-	-	-	-	+	+	-
FR 2.31	-	-	-	+	+	+	+
FR 2.32	+	+	-	+	+	-	-



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้