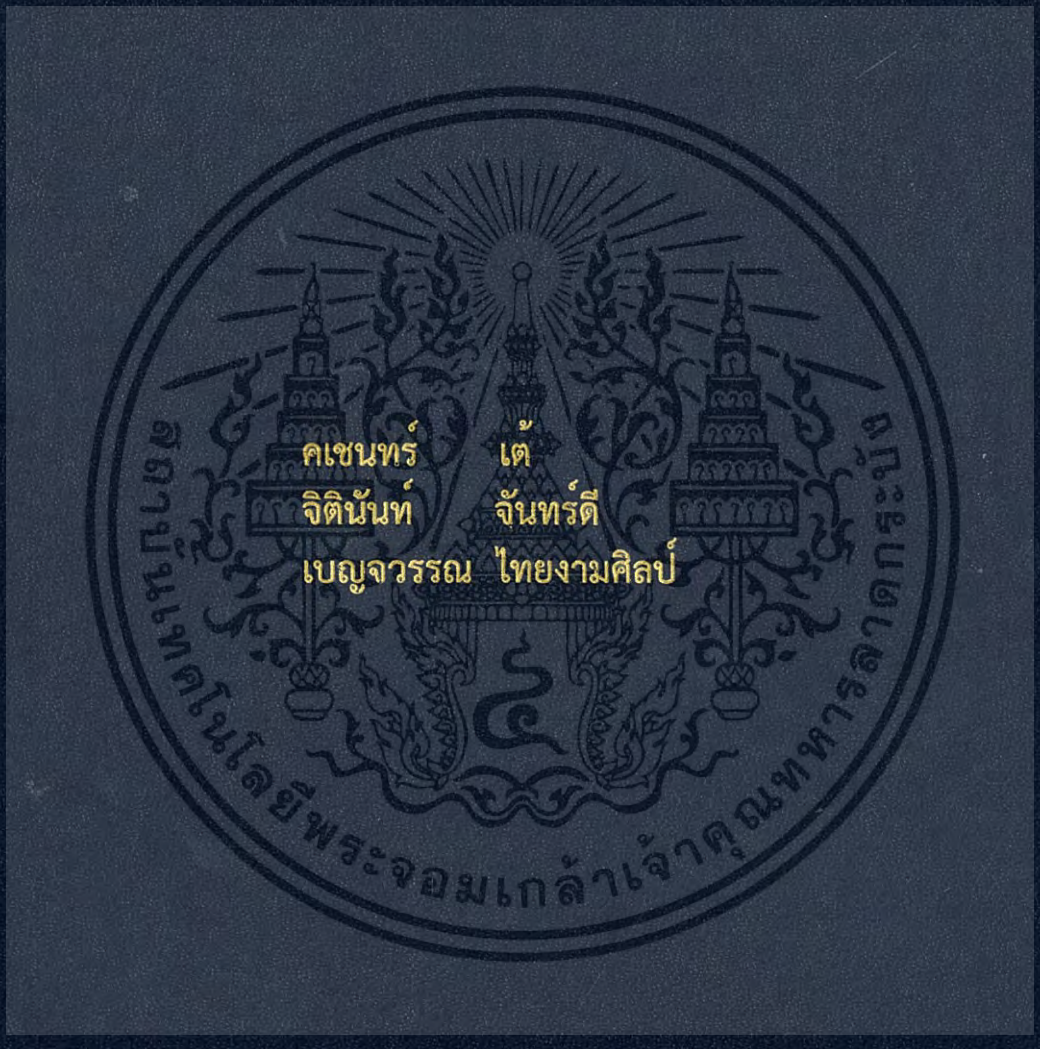
การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินและน้ำในบ่อบริเวณพื้นที่เขตลาดกระบัง เพื่อใช้ผลิตบิวทานอลชีวภาพ

ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM* SPP. FROM SOIL AND POND WATER OF LADKRABANG DISTRICT FOR BIOBUTANOL PRODUCTION



คเชนทร์ เต้
จิตินันท์ จันทร์ดี
เบญจวรรณ ไทยงามศิลป์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินและน้ำในบ่อบริเวณพื้นที่เขตลาดกระบัง เพื่อใช้ผลิตบิวทานอลชีวภาพ

ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM* SPP. FROM SOIL AND POND WATER OF LADKRABANG DISTRICT FOR BIOBUTANOL PRODUCTION

คเชนทร์ เต้

จิตินันท์ จันทร์ดี

เบญจวรรณ ไทยงามศิลป์

โครงงานพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM* SPP. FROM SOIL AND POND WATER OF LADKRABANG DISTRICT FOR BIOBUTANOL PRODUCTION

KHACHEN TEH

CHITINAN CHANDEE

BENJAWAN THAINGAMSIN

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 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินและน้ำในบ่อบริเวณพื้นที่เขตลาดกระบัง เพื่อใช้ผลิตบิวทานอลชีวภาพ Isolation of *Clostridium* spp. From Soil and Pond Water of Ladkrabang District for Biobutanol Production
ชื่อนักศึกษา	นายคเชนทร์ เต้ รหัสนักศึกษา 55051242 นางสาวจิตินันท์ จันทร์ดี รหัสนักศึกษา 55051249 นางสาวเบญจวรรณ ไทยงามศิลป์ รหัสนักศึกษา 55051322
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินและน้ำในบ่อบริเวณพื้นที่เขตลาดกระบัง เพื่อใช้ผลิตบิวทานอลชีวภาพ
ชื่อนักศึกษา	นายคเชนทร์ เต้ รหัสนักศึกษา 55051242
	นางสาวจิตินันท์ จันทร์ดี รหัสนักศึกษา 55051249
	นางสาวเบญจวรรณ ไทยงามศิลป์ รหัสนักศึกษา 55051322
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. จากแหล่งดินและน้ำในบ่อบริเวณพื้นที่เขตลาดกระบัง ที่มีคุณสมบัติในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE) โดยคัดแยกแบคทีเรียได้ 41 ไอโซเลท จากดิน 15 ตัวอย่าง จากน้ำ 11 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท จากดิน 6 ไอโซเลท ได้แก่ SA 1.1, SA 2.2, SB 1.1, SB 2.1, SB 2.2, SC 1.1 และจากน้ำ 5 ไอโซเลท ได้แก่ WF, WG, WH, WI และ WJ โดยทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ได้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งใช้เครื่องตรวจวัดแบบดัชนีหักเหแล้ว พบว่า SC 1.1 ผลิตปริมาณบิวทานอลมากที่สุด คือ 0.769 กรัม/ลิตร WI สร้างอะซิโตนความเข้มข้นมากที่สุด คือ 2.550 กรัม/ลิตร ในขณะที่ SB 1.1 ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 1.174 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นรวม ABE สูงสุดคือ WI เท่ากับ 3.202 กรัม/ลิตร ซึ่งมีบิวทานอล อะซิโตน และเอทานอล เท่ากับ 0.155 กรัม/ลิตร 2.550 กรัม/ลิตร และ 0.497 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ การเคลื่อนที่ การสร้างแก๊ส การหมักน้ำตาลมอลโทส เซลโลไบโอส และไซโลส พบว่า WI และ WJ มีคุณสมบัติดังกล่าวใกล้เคียงกับ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงมากที่สุด

คำสำคัญ : การคัดแยก คลอสตริเดียม บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of *Clostridium* spp. From Soil and Pond Water of Ladkrabang District for Biobutanol Production		
Students	Mr.Khachan	Teh	Student ID 55051242
	MissChitinan	Chandee	Student ID 55051249
	MissBenjawan	Thaingamsin	Student ID 55051322
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.		

Abstract

The objectives of this research were to isolate and characterize *Clostridium* spp. from the natural sources. Forty one isolates of microorganisms were isolated from soil and water in pond from Ladkrabang district, Bangkok, Thailand Eleven isolates (out of 41 isolates) showed the ability to produce acetone, butanol and ethanol (ABE) on T6 medium. Six isolates were obtained from soil samples, with their name code of SA 1.1, SA 2.2, SB 1.1, SB 2.1, SB 2.2 and SC 1.1. Five isolates were obtained from pond water samples, which their name code were WF, WG, WH, WI and WJ. All of these isolates were Gram-positive, rod-shaped and spore forming. The concentration of acetone, butanol and ethanol were determined by HPLC, equipped with a refractive index detector. The highest butanol, acetone and ethanol levels were produced by SC 1.1 (0.769 g/L), WI (2.550 g/L) and SB 1.1 (1.174 g/L), respectively. The highest ABE level was produced by WI (3.202 g/L) comprising butanol 0.155 g/L, acetone 2.550 g/L and ethanol 0.497 g/L. Biochemical test of *Clostridium* spp. was investigated for motility, gas producing, sugar utilizing (maltose, xylose and cellobiose). WI and WJ had similar result on biochemical test with *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 which used as a reference microorganism.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ดีเป็นอย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล และ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานและกรรมการ ซึ่งได้ช่วยชี้แนะเกี่ยวกับการจัดทำรูปเล่มของโครงงาน รวมถึงส่วนของเนื้อหาให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่ศักรินทร์ บุญล้ำ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC) และพี่บุษบา บัวเขียว ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำด้วยดีมาโดยตลอด ตลอดจนพี่นักวิทยาศาสตร์ประจำอาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้การยืมเครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ รวมถึงคำแนะนำตลอดการทดลอง จึงทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

อนึ่ง คณะผู้จัดทำหวังว่า โครงงานพิเศษฉบับนี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาอยู่ไม่มากก็น้อย จึงขอมอบส่วนดีอันเกิดจากโครงงานพิเศษเล่มนี้ ให้แก่เหล่าคณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง สำหรับข้อบกพร่องต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้น คณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ และยินดีรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาผลงานต่อไป

คเชนทร์ เต้
จิตินันท์ จันทร์ดี
เบญจวรรณ ไทยงามศิลป์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
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 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลว	3
2.1.4 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้	4
2.2 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE fermentation)	5
2.2.1 ประวัติและที่มา	5
2.2.2 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the Fermentation)	5
2.3 จุลินทรีย์ *Clostridium* spp.	8
2.3.1. อนุกรมวิธาน	8
2.3.1.1 *Clostridium acetobutylicum*	9
2.3.1.2 *Clostridium beijerinckii*	10
2.3.1.3 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*	11
2.4 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) จากแหล่งธรรมชาติ	12
2.4.1 อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน	12
2.4.1.1 Non selective media	12
2.4.1.2 Selective media	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน	12
2.4.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Pre-reduced media)	13
2.4.2.2 ตู้เพาะเลี้ยงแบบไร้ออกซิเจน	13
2.5 การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อ *Clostridium* spp.	13
2.5.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส (Gas produced test)	13
2.5.2 การทดสอบการหมักน้ำตาล (Sugar fermentation test)	14
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	17
3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี	17
3.1.1 อุปกรณ์	17
3.1.2 สารเคมี	17
3.2 การเก็บตัวอย่าง	18
3.3 การเตรียมอาหาร	18
3.4 การคัดแยกเชื้อ	18
3.5 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย	19
3.5.1 การย้อมสีแกรม (Gram staining)	19
3.5.2 การย้อมสีสปอร์ (Spore staining)	19
3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล	19
3.7 การทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี (Biochemical test)	20
3.7.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส	20
3.7.2 การทดสอบการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส	20
3.7.3 การทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโทส	20
3.7.4 การทดสอบการหมักน้ำตาลไซโลส	20
3.7.5 การทดสอบการเคลื่อนที่	20
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ	20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	21
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ	21
4.2 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ	23
4.3 ค่าความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้	28
4.4 การทดสอบทางชีวเคมี	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	39
ภาคผนวก ก	40
ภาคผนวก ข	41
ภาคผนวก ค	44
ภาคผนวก ง	46
ภาคผนวก จ	47
ภาคผนวก ฉ	48
ภาคผนวก ช	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล	4
2.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ต่างๆ	14
4.1 สถานที่การเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง	21
4.2 สถานที่การเก็บตัวอย่างน้ำในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง	22
4.3 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและน้ำในบ่อบริเวณพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	24
4.4 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมที่วิเคราะห์ได้จากเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp.	29
4.5 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp.	32
ช.1 พื้นที่ใต้กราฟตัวทำละลายอินทรีย์ของเชื้อแต่ละไอโซเลท	54
ช.2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	56
ช.3 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลในรูปแบบตาราง ANOVA	58
ช.4 (ก) ความเข้มข้นของอะซิโตนเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan	59
(ข) ความเข้มข้นของบิวทานอลเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan	59
(ค) ความเข้มข้นของเอทานอลเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan	60
(ง) ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล	3
2.2 (ก) กลไกของระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acetogenesis)	6
(ข) กลไกของระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenesis)	7
2.3 ลักษณะของเชื้อ *Clostridium* spp.	9
2.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Clostridium* spp. บนอาหาร Egg-yolk agar	9
2.5 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. acetobutylicum*	10
2.6 ลักษณะโคโลนี *C. acetobutylicum* ที่ปรากฏบนอาหาร RCM	10
2.7 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. beijerinckii*	11
2.8 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum*	11
4.1 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อที่คัดแยกได้จากดินและน้ำบริเวณเขตลาดกระบัง	30
ข.1 กราฟสารละลายมาตรฐานอะซิโตน	42
ข.2 กราฟสารละลายมาตรฐานบิวทานอล	42
ข.3 กราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอล	43
ง.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี Cross streak plate	46
ฉ.1 ลักษณะโคโลนีของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792	48
ฉ.2 ลักษณะโคโลนีของ SC 1.1	48
ฉ.3 ลักษณะโคโลนีของ WG	49
ฉ.4 ลักษณะโคโลนีของ WH	49
ฉ.5 ลักษณะโคโลนีของ WI	50
ฉ.6 ลักษณะโคโลนีของ WJ	50
ฉ.7 (ก) การติดสีย้อมแกรมของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792	
(ข) การติดสีย้อมแกรมของ *Clostridium acetobutylicum DSM 792*	51
ฉ.8 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส SC 1.1	
(ข) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส SC 1.1	51
ฉ.9 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WG	
(ข) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WG	52
ฉ.10 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WH	
(ข) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WH	52
ฉ.11 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WI	
(ข) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WI	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ฉ.12 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WJ	
(ข) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WJ	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและความต้องการใช้พลังงานจากถ่านหินและปิโตรเลียมเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เชื้อเพลิงธรรมชาติลดจำนวนลง การนำพลังงานทดแทนมาใช้จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ และสามารถตอบสนองความต้องการในการใช้พลังงานอย่างไม่สิ้นสุดของมนุษย์ได้ การนำเชื้อเพลิงเหลว เช่น ไบโอเอทานอลและไบโอบิวทานอล มาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ จึงเป็นทางออกสำหรับปัญหาเหล่านี้การผลิตพลังงานด้วยกระบวนการทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Clostridium* spp. ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (Anaerobic bacteria) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) มีลักษณะเป็นท่อน (Rod) และสามารถสร้างสปอร์ได้ พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น แหล่งดิน แหล่งน้ำ และของเสีย แหล่งคาร์บอนที่เชื้อ *Clostridium* spp. ใช้ในการเจริญเติบโต คือ ดินและน้ำที่มีการสะสมของตะกอนซากพืช ซากสัตว์และสารอินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก แบคทีเรียกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลส แป้งและน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะบิวทานอล นอกจากนี้ยังมีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายอื่น คือ อะซิโตนและเอทานอล เกิดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมกับบิวทานอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าและนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อีกด้วย (ชนิกา และคณะ, 2555) โดยกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล เรียกว่า Acetone—Butanol—Ethanol fermentation หรือ ABE fermentation

เมื่อการศึกษาแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน ไบโอบิวทานอลจึงมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงเหลว (Abd-Alla และคณะ, 2014) เนื่องจากบิวทานอลมีค่าออกเทนใกล้เคียงน้ำมัน ทำให้ผสมกับน้ำมันได้ดี มีค่าพลังงานและจุดเดือดที่สูง นอกจากนี้บิวทานอลยังสามารถขนส่งตามท่อส่งน้ำมันและไม่ส่งผลเสียต่อเครื่องยนต์ เพราะไม่ทำให้เกิดการกัดกร่อน (ชนิกา และคณะ, 2555) ดังนั้น จึงมีความต้องการในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยเลือกใช้แบคทีเรีย *Clostridium* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งทำการคัดแยกจากแหล่งดินและน้ำในบ่อที่มีการทับถมของตะกอนดินเป็นจำนวนมาก ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางให้เกิดความก้าวหน้าในการนำกระบวนการทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ โดยทดแทนเชื้อเพลิงธรรมชาติที่กำลังจะหมดไปและสามารถพัฒนาให้เกิดประโยชน์แก่อุตสาหกรรมอื่นๆ ต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อคัดแยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้ จากแหล่งดินและน้ำในบ่อบริเวณพื้นที่เขตลาดกระบัง
2) เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test) เบื้องต้นของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. ซึ่งคัดแยกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่างจากแหล่งดินและน้ำในบ่อบริเวณพื้นที่เขตลาดกระบัง นำมาทำการคัดแยกเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp. โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM) จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง T6 เพื่อคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว T6 ส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) และศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยการย้อมแกรมและสปอร์ พร้อมตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีการทดสอบการสร้างแก๊ส การเคลื่อนที่ การหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส น้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลไซโลส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถคัดแยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. ที่มีศักยภาพในการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล และเป็นแนวทางเพื่อนำไปต่อยอดในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ในอนาคต
2) ตอบสนองความต้องการในการใช้พลังงานของมนุษย์ เนื่องจากคุณสมบัติของเชื้อ *Clostridium* spp. สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่มีประโยชน์ อีกทั้งยังทดแทนการใช้เชื้อเพลิงจากถ่านหินและปิโตรเลียมได้
3) ลดการผลิตก๊าซเรือนกระจกและภาวะโลกร้อน เนื่องจากกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลจาก *Clostridium* spp. เป็นกระบวนการที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

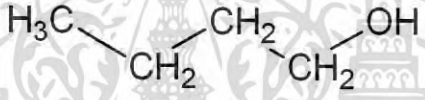
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บิวทานอล

2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

บิวทานอล (IUPAC Nomenclature, 1-butanol; CAS no. 71-36-3) เป็นที่รู้จักกัน คือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol) ชื่อทางการค้า คือ n-Butanol กรณีที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพจะเรียกว่า "ไบโอบิวทานอล" เป็นแอลกอฮอล์พื้นฐานที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4-คาร์บอนอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ (4-Carbon aliphatic alcohol) สายตรง ดังรูปที่ 2.1 มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น C_4H_9OH น้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล (ชนิกา และคณะ, 2555)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล
ที่มา : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1-butanol.png (10 พฤศจิกายน 2558)

2.1.2 คุณสมบัติทั่วไปของบิวทานอล

บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง มีขั้วอ่อนๆ ไม่มีสี ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีกลิ่นเฉพาะตัว ซึ่งคล้ายกลิ่นของกล้วยแต่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่ชัดเจน ไอระเหยของเอทานอลสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุโพรงจมูกได้ บิวทานอลสามารถละลายเข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ได้ดี แต่ละลายน้ำได้ค่อนข้างต่ำ มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ - 89.3 °C ในสภาวะปกติจะเป็นของเหลว ระเหยได้ง่าย และสามารถติดไฟได้ง่าย จึงสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ (ธีระนัย และคณะ, 2556)

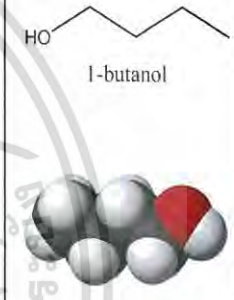
2.1.3 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลว

ไบโอบิวทานอล เป็นบิวทานอลที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นและกระบวนการทางชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์ได้ แม้ในปัจจุบันยังมีข้อกำจัดบางประการทำให้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่เป็นที่นิยมมากกว่า (Hansen และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี รวมถึงค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอล เนื่องจากบิวทานอลมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน (น้ำมันเบนซิน) มากกว่าเอทานอล นอกจากนี้บิวทานอลมีความเป็นขั้วต่ำกว่าจึงสามารถผสมกับแก๊สโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ ดังนั้นการใช้บิวทานอลจึงไม่จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์ มีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนแก๊สโซลีน พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องยนต์สามารถขับเคลื่อนได้ปกติ โดยที่มีการใช้บิวทานอลสูงกว่าแก๊สโซลีนร้อยละ 9 ถึงแม้ว่ารถยนต์ใช้บิวทานอลในปริมาณที่สูงกว่าแก๊สโซลีน แต่พบว่าการใช้ไบโอบิวทานอลมีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สไฮโดรเจน และสารพิษ NO_x ลดลงมาก ซึ่งเป็นเรื่องสำคัญอย่างมากต่อสิ่งแวดล้อมของโลก (Atsumi และคณะ, 2008)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล (ดัดแปลงจาก Devis และ Morton III, 2008 และ Lee และคณะ, 2008a)

คุณสมบัติ	บิวทานอล	โครงสร้างทางเคมี
จุดหลอมเหลว (°C)	-89.3	 1-butanol
ความถ่วงจำเพาะ	0.810-0.812	
อุณหภูมิที่ติดไฟ (°C)	35-37	
อุณหภูมิที่สามารถติดไฟได้เอง (°C)	343-345	
จุดวาบไฟ (°C)	25-29	
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (น้ำ: 1.0)	0.81	
ความดันวิกฤต (hPa)	48.4	
อุณหภูมิวิกฤต (°C)	287	
ขีดจำกัดของการระเบิด (vol. % ในอากาศ)	1.4-11.3	
ความสามารถในการละลายน้ำ (9.0 mL/100 mL)	7.7 g/100 mL ที่ 20 °C	
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (อากาศ: 1.0)	2.6	
ความดันไอ (kPa ที่ 20°C)	0.58	

2.1.4 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้

นอกเหนือจากการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย โดยอนุพันธ์ของบิวทานอลส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Butyl acrylate และ Methacrylate esters ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว สารยึดเกาะ วัสดุสิ่งทอ วัสดุเส้นใย และพลาสติก เป็นต้น อนุพันธ์ของบิวทานอลชนิดอื่นๆ ที่สำคัญ ได้แก่ Butyl glycol ether, Butyl acetate และ Plasticizer เป็นต้น ทั้งนี้บิวทานอล และสารอนุพันธ์สามารถใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีเยี่ยมในอุตสาหกรรมสีทำ อุตสาหกรรมยานยนต์ และอุตสาหกรรมการขึ้นรูป รวมทั้งใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฮอร์โมนได้อีกด้วย นอกเหนือจากที่ได้กล่าวไปแล้ว บิวทานอลยังถูกใช้ในอุตสาหกรรม อื่นๆ อีก เช่นอุตสาหกรรมการผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด รวมไปถึง สามารถใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมกลิ่นรสได้อีกด้วย (Lee และคณะ, 2008; Durre, 2008b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

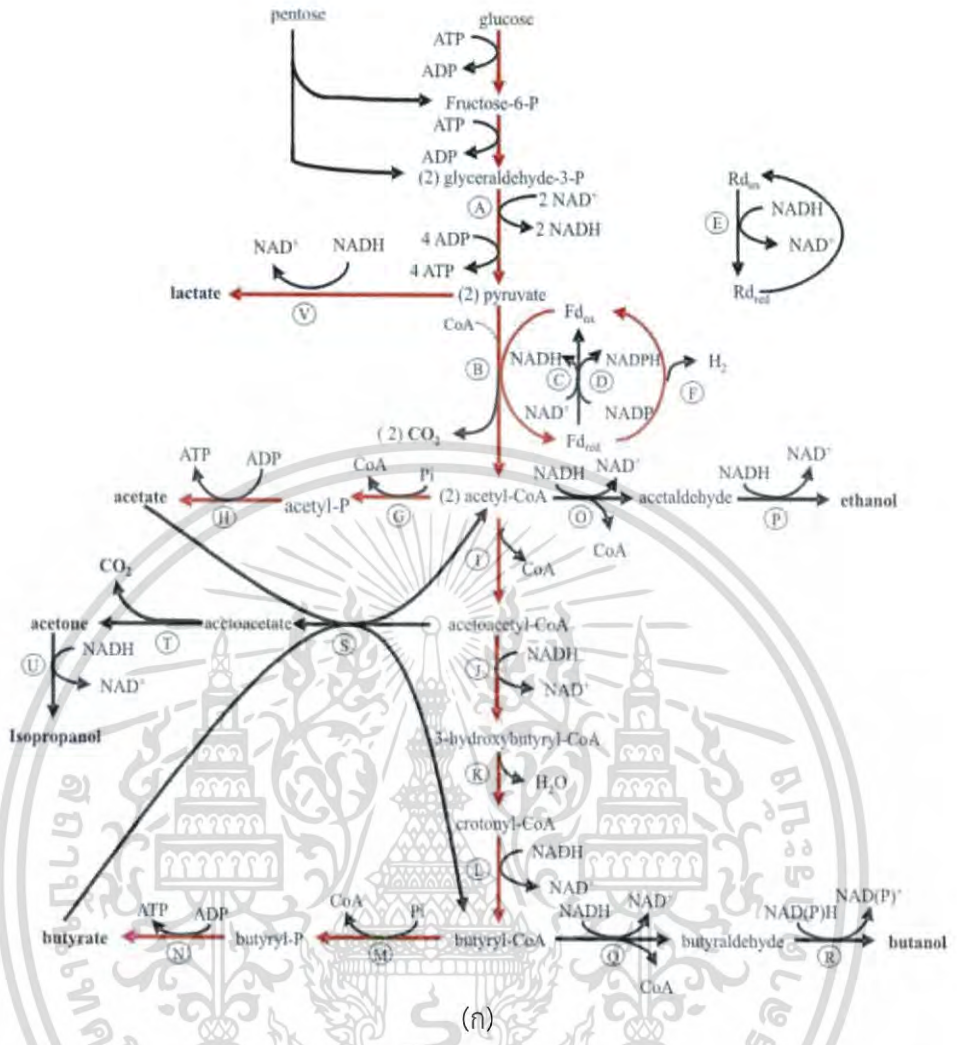
2.2.1 ประวัติและที่มา

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 ซึ่งบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบีตาไดอีน เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตยางสังเคราะห์ แต่ในยุคนั้นความสามารถในการผลิตบิวทานอลยังอยู่ในปริมาณที่กำจัด เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ภายหลังจากสงครามโลกยุติลงความต้องการอะซิโตนจึงลดน้อยลง แต่กลับมาให้ความสนใจอีกครั้งในปี ค.ศ.1979 เนื่องจากราคาน้ำมันดิบของโลกเริ่มมีราคาสูงขึ้น ทำให้เกิดการค้นคว้าและพัฒนาเกี่ยวกับเชื้อเพลิงชีวภาพเป็นพลังงานทดแทน เช่น ไบโอบิวทานอล และไบโอเอทานอล แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักดังกล่าวยังมีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการบวนการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Jones และ Woods, 1986)

2.2.2 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the Fermentation)

กระบวนการหมักของแบคทีเรีย *Clostridium* spp. สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenesis phase) และระยะสร้างตัวทำละลายสารอินทรีย์ (Solvetogenesis phase) วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมถึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจนอีกด้วย โดยขั้นแรกน้ำตาลกลูโคสจะถูกดึงเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhoff pathway (EMP) เปลี่ยนให้เป็นไพรูเวท โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะสามารถเปลี่ยนไพรูเวทได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ $NADH^+$ H^+ จำนวน 2 โมเลกุล ส่วนน้ำตาลเพนโทส (Pentose, C 5) ถูกเมทาบอไลซ์ (metabolized) ด้วยวิถีเพนโตสฟอสเฟส (Pentose phosphate pathway) เกิดการสร้าง Fructose-6-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนเข้าสู่วิถี EMP ไพรูเวทที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิทิลโคเอ (Acetyl-CoA) คาร์บอนไดออกไซด์ และรีดิวซ์เฟอริดอกซิน (Reduce feredoxin) โดยเอนไซม์ Pyruvate ferredoxinoxidoreductase) โดยมีโคเอนไซม์เอ (Coenzyme A) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งอะซิทิลโคเอที่เกิดขึ้นจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก โดยอะซิทิลโคเอ 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตอะซิทิลโคเอ (Acetoacetyl-CoA) เพื่อการสร้างกรดบิวทิริก ค่า pH ของการหมักในช่วงนี้จะลดลง นอกจากนี้ยังใช้เพื่อการสร้างอะซิเตท ซึ่งอะซิเตทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตน และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ Acetoacetate decarboxylase โดยปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาผันกลับไม่ได้ (Jones และ Woods, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



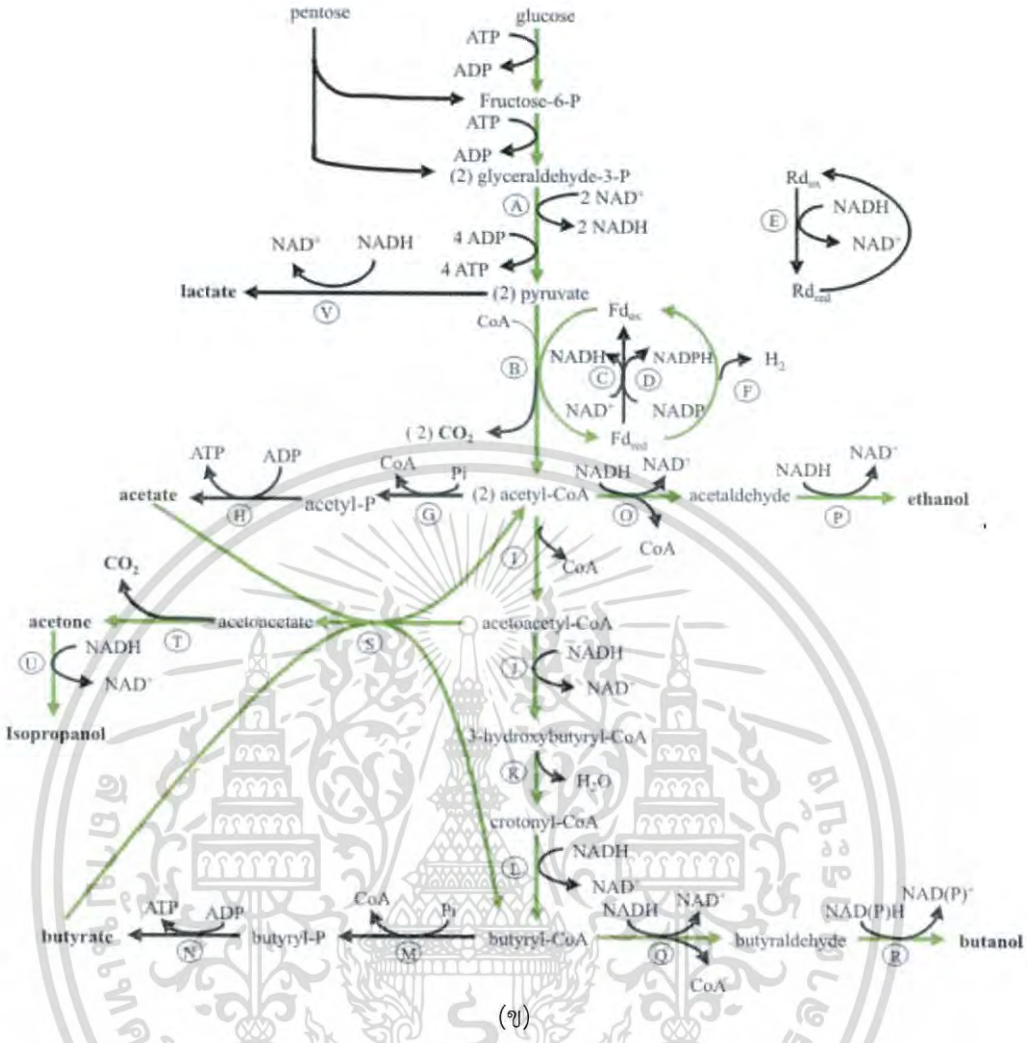
(ก)

รูปที่ 2.2 (ก) กลไกของระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acetogenesis) ลูกศรสีแดงแสดงทิศทางการสร้างกรด (ข) กลไกของระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenesis)

ที่มา : http://www.intechopen.com/book/liquid-gaseous-and-biofuels-conversion-technіniques/biobutanol-from-renewable-agricultural-and-lignocellulose-resources-and-its-perspectives-as-alternat (20 พฤศจิกายน 2558)

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) butylraldehyde dehydrogenase, (R) butanol dehydrogenase, (S) acetoacetyl-CoA, (T) acetoacetate decarboxylase, (U) phosphoglucomutase, (V) ADP-glucase pyrophosphorylase, (W) granulose synthase, (X) granulose phosphorylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ 2.2 (ต่อ) (ก) กลไกของระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acetogenesis) (ข) กลไกของระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenesis) ลูกศรสีเขียวแสดงทิศทางการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์

ที่มา : http://www.intechopen.com/book/liquid-gaseous-and-biofuels-conversion-technіniques/biobutanol-from-renewable-agricultural-and-lignocellulose-resources-and-its-perspectives-as-alternat (20 พฤศจิกายน 2558)

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) butylraldehyde dehydrogenase, (R) butanol dehydrogenase, (S) acetoacetyl-CoA, (T) acetoacetate decarboxylase, (U) phosphoglucomutase, (V) ADP-glucase pyrophosphorylase, (W) granulose synthase, (X) granulose phosphorylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนเพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ และช่วยกำจัดปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD^+ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยนบิวทิเรท (Butyrate) กลับไปเป็นบิวทิริลโคเอ (Butyryl-CoA) แล้วบิวทิริลโคเอ จะลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าในกระบวนการหมักสามารถผลิตบิวทานอลได้มากกว่าเอทานอลอย่างมาก ซึ่งเอทานอลสร้างจากอะซิโตอะซิทิลโคเอ (Acetoacetyl-CoA) โดยผ่าน 2 ปฏิกิริยาเริ่มจากอะซิโตอะซิทิลโคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) โดยเอนไซม์อะซิทัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Acetaldehyde dehydrogenase) ก่อนที่จะเปลี่ยนอะซิทัลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์เอทานอลดีไฮโดรจีเนส (Ethanol dehydrogenase) พร้อมกับการใช้ $NADH^+$ H^+ 2 โมเลกุล เพื่อสร้าง NAD^+ ด้วย (Jones และ Woods, 1986)

2.3 จุลินทรีย์ *Clostridium* spp.

2.3.1. อนุกรมวิธาน

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

Clostridium spp. เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia รูปร่างแท่ง ดังรูปที่ 2.3 แกรมบวก มีทั้งสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้และไม่ได้ เมื่อเคลื่อนที่โดยปกติเซลล์จะอาศัยแฟลกเจลลาที่ยื่นออกมารอบๆ เซลล์ (Peritrichous flagella) ในการเคลื่อนที่ สามารถสร้างสปอร์ได้ ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (Oval) หรือรูปทรงกลม (Spherical) การทนความร้อนของสปอร์แบคทีเรีย (Bacterial spore) ค่อนข้างสูงเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน จัดเป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic) เจริญเติบโตและผลิตสารอินทรีย์ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส ค่า pH ประมาณ 5.6 ถึง 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. saccharoperbutylacetonicum* และ *C. beijerinckii* เป็นต้น (ธีระนัย และคณะ, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 ลักษณะของเชื้อ *Clostridium* spp.
ที่มา : http://jb.asm.org/content/193/10/2429/F6.expansion.html (29 พฤศจิกายน 2558)

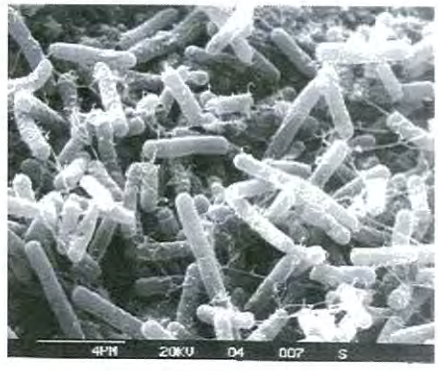
รูปที่ 2.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Clostridium* spp. บนอาหาร Egg-yolk agar
ที่มา : http://www.scientificcomputing.com/new/2015/bacteria-colony-clostridium-sp (29พฤศจิกายน 2558)

2.3.1.1 *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งตรง สามารถเคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาที่ยื่นออกมารอบเซลล์ เซลล์มีขนาดประมาณ 0.5 ถึง 0.9 x 1.6 ถึง 6.4 ไมโครเมตร เซลล์บวมเล็กน้อย สปอร์รูปไข่ และอยู่เกือบปลายค่อนไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (Subterminal spore) ดังรูปที่ 2.4 โคโลนีบนจานอาหาร RCM มีลักษณะแบนเรียบเกือบนูน ขอบหยัก ขนาด 1 ถึง 5 มิลลิเมตร เป็นเม็ดเล็ก โปร่งแสงจนถึงกึ่งทึบแสง ดังรูปที่ 2.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 37 องศาเซลเซียส

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. acetobutylicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : http://bacmap.wishartlab.com/organisms/26 (11 ธันวาคม 2258)

รูปที่ 2.6 ลักษณะโคโลนี *C. acetobutylicum* ที่ปรากฏบนอาหาร RCM
ที่มา : http://aem.asm.org/content/55/4/970.full.pdf (19 ธันวาคม 2558)

2.3.1.2 *Clostridium beijerinckii*

Clostridium beijerinckii เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งตรงส่วนปลายโค้งมน ดังรูปที่ 2.6 สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ขนาดประมาณ 0.5 ถึง 1.7 x 1.7 ถึง 8.0 ไมโครเมตร คัดแยกได้จากอุจจาระ และดิน สปอร์รูปไข่ โคโลนีบนจานอาหาร Blood agar ขนาด 1 ถึง 5 มิลลิเมตร ลักษณะกลม โปร่งแสง สีเทาเป็นมันเงา เรียบ อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อ คือ 37 องศาเซลเซียส

สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กรดบิวทิริก กรดอะซิติก กรดซักซินิก กรดแลคติก และกรดฟอร์มิก กรดโพพิโอนิกเล็กน้อยจนเกือบไม่พบ อะซิโตน บิวทานอล แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจน (Donker, 1926)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.7 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. beijerinckii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : http://genome.jgi.doe.gov/clobe/clobe.home.html (11 ธันวาคม 2258)

2.3.1.3 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

Clostridium saccharoperbutylacetonicum รูปร่างเป็นแท่งตรง ดังรูปที่ 2.7 ขนาดประมาณ 0.4-0.8 ไมโครเมตร โคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง *Clostridium* basal (CBM agar) มีลักษณะกลม ผิวเรียบ ขอบเป็นคลื่น เส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมดประมาณ 2 ถึง 3 มิลลิเมตร

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

รูปที่ 2.8 รูปร่างและลักษณะของเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : http://www.swbpc.usu.edu/htm/current-research-and-projects/aceton-butanol-and-ethanol-abe-production-from-algal-biomass (30 ธันวาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) จากแหล่งธรรมชาติ

2.4.1 อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน (Acharya, 2013)

อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะต้องมีส่วนประกอบของตัวสารดิวซ์ เช่น ซีสเทอีน เพื่อช่วยลดปริมาณออกซิเจน โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อจะแบ่งได้ 2 แบบ ได้แก่ Non selective media และ Selective media

2.4.1.1 Non selective media

มีดังนี้ Blood agar ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนและแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน, Egg-yolk agar (EYA) ที่สามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์เลซิทิเนส และไลเปส, Cooked meat broth และ Peptone-yeast extract glucose broth (PYG)

2.4.1.2 Selective media

มีดังนี้ Bacterioides bile esculin agar (BBE) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกแบคทีเรีย *Bacteriodes fragilis* นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการคาดการณ์ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนได้, Laked kanamycin-vancomycin blood agar (LVK) สามารถคัดแยก *Prevotella* และ *Bacteriodes* spp. ได้, Phenylethyl alcohol agar (PEA) ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน, Reinforced Clostridial Medium (RCM) คัดเลือกเชื้อ *Clostridium* spp. และแบคทีเรียชนิดที่เจริญได้ในสภาวะที่ ไม่มีออกซิเจน

2.4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน

เนื่องจากออกซิเจนมีผลกระทบต่อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ การเพาะเลี้ยงเชื้อจึงจำเป็นต้องมีการกำจัดออกซิเจนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำได้โดยการเลือกใช้ขวดหรือหลอดเพาะเชื้อที่มีฝาปิดแน่นสนิท แม้มีปริมาณออกซิเจนเพียงเล็กน้อยก็อาจส่งผลเสียต่อเซลล์ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังเติมสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์เพื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนให้กลายเป็นน้ำ อินดิเคเตอร์ที่ใช้ชี้วัดการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ คือ รีซาซูริน เพื่อบ่งชี้ปริมาณออกซิเจนที่แทรกซึมเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ในการกำจัดออกซิเจนออกจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถนำหลอดหรือจานเลี้ยงเชื้อบ่มไว้ในภาชนะที่ปราศจากออกซิเจน แบคทีเรียจำพวกที่สร้างมีเทน (Methanogenic bacteria) จะถูกทำลายด้วยออกซิเจนได้โดยง่ายแม้ว่าสัมผัสภายในระยะเวลาสั้นๆ กระบวนการทั้งหมดจึงจำเป็นต้องดำเนินไปภายใต้ Anaerobic chamber ที่มีการเติมแก๊สไนโตรเจนเข้าสู่ด้านในเพื่อไล่อากาศ จึงทำให้สภาพแวดล้อมบริเวณนั้นปราศจากออกซิเจน แบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้จะต้องเลือกปฏิบัติตามวิธีการดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Pre-reduced media)

เป็นการทำให้อาหารอยู่ในสภาวะรีดิวซ์ จะต้องต้มอาหารประมาณ 2 ถึง 3 นาทีเพื่อไล่ออกซิเจนออกไป แล้วเติมตัวรีดิวซ์ เช่น ซีสเทอีน ซึ่งช่วยลดปริมาณออกซิเจนได้ หลังจากนั้นพ่นฟองแก๊สไนโตรเจนที่ผ่านเข้าสู่อาหารเพื่อไล่ออกซิเจนออกจนหมด จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงสู่หลอดทดลองโดยอาศัยแรงดันจากแก๊สไนโตรเจน ปิดให้แน่นด้วยฝาเกลียว แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และทำให้อุณภูมิเย็นลง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ป้องกันอย่าให้โดนแสงแดดเพื่อไม่ให้รีซาซูลินเกิดการเปลี่ยนสี อาหารเลี้ยงเชื้อจะนำมาใช้งานได้เมื่อเกิดการออกซิไดส์หรืออาหารเปลี่ยนไปเป็นสีชมพู

2.4.2.2 ตู้เพาะเลี้ยงแบบไร้ออกซิเจน (Acharya, 2010)

อุปกรณ์หลักๆ ที่ใช้ คือ ตู้เพาะเลี้ยงแบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber) ที่สามารถบรรจุแก๊สไฮโดรเจน, คาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจน กระบวนต่างๆ กระทำใน Chamber ที่มีระบบป้องกันอากาศ (Air lock) ไฮโดรเจนจะเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนให้กลายเป็นน้ำอย่างช้าๆ โดยใช้แพลเลเดียมเร่งปฏิกิริยา ภายหลังจากการกำจัดออกซิเจนแล้ว จะถ่ายเชื้อลงสู่อาหารแล้วจึงนำไปบ่ม

แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนแต่สามารถทนต่อการสัมผัสอากาศได้จะเพาะเลี้ยงภายในโถเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) จากนั้นปิดตู้ให้สนิท เมื่อมีตัวเร่งปฏิกิริยา ออกซิเจนที่หลงเหลืออยู่ภายในสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนได้ ทำให้ออกซิเจนลดปริมาณลงจนหมด

2.5 การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อ *Clostridium* spp.

2.5.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส (Gas produced test)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากกระบวนการหมักของเชื้อ *Clostridium* spp. สายพันธุ์ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล นอกจากนี้ยังได้แก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้อีกด้วย ซึ่งแก๊สไฮโดรเจนมีคุณสมบัติในการติดไฟ สามารถทดสอบได้โดยนำหลอดทดลองที่เชื้อแบคทีเรียเปิดฝาวางใกล้เปลวไฟ สังเกตการติดไฟ (สุธาทิพย์ และนฤมล, 2554) หรือทดสอบการสร้างแก๊สผสมด้วยการใช้หลอดดักแก๊ส (Durham tube) ซึ่งเป็นหลอดทดลองขนาดเล็กประมาณ 5x50 มิลลิเมตร ใช้คว่ำลงในหลอดทดลองขนาดปกติที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ แก๊สที่เกิดจะลอยตัวขึ้นจึงทำให้มีแก๊สจำนวนหนึ่งเข้าไปแทนที่ของเหลวภายในหลอดดักแก๊ส (หลักปฏิบัติการชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 การทดสอบการหมักน้ำตาล (Sugar fermentation test)

ตารางที่ 2.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

คุณสมบัติ	*C. saccharoperbutylacetonicum*	*C. beijerinckii*	*C. acetobutylicum*	*C. saccharobutylicum*	*C. aurantibutyricum*	*C. pasteurianum*	*C. roseum*	*C. tetanomorphum*
การเคลื่อนที่	+	+	±	+	+	-/+	-/+	
การผลิตแก๊สไฮโดรเจน	4	4	4	+	4	4	4	+
การสร้างอินโดล	-	-	+	-	-	-	-	+/-
การสร้างเอนไซม์เลซิติเนส	NT	-	-	NT	-	-	-	-
การสร้างเอนไซม์ไลเปส	NT	-	-	NT	+	-	-	NT
การย่อยเอสคูลิน	+	+	+	+	+	-	+	NT
การย่อยแป้ง	NT	±	+	+	+	-	-	NT
การสร้างสารผลิตภัณฑ์								
อะราบิโนส	+	±	d	+	w	w	+	-
เซลโลไบโอส	+	+	+	+	+	-	+	+
กาแลกโตส	NT	+	+	NT	w	w-	+	-
ไกลโคลเจน	-	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. จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ซึ่งทดสอบด้วยวิธีต่างๆ แสดงให้เห็นดังตารางที่ 2.1

สามารถเขียนสมการของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ดังนี้

$$\text{Glucose} \xrightarrow{\text{EMP}} \text{aldehyde+organic acid+alcohol+}CO_2\text{+}H_2\text{+energy}$$

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

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Montoya และคณะ (2000) ศึกษาแบคทีเรียกว่า 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 คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CMC) ไซแลน กรดพอลีกาแลกทูโรนิก อินนูลิน และไคโตซาน สายพันธุ์ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงมีประโยชน์ต่อกระบวนการหมักชีวมวลโดยตรง จากการศึกษาลักษณะทางสรีระของเชื้อ พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ จำแนกให้อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* และ *Clostridium saccharobutylicum* NCP 262

Berezina และคณะ (2009) ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตตัวทำละลายจากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส โดยเชื้อเหล่านี้ผลิตอะซิโตนและบิวทานอล โดยปริมาณบิวทานอลคิดเป็นร้อยละ 80 ของตัวทำละลายทั้งหมด การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของ 16s rDNA พบว่าร้อยละ 99 มีความใกล้เคียงกับ *Clostridium saccharobutylicum* ในระยะสุดท้ายของการผลิตตัวทำละลายยีนที่เกี่ยวข้องจะเกิดการแสดงออกและมีการเข้ารหัสของยีน 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

เอกสารนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อการศึกษาเท่านั้น ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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 แลกโตส เซลโลไบโอส แมนนิทอล มอลโตส กาแลกโตส, ซูโครส และแมนโนส โดยการคัดแยกจะใช้พอลีแซกคาไรด์ เช่น แป้งและคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CMC) เป็นสารตั้งต้น ความสามารถของสายพันธุ์ YM1 ในการผลิตไบโอบิวทานอลจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรยังใช้ประเมินคุณภาพของรำข้าว น้ำทิ้งจากการผลิตปาล์มน้ำมันและกากเนื้อผลปาล์มในกระบวนการหมัก อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร จะทำให้เชื้อสามารถผลิตไบโอบิวทานอลความเข้มข้นสูงสุดถึง 7.27 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นของอะซิโตนบิวทานอล เอทานอล (ABE) ทั้งหมดเท่ากับ 10.23 กรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

บีกเกอร์	หลอดดักแก๊ส
ปิเปตต์, ไมโครปิเปตต์	แท่งแก้ว
จุกยาง	ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ	ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
หลอดทดลองฝาเกลียว	ตะเกียงแอลกอฮอล์
ที่วางหลอดทดลอง (Rack)	เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
ขวด Duran	ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ
ขวด Listerine	ถุงซิป
ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)	เครื่องเก็บตัวอย่างน้ำแบบ Horizontal
เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)	ภาชนะเลี้ยงจุลินทรีย์สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)
จอบ และเสียม	แผ่นดูดซับออกซิเจน
ช้อนตักสาร	โถดูดความชื้น (Desiccator)
กระดาษวัด pH	เครื่องเขย่าความเร็วสูง (Vortex)
กระบอกตวง	เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
หลอดปั่นเหวี่ยง	ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อแบบปลอดออกซิเจน (Anaerobic chamber)
ตัวกรองขนาด 0.2 µm	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.1.2 สารเคมี

ทริปโตน (Tryptone)	สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)
กลูโคส (Glucose)	โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH)	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)
วุ้น (Agar)	ไอร์รอน(II)ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 . 7H_2O$)
สารละลายอะซิโตน	สารละลายกรดซัลฟูริก 0.005 โมลาร์
สารละลายบิวทานอล	สารละลายกรดซิตริก ร้อยละ 2
สารละลายเอทานอล	น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
สารละลายเมทานอล	อาหารสำเร็จรูป Reinforced Clostridial Medium (RCM)
น้ำตาลเซลโลไบโอส	อาหารสำเร็จรูป Nutrient broth
น้ำตาลมอลโทส (maltose)	ทริปโตส (Tryptose)
น้ำตาลไซโลส (Xylose)	อาหาร YM agar
เปปโตน (Peptone)	สารละลายไอโอดีน
พาราฟิน ออยล์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจากแหล่งดิน ขุดดินให้ลึกจากผิวหน้าดินลงไปประมาณ 0.5 ถึง 1 เมตร เก็บใส่ถุงซิปไล่อากาศออกจนหมด เก็บในโถดูดความชื้น (Desiccator) ไม่เกิน 1 วัน สำหรับคัดแยกต่อไป

การเก็บตัวอย่างน้ำจากก้นบ่อ โดยเลือกบ่อน้ำที่มีการเจริญเติบโตของต้นพืช สาหร่าย และสิ่งมีชีวิตเป็นจำนวนน้อย แต่มีตะกอนดินทับถมเป็นจำนวนมากใส่ขวดฝาเกลียว สำหรับใช้ในการคัดแยกเชื้อ

3.3 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM) (ซึ่งรายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก) ละลายอาหารสำเร็จรูป RCM ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนจนอาหารละลายจนหมด ปรับ pH ของอาหารด้วย NaOH ให้มีค่าประมาณ 6.8 ± 0.2 ใส่ในหลอดอาหารที่มีฝาเกลียวปิดมิดชิด ปริมาตร 9 และ10 มิลลิลิตรเพื่อใช้ในการคัดแยก จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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

3.4 การคัดแยกเชื้อ

ตักตัวอย่างดินปริมาณ 1 กรัม ลงหลอดอาหาร RCM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตต์พาราฟินออยล์ปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตรทับลงผิวหน้าหลอดอาหารเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันในสภาวะไร้ออกซิเจน หลังจากนั้นปิเปตต์เชื้อจากหลอด 10 มิลลิลิตรลงในอาหาร RCM ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตต์พาราฟินออยล์ 1 มิลลิลิตรทับลงในหลอดอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันเช่นเดียวกัน นำไปตรวจสอบการติดสีและการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียดังหัวข้อที่ 3.5.1 และ 3.5.2

ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงหลอดอาหาร RCM 9 มิลลิลิตร ทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตต์พาราฟินออยล์ 1 มิลลิลิตรทับลงในหลอดอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันเช่นเดียวกันกับ นำไปตรวจสอบการติดสีและการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียดังหัวข้อที่ 3.5.1 และ 3.5.2 เช่นเดียวกันกับตัวอย่างดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกมาเพาะเลี้ยงลงในจานอาหาร T6 agar โดยการ Cross streak บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน ในสภาวะไร้ออกซิเจน ให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นทำการ Re-streak plate จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย ตามหัวข้อ 3.5 สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ให้ถ่ายเชื้อ 1 ลูป ใส่ลงในหลอดอาหารเหลว T6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบการสร้างสารผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะบิวทานอล โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังหัวข้อ 3.6

3.5 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อจากหลอดอาหาร RCM 9 มิลลิลิตร ทำการย้อมสีแกรม (Gram staining) และย้อมสีสปอร์ (Spore staining) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.5.1 การย้อมสีแกรม (Gram staining) (Gram, 1884)

ทำความสะอาดสไลด์ให้ปราศจากไขมัน ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารแตะลงบนสไลด์และเกลี่ยให้เชื้อกระจายตรงบริเวณที่มีหยดน้ำ 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 ซับน้ำออกให้แห้ง นำไปตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย และลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 100 เท่า

3.5.2 การย้อมสีสปอร์ (Spore staining) (Pelczar และChan, 1981)

นำเชื้อจากหลอดอาหารมาทำการเกลี่ยลงบนสไลด์ ปล่อยสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์ จากนั้นนำสไลด์ไปวางบนอ่างน้ำร้อน หยดสี Malachite green ให้ท่วมรอยเกลี่ย ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ระวังอย่าให้สีย้อมแห้ง ทิ้งสไลด์จนเย็น แล้วจึงล้างด้วยน้ำ ซับให้แห้งด้วยทิชชู่ จากนั้นหยดสี Safranin O ลงไปทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง นำสไลด์ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อตรวจสอบลักษณะและรูปร่างของสปอร์ สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนตัวเซลล์ติดสีแดง

3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำส่วนที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมาผสมกับสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 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 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส ความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยวัดค่า Refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสงใช้ Run time 30 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี 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 ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทดสอบการสร้างแก๊สโดยสังเกตฟองภายในหลอดดักแก๊ส

3.7.2 การทดสอบการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 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 ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจผลโดยสีของหลอดอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงไปเป็นสีเหลือง 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 ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจผลโดยสีของหลอดอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงไปเป็นสีเหลือง 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 ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจผลโดยสีของหลอดอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงไปเป็นสีเหลือง แสดงว่าให้ผลบวก

3.7.5 การทดสอบการเคลื่อนที่

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ แทง (Stab) ลงในหลอดอาหารวุ้นกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งประกอบไปด้วย ทริปโตส 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม และวุ้น 5 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ค) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน ในสภาวะไร้ออกซิเจน สังเกตการเจริญเติบโตโดยการแพร่กระจายของเชื้อออกจากบริเวณรอบรอยที่แทงลงไป

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และตัวทำละลายรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS โดยวิเคราะห์ตาราง ANOVA และใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's เพื่อดูความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าปริมาณความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลแต่ละไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ

จากการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินและแหล่งน้ำในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง โดยการเก็บตัวอย่างจากแหล่งดิน ทำการขุดให้ลึก 0.3 ถึง 0.5 เมตร ณ สถานที่เดียวกันจะขุดทั้งหมด 2 ตำแหน่ง ซึ่งมีระยะห่างกันอย่างน้อย 10.0 เมตร สำหรับตัวอย่างน้ำ ทำการเก็บตัวอย่างที่มีความลึกจากผิวหน้าน้ำอย่างน้อย 1.0 เมตร เก็บตัวอย่างทั้งหมด 26 แห่ง เป็นดิน 15 แห่ง ได้แก่ แปลงเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ (SA) ตึกอธิการบดี (SB) คณะบริหาร (SC) บริเวณสวนพระนคร (SD) และวัดปลูกศรัทธา (SE) ตัวอย่างน้ำทั้งหมด 11 แห่ง ได้แก่ สระน้ำคณะเกษตรศาสตร์ สระที่ 1 และ 2 (WA และ WB ตามลำดับ) สระน้ำบริเวณทางเข้าคณะวิศวกรรมศาสตร์ (WC) สระน้ำโรงอาหารคณะวิศวกรรมศาสตร์ สระที่ 1 และ 2 (WD และ WE ตามลำดับ) สระน้ำบริเวณลานอุทยานพระจอมเกล้า (WF) สระน้ำคณะบริหาร (WG) สระน้ำหลังตึกพระเทพฯ (WH) สระน้ำคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ (WI) สระน้ำสวนพระนคร (WJ) และคลองวัดปลูกศรัทธาบริเวณใกล้เคียงกับที่ให้อาหารปลา (WK)

ตารางที่ 4.1 สถานที่การเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง

สถานที่	รหัสของตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง
แปลงเกษตรที่ 1 คณะเกษตรศาสตร์	SA 1.1	ดินเหนียว ชื้นแฉะ สีดำ
	SA 1.2	ดินเหนียว ชื้นแฉะ สีดำ
แปลงเกษตรที่ 2 คณะเกษตรศาสตร์	SA 2.1	ดินร่วนปนเหนียว สีน้ำตาลเข้ม
	SA 2.2	ดินเหนียว
ทางเข้าแปลงเกษตร คณะเกษตรศาสตร์	SA 3.1	ดินร่วนปนทราย
	SA 3.2	ดินร่วนปนทราย
ตึกอธิการบดี จุดที่ 1	SB 1.1	ดินร่วนปนทราย
	SB 1.2	ดินร่วนปนทราย
ตึกอธิการบดี จุดที่ 2	SB 2.1	ดินโคลนติดริมบ่อน้ำ สีดำ
	SB 2.2	ดินเหนียวปนดินโคลน
ตึกอธิการบดี จุดที่ 3	SB 3.1	ดินเหนียว แห้ง แข็ง
	SB 3.2	ดินเหนียว แห้ง แข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) สถานที่การเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง

สถานที่	รหัสของตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง
ดินบริเวณคณะบริหาร จุดที่ 1	SC 1.1	ดินร่วนปนเหนียว ชื้นแฉะ
	SC 1.2	ดินร่วน ชื้นแฉะ
ดินบริเวณคณะบริหาร จุดที่ 2	SC 2.1	ดินร่วนปนทราย ชื้นแฉะ
	SC 2.2	ดินร่วนปนทราย ชื้นแฉะ
ดินบริเวณคณะบริหาร จุดที่ 3	SC 3.1	ดินร่วนปนทราย
	SC 3.2	ดินร่วนปนทราย
ดินบริเวณสวนพระนคร จุดที่ 1	SD 1.1	ดินร่วน
	SD 1.2	ดินร่วนปนทราย
ดินบริเวณสวนพระนคร จุดที่ 2	SD 2.1	ดินร่วนปนทราย
	SD 2.2	ดินร่วนปนทราย
ดินบริเวณสวนพระนคร จุดที่ 3	SD 3.1	ดินร่วน
	SD 3.2	ดินร่วน
ดินบริเวณวัดปลูกศรัทธา จุดที่ 1	SE 1.1	ดินร่วนปนทราย
	SE 1.2	ดินร่วนปนทราย
ดินบริเวณวัดปลูกศรัทธาจุดที่ 2	SE 2.1	ดินร่วน
	SE 2.2	ดินร่วน
ดินบริเวณวัดปลูกศรัทธาจุดที่ 3	SE 3.1	ดินร่วนปนเหนียว
	SE 3.2	ดินร่วนปนเหนียว

ตารางที่ 4.2 สถานที่การเก็บตัวอย่างน้ำพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง

สถานที่	รหัสของตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง
สระน้ำบริเวณแปลงเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ สระที่ 1	WA	สระบัว มีจอกและแหนปกคลุมผิวหน้าน้ำ น้ำนิ่ง ขุ่น และมีโคลนตมก้นสระ
สระน้ำบริเวณแปลงเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ สระที่ 2	WB	สระบัว มีจอกและแหนปกคลุมผิวหน้าน้ำ น้ำนิ่ง ขุ่น และมีโคลนตมก้นสระ
สระน้ำบริเวณทางเข้าคณะวิศวกรรมศาสตร์	WC	น้ำนิ่ง พบบัวบนผิวหน้าน้ำเป็นจำนวนน้อย มีปลาอาศัยอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) สถานที่การเก็บตัวอย่างน้ำพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง

สถานที่	รหัสของตัวอย่าง	ลักษณะของสระน้ำ
สระน้ำโรงอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สระที่ 1	WD	น้ำนิ่ง ขุ่น มีดอกบัว จอก แหน บริเวณผิวหน้าและโคลนตมก้นสระ
สระน้ำโรงอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สระที่ 2	WE	น้ำนิ่ง ขุ่น ไม่พบพืชน้ำ แต่มีสัตว์น้ำอาศัยอยู่
สระน้ำบริเวณลานอุทยาน พระจอมเกล้า	WF	น้ำนิ่ง ขุ่น ไม่พบพืชน้ำ แต่มีปลาอาศัยอยู่
สระน้ำคณะบริหาร	WG	น้ำนิ่ง ขุ่น พบบัวเป็นจำนวนน้อย
สระน้ำหลังตึกพระเทพฯ	WH	น้ำนิ่ง ขุ่น พบบัวเป็นจำนวนน้อย มีโคลนตมบริเวณก้นสระ
สระน้ำคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	WI	น้ำนิ่ง ขุ่น พบจอกและแหน มีโคลนตมบริเวณก้นสระ
สระน้ำสวนพระนคร	WJ	น้ำนิ่ง ค่อนข้างขุ่นมาก มีโคลนตมบริเวณก้นสระ
คลองวัดปลูกศรัทธา บริเวณใกล้เคียงกับที่ให้อาหารปลา	WK	กระแสน้ำไหลเอื่อย ขุ่น มีผักตบชวา และปลาอาศัยอยู่

4.2 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ

จากการเก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินและแหล่งน้ำในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง เป็นจำนวนทั้งสิ้น 41 แห่ง และได้ทำการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเชื้อ โดยคัดเลือกจากลักษณะของโคโลนีบนเพลทอาหาร รูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การติดสีย้อมแกรมและการติดสีย้อมสปอร์ โดยมีลักษณะทางกายภาพของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เป็นเชื้ออ้างอิง โดยเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp. จะต้องมีลักษณะใกล้เคียงกับคุณสมบัติดังนี้ รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อต้องมีลักษณะเป็นท่อนสั้น มีการสร้างสปอร์บริเวณส่วนปลายของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อย้อมแกรมต้องติดสีม่วงหรือแกรมบวก ซึ่งไอโซเลทที่มีลักษณะสอดคล้องกับคุณสมบัติเหล่านี้มีเพียง 11 รหัส ดังนี้ ดินแปลงเกษตรที่ 1 และแปลงเกษตรที่ 2 คณะเกษตรศาสตร์ (SA 1.1 และ SA 2.2 ตามลำดับ), ตึกอธิการบดีจุดที่ 1 (SB 1.1), ตึกอธิการบดีจุดที่ 2 (SB 2.1 และ SB 2.2), สวนบริเวณคณะบริหาร (SC 1.1), สระน้ำบริเวณลานอุทยานพระจอมเกล้า (WF), สระน้ำคณะบริหาร (WG), สระน้ำหลังตึกพระเทพฯ (WH), สระน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ (WI) และสระน้ำสวนพระนคร (WJ)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง ทั้งหมด 41 ไอโซเลท โดยเปรียบเทียบจาก *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference)

รหัสของเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์
Reference	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์
SA 1.1	กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์
SA 1.2	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
	กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
SA 2.1	กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	-	สร้างสปอร์
SA 2.2	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์
SA 3.1	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
SA 3.2	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
SB 1.1	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์ บริเวณปลายเซลล์
SB 1.2	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	สร้างสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง ทั้งหมด 41 ไอโซเลท โดยเปรียบเทียบจาก *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference)

รหัสของเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์
SB 2.1	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์
SB 2.2	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์
SB 3.1	กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
SB 3.2	กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
SC 1.1	กลม นูน ผิวหน้ามันและเรียบ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์
SC 1.2	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
SC 2.1	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์
SC 2.2	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	ไม่สร้างสปอร์
SC 3.1	กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
SC 3.2	กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง ทั้งหมด 41 ไอโซเลท โดยเปรียบเทียบจาก *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference)

รหัสของเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์
SD 1.1	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SD 1.2	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SD 2.1	กลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SD 2.2	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SD 3.1	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SE 1.1	กลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SE 1.2	กลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SE 2.1	กลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SE 2.2	กลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
SE 3.1	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
SE 3.2	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
WA	กลม นูน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำในพื้นที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและบริเวณใกล้เคียง ทั้งหมด 41 ไอโซเลท โดยเปรียบเทียบจาก *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference)

รหัสของเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเชื้อ	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์
WC	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีครีม ขอบหยัก	ท่อน	-	ไม่สร้างสปอร์
WD	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
WE	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อนยาว	+	สร้างสปอร์
WF	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์
WG	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ มันวาว สีขาวขุ่น ขอบหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์
WH	กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์
WI	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันเรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์
WJ	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามันเรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก	ท่อน	+	สร้างเอนโดสปอร์บริเวณปลายเซลล์
WK	กลม นูน มันวาว สีเหลือง ขอบเรียบ	ท่อน	+	ไม่สร้างสปอร์

หมายเหตุ : ติดสีแกรม + คือ เชื้อแกรมบวก, ติดสีแกรม – คือ เชื้อแกรมลบ

จากตารางที่ 4.3 ข้างต้น พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 11 เชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp. ได้แก่ SA 1.1, SA 2.2, SB 1.1, SB 2.1, SB 2.2, SC 1.1, WF, WG, WH, WI และ WJ เนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับเชื้ออ้างอิง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การย้อมติดสีของแกรมบวกและการสร้างเอนโดสปอร์บริเวณส่วนปลายของเซลล์ แต่โคโลนีของเชื้อจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป

ในการศึกษาของ Abd-Alla และคณะ (2014) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลได้ โดยคัดแยกจากดินที่ใช้ในการเพาะปลูก ประเทศอียิปต์ พบว่า เชื้อที่ให้ผลผลิต ABE ทั้งหมดมีรูปร่างเป็นท่อน แกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ และโคโลนีบางไอโซเลทจะมีสีที่ไม่เหมือนกันกับโคโลนีของไอโซเลทอื่นๆ เช่น เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในเพลทอาหาร RCM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 4.3) เชื้อที่มีคุณสมบัติในการติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์และมีรูปร่างเป็นท่อน จะนำมาทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว T6 จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโท-กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งเปรียบเทียบกับ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่มีปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลเท่ากับ 2.304, 0.021 และ 8.497 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมมีค่าเท่ากับ 10.822 กรัม/ลิตร

ดังผลที่ปรากฏในตารางที่ 4.4 พบว่า เชื้อ SC 1.1 สามารถผลิตบิวทานอลที่มีความเข้มข้น 0.769 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณที่มากกว่า *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เป็นเชื้ออ้างอิง (0.021 กรัม/ลิตร) เชื้อที่ผลิตอะซิโตนให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ WI (2.550 กรัม/ลิตร) ส่วนความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงที่สุดจะผลิตได้จาก SA 2.2 (1.507 กรัม/ลิตร) ในขณะที่ SB 2.1 กลับไม่พบปริมาณเอทานอล เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมแล้ว เชื้อที่ให้ความเข้มข้นสูงสุดคือ WI มีความเข้มข้น 3.202 กรัม/ลิตร ซึ่งโดยทั่วไปผลผลิตรวม ABE ของ *Clostridium* spp. มีค่าตั้งแต่ 0.900 จนถึงสูงสุด 20.000 กรัม/ลิตร และความสามารถในการผลิต คือ 0.040 จนถึง 0.240 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ความสามารถในการผลิต ABE ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ ชีวมวลที่ใช้ อุณหภูมิ สปีชีส์ของ *Clostridium* spp. (ชนิกา และคณะ, 2555) นอกจากนี้ ยังรวมถึงระยะเวลาในการตรวจสอบปริมาณของบิวทานอล โดยระหว่างการเจริญเติบโตในระยะ Stationary phase เชื้อจะมีความสามารถผลิตบิวทานอลและอะซิโตนได้สูงสุด ซึ่งไพรูเวทที่ได้จากระยะ Exponential phase จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตท บิวทิเรทและบิวทานอล ดังนั้น เมื่อเชื้อเข้าสู่สภาวะ Stationary phase ให้ทำการเก็บเชื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อไม่ให้ปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ลดลง จึงไม่ให้ทำค่าความเข้มข้นของสารคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง (Cato และคณะ, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

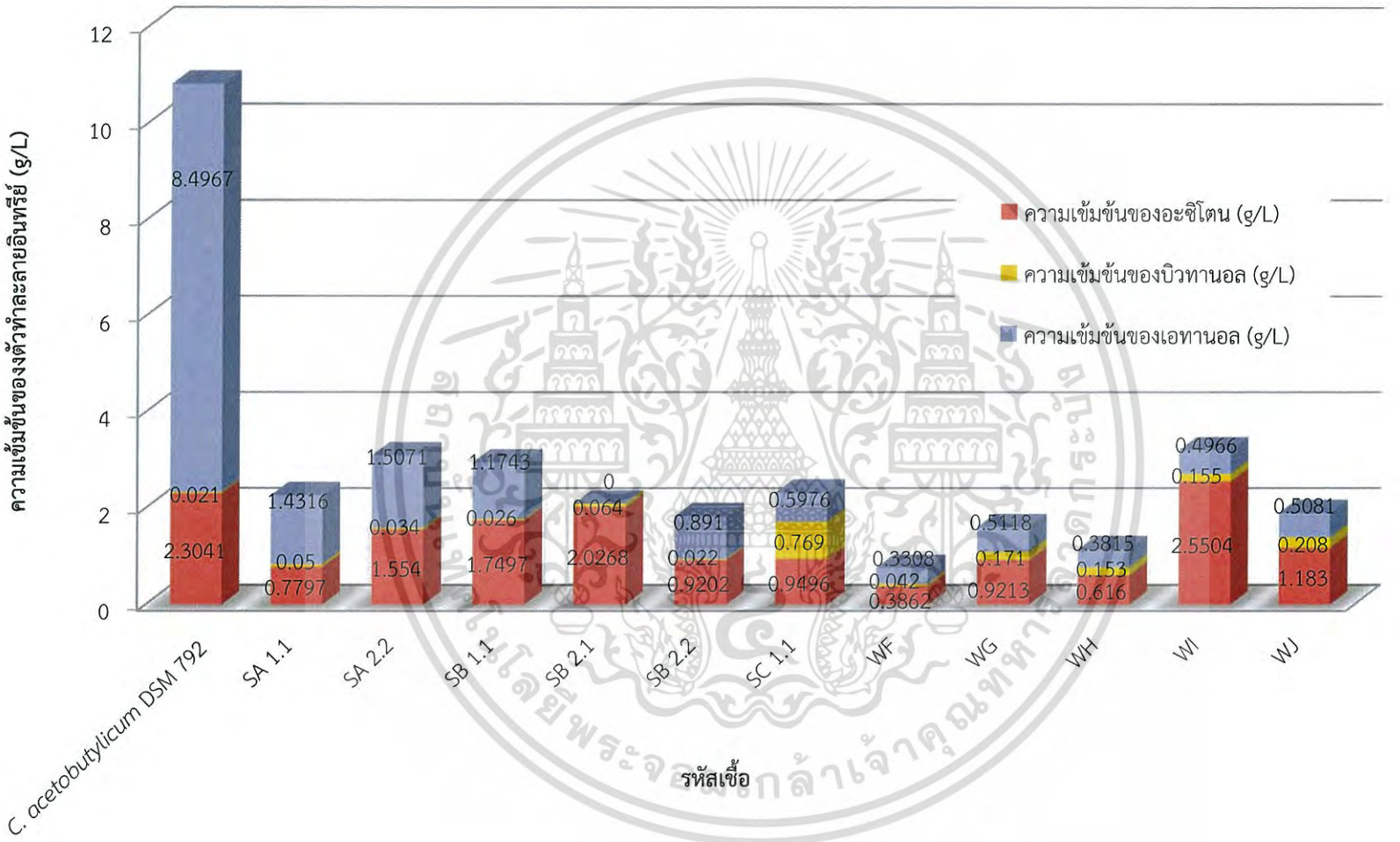
ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมที่วิเคราะห์ได้จากเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp. โดยมี *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นอะซิโตน (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นบิวทานอล (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวม (กรัม/ลิตร)
Reference	$2.304^{ab} \pm 0.776$	$0.021^{b} \pm 0.002$	$8.497^{a} \pm 8.908$	$10.822^{a} \pm 8.533$
SA 1.1	$0.780^{cd} \pm 1.115$	$0.050^{b} \pm 0.063$	$1.432^{b} \pm 1.337$	$2.224^{b} \pm 2.411$
SA 2.2	$1.554^{abcd} \pm 0.712$	$0.034^{b} \pm 0.002$	$1.507^{b} \pm 1.201$	$3.095^{b} \pm 1.911$
SB 1.1	$1.750^{abcd} \pm 0.822$	$0.026^{b} \pm 0.002$	$1.174^{b} \pm 1.299$	$2.950^{b} \pm 2.113$
SB 2.1	$2.027^{abc} \pm 1.526$	$0.064^{b} \pm 0.041$	0	$2.091^{b} \pm 1.559$
SB 2.2	$0.920^{cd} \pm 0.398$	$0.022^{b} \pm 0.003$	$0.891^{b} \pm 0.313$	$1.833^{b} \pm 0.708$
SC 1.1	$0.950^{cd} \pm 0.295$	$0.769^{a} \pm 0.641$	$0.598^{b} \pm 0.250$	$2.316^{b} \pm 0.230$
WF	$0.386^{d} \pm 0.291$	$0.042^{b} \pm 0.033$	$0.331^{b} \pm 0.357$	$0.759^{b} \pm 0.612$
WG	$0.921^{cd} \pm 0.004$	$0.171^{b} \pm 0.005$	$0.512^{b} \pm 0.106$	$1.604^{b} \pm 0.104$
WH	$0.616^{d} \pm 0.102$	$0.153^{b} \pm 0.018$	$0.382^{b} \pm 0.110$	$1.151^{b} \pm 0.185$
WI	$2.550^{a} \pm 0.239$	$0.155^{b} \pm 0.004$	$0.497^{b} \pm 0.102$	$3.202^{b} \pm 0.316$
WJ	$1.183^{bcd} \pm 0.590$	$0.208^{b} \pm 0.096$	$0.508^{b} \pm 0.306$	$1.899^{b} \pm 0.968$

หมายเหตุ : *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (Reference), แปลงเกษตรที่ 1 คณะเกษตรศาสตร์ (SA 1.1), แปลงเกษตรที่ 2 คณะเกษตรศาสตร์ (SA 2.2), ตึกอธิการบดีจุดที่ 1 (SB 1.1), ตึกอธิการบดีจุดที่ 2 (SB 2.1 และ SB 2.2) ดินบริเวณคณะบริหารจุดที่ 1 (SC 1.1), สระน้ำบริเวณลานอุทยานพระจอมเกล้า (WF), สระน้ำคณะบริหาร (WG), สระน้ำหลังตึกพระเทพฯ (WH), สระน้ำคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ (WI) และสระน้ำสวนพระนคร (WJ); a, b, c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$); ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Montoya และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียกว่า 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อที่คัดแยกได้จากดินและน้ำบริเวณเขตลาดกระบัง และมีเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference)

Abd-Alla และคณะ (2014) ทำการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้ โดยคัดแยกจากดินที่ใช้ในการเพาะปลูกพืชแต่ละชนิด ณ ประเทศอียิปต์ โดยกำหนดให้ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 เป็นเชื้ออ้างอิง ซึ่งพบว่าเชื้อดังกล่าวผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมเท่ากับ 11.543 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของอะซิโตนเท่ากับ 2.735 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของบิวทานอลเท่ากับ 7.463 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 1.345 กรัม/ลิตร ส่วนเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน พบว่ามีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ASU 10, ASU 55 และ ASU 58 ที่ให้ผลผลิตความเข้มข้น ABE เท่ากับ 31.891, 19.235 และ 29.809 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายรวม ABE ของเชื้ออ้างอิง นอกจากนี้ความเข้มข้นของอะซิโตนที่สูงสุด ผลิตได้จากไอโซเลท ASU 55 พบ 15.920 กรัม/ลิตร ในทางกลับกัน ASU 58 ให้ความเข้มข้นของบิวทานอลและเอทานอลที่สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 16.770 และ 2.698 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

4.4 การทดสอบทางชีวเคมี

ไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เป็นเชื้ออ้างอิง ได้แก่ WI และ WJ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์และสวนพระนคร ตามลำดับ โดยไอโซเลททั้งสองนี้สามารถย่อยน้ำตาลมอลโตส ไซโลส เซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังสร้างแก๊สในระหว่างการเจริญเติบโต อีกทั้งยังเคลื่อนที่ได้ ดังตารางที่ 4.5

ในการศึกษาของ Nomura และคณะ (2013) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนและเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์ โดยทำการคัดแยกจากสลัดจ์ที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นตรวจสอบเชื้อทางกายภาพ ได้แก่ การติดสีแกรมและการติดสีสปอร์ ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง PGY การสร้างคะตะเลสและออกซิเดส การทำงานของเอนไซม์ต่อคาร์โบไฮเดรทด้วยชุดเครื่องมือทดสอบ API20A kits ซึ่งพบว่า เชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อแกรมบวก รูปร่างท่อน สามารถสร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ โคโลนีบนอาหารแข็ง PGY มีลักษณะกลมเรียบ สีเหลืองอ่อน พบการสร้างคะตะเลสและเบต้ากลูโคซิเดส แต่ไม่พบการสร้างออกซิเดส ยูรีเอส และเจลาติเนส นอกจากนี้ยังสามารถหมักน้ำตาล ดี-กลูโคส, ดี-มอลโตส, ดี-ไซโลส, ดี-เซลโลไบโอส, ดี-แมนนิทอล, ดี-แลกโตส, ดี-แมนโนส, ดี-ทรีฮาโลส และ แอล-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 2.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็น *Clostridium* spp. ซึ่งคัดเลือกจากปริมาณการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล โดยทดสอบการย่อยน้ำตาลมอลโตส ไซโลส เซลโลไบโอส ทดสอบการสร้างแก๊สและการเคลื่อนที่ กำหนดให้ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference)

รหัสของเชื้อ	จำนวนซ้ำ	ทดสอบการย่อยน้ำตาล			ทดสอบการสร้างแก๊ส	ทดสอบการเคลื่อนที่
		มอลโตส	ไซโลส	เซลโลไบโอส		
Reference	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
SC 1.1	1	+	+	-	-	+
	2	+	+	+	-	+
	3	+	+	+	-	+
WG	1	+	+	-	+	+
	2	+	-	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
WH	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	-	+
	3	+	+	+	+	+
WI	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
WJ	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (Reference), ดินบริเวณคณะบริหาร จุดที่ 1 (SC 1.1), สระน้ำคณะบริหาร (WG), สระน้ำหลังตึกพระเทพฯ (WH), สระน้ำคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ (WI), สระน้ำสวนพระนคร (WJ), เกิดการเปลี่ยนแปลง (+) และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (-)

การผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลของ *C. beijerinckii* ที่สามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูง โดยส่วนใหญ่ได้จากการใช้วัตถุดิบประเภทน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซส ที่ได้จากการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสลิกโนเซลลูโลส ซึ่งพบว่าการใช้ชีวมวลจำพวกเซลลูโลสนี้ จะเป็นกุญแจสำคัญในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีการวิจัยโดยใช้กากของต้นบีท (Sugar beet pulp) ที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลสร้อยละ 20 – 25 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 25 – 36 เพคตินร้อยละ 20 – 25 โปรตีนร้อยละ 10 – 15 และลิกนินร้อยละ 1 – 2 มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเอทานอล เนื่องจากเมื่อทำการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสกากของต้นบีทแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลอย่างง่าย ซึ่งสามารถนำมาใช้ต่อได้ในกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Bellido และคณะ, 2015)

Fengxue Xin และ Jianzhong He (2012) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Kluyvera* สายพันธุ์ OM3 ร่วมกับ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ BOH3 โดยการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วย *Kluyvera* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมาย่อยสลายชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสให้ได้เป็นไซแลน แล้วจึงเกิดการหมักไซโลสเพื่อให้ได้บิวทานอลด้วย *Clostridium* sp. BOH3 ต่อไป ซึ่งพบว่ามีการผลิตบิวทานอลเท่ากับ 1.2 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ Bellido และคณะ, 2014 ยังศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสด้วยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* โดยเลือกใช้วัตถุดิบที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกศึกษาการหมักน้ำตาลไซโลส 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

ลักษณะทางกายภาพของ WI กับ WJ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้ออ้างอิง แต่การให้ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลของ WI และ WJ กลับน้อยกว่าเชื้ออ้างอิงมาก อาจเนื่องมาจากแบคทีเรีย WI และ WJ เป็น *Clostridium* spp. อีกสายพันธุ์หนึ่ง ที่มีคุณลักษณะบางประการใกล้เคียงกับ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 จึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอล โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งดินและแหล่งน้ำบริเวณเขตลาดกระบัง ซึ่งแหล่งดินที่ทำการสำรวจ ได้แก่ ดินแปลงเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ดินบริเวณตึกอธิการบดี ดินบริเวณคณะบริหาร สวนพระนครและวัดปลูกศรัทธา สำหรับแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างได้เก็บตัวอย่าง มีดังนี้ บ่อน้ำแปลงเกษตรคณะเกษตรศาสตร์ สระน้ำคณะวิศวกรรมศาสตร์ ลานอุทยานพระจอมเกล้า สระน้ำคณะบริหาร สระน้ำบริเวณตึกพระเทพฯ สระน้ำคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ สวนพระนครและคลองบริเวณที่ให้อาหารปลา วัดปลูกศรัทธา ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ซึ่งคัดแยกได้ 41 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 พบว่า รหัสเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันกับเชื้ออ้างอิง คือ SA 1.1, SA 2.2, SB 1.1, SB 2.1, SB 2.2, SC 1.1, WF, WG, WH, WI และ WJ เนื่องจากมีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเชื้ออ้างอิง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การย้อมติดสีของแกรมบวกและการสร้างเอนโดสปอร์บริเวณส่วนปลายของเซลล์ แต่ลักษณะของโคโลนีจะแตกต่างกันออกไป

เมื่อนำตัวอย่างที่วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยามาตรวจสอบหาปริมาณความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบสารผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ 5 อันดับที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด ได้แก่ รหัส WH, WI, WG, WJ และ SC 1.1 ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอลเท่ากับ 0.153, 0.155, 0.171, 0.208 และ 0.7689 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเชื้อ SC 1.1 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดสุด (0.769 กรัม/ลิตร) ซึ่งมีปริมาณที่มากกว่า *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เป็นเชื้ออ้างอิง (0.021 กรัม/ลิตร) เชื้อที่ผลิตอะซิโตนให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ WI (2.550 กรัม/ลิตร) ส่วนความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงที่สุดจะผลิตได้จาก SA 2.2 (1.507 กรัม/ลิตร) ในขณะที่ SB 2.1 กลับไม่พบปริมาณเอทานอล เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมแล้ว เชื้อที่ให้ความเข้มข้นสูงสุดคือ WI มีความเข้มข้น 3.202 กรัม/ลิตร

จากนั้นนำเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทที่ผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด ได้แก่ รหัส WH, WI, WG, WJ และ SC 1.1 มาทดสอบการหมักน้ำตาล (มอลโตส, ไซโลสและเซลโลไบโอส) การสร้างแก๊สและการเคลื่อนที่ เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ซึ่งเปรียบเทียบกับเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 พบว่า เชื้อรหัส WI และ WJ โดยเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทนี้คัดแยกได้จาก

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งน้ำคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์และสวนพระนคร ตามลำดับ เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นคล้ายคลึงกันกับเชื้ออ้างอิงมากที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่มุ่งเน้นไปที่การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสกุล *Clostridium* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งก็คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยคัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เป็นเชื้ออ้างอิง จากการวิเคราะห์แหล่งดินและแหล่งน้ำ พบว่า มีการกระจายพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างไม่ครอบคลุม ส่งผลให้เชื้อที่คัดแยกได้ไม่มีความหลากหลายหรือมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อทำการเก็บตัวอย่าง ควรตรวจวัดค่าพีเอชของแหล่งดินและแหล่งน้ำว่าเหมาะสมต่อการเก็บหรือไม่ ถ้าหากค่าพีเอชของแหล่งตัวอย่างนั้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium* spp. ก็ไม่สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ถ้าหากต้องการศึกษาต่อยอดงานวิจัยควรต้องศึกษาถึงระดับพันธุศาสตร์ของเชื้อเพื่อให้สามารถระบุจีนัสและสปีชีส์ได้ จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ 16s rRNA และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอย่างละเอียด อันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 22 ฉบับที่ 3 (ก.ย. - ธ.ค. 2555) : 703-709.

ธีระนัย สามะหาดไทย, ปาริฉัตร ค้าขาย และ อรรถพล ประทีปทอง. การศึกษาผลของน้ำตาลโมเลกุลคู่ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462. ปริญญานิพนธ์, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2556.

สุธาทิพย์ ตรีพลอักษร และ นฤมล ทองไว. 2554. "การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน." หน้า 253-257. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 23. เชียงใหม่ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อภิญญา จันทรวัฒนะ หลักปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/sub.php.

Abd-Alla, M. H., Ahmed Zohri Abdel-Naser, El-Enany Abdel-Wahab Elsadek and Ali S. M. (2014). Acetoneebutanoleethanol Production from Substandard and Surplus Dates by Egyptian Native *Clostridium* Strains. Anaerobe 32. p. 77–86.

Al-Shorgani, N. K. N., Isa, M. H. M., Yusoff, W. M. W., Kalil, M. S. and Hamid, A. A. (2016). Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* Strain and Characterization of Its Fermentation Performance on Agricultural Wastes. Renewable Energy 86. p. 459-465.

Atsumi, S., Hanai, T. and 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. p. 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. p. 332 – 338.

Berezina, O. V., Brandt, A., Yarotsky, S., Schwarz, W. H. and Zverlov, V. V. (2009). Isolation of A New Butanol-producing *Clostridium* strain: Highlevel of Hemicellulosic Activity and Structure of Solventogenesis Genes of A New

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Clostridium saccharobutylicum Isolate. Systematic and Applied Microbiology 32. p. 449–459.

Cato, E.P., George, W. L., and Finegold, S. M. (1986). Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23AL. In: P.H.A. SNEATH, N.S. MAIR, M.E. SHARPE and J.G. HOLT (editors), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, first edition, vol. 2, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 1141-1200.

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.

Donker, H. J. L. (1926). Bijdrage tot de Kennis der Boterzuur, Butylacoholen acetonigistingen. Dissertations Delft. W.D. Meinema Delft.

Gram, C. (1884). The Differential Staining of Schizomycetes in Tissue Sections and in Dried Preparations. Fortschitte der Medicin. 2:185-189.

Hansen, Alan, C., Zhang, Q. and Peter, W. L. (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.

Keis, S., Shaheen, R. and Jones, D. T. (2001). Emended Descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and Descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. Int. J. Syst. Evo.l Microbiol. Nov;51 (Pt 6):2095-103.

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.

Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., and Jung, K. S. (2008b). Fermen tative Butanol Production by Clostridia. Biotechnology and Bioengineering 101, 209-228.

McCoy, E., Fred, E. B., Peterson, W. H., and Hastings, E. G. (1926). A cultural Study of The Acetone Butyl Alcohol Organism. J. Infect. Dis. 39:457-483.

Montoya, D., Spitia, S., Silva, E. and Schwarz, W. H., (2000). Isolation of Mesophilic Solvent-producing Clostridia from Colombian Sources: Physiological Characterization, Solvent Production and Polysaccharide Hydrolysis. Journal of Biotechnology 79. p. 117–126.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nomura, T., Naimen, A., Toyoda, S., Kuriyama, Y., Tokumoto, H. and Konishi, Y. (2013). Isolation and Characterization of A Novel Hydrogen-producing Strain *Clostridium* sp. Suitable for Immobilization. International journal of Hydrogen energy 39, p. 1280–1287.

Tankeshwar, A. (2010). Cultivation of Aerobic and Anaerobic Bacteria [Online]. Available : http://microeonline.com/cultivation-of-aerobic-and-anaerobic-bacteria/ (22 ธันวาคม 2558).

Tankeshwar, A. (2013). Commonly used anaerobic media for anaerobic bacteriology [Online]. Available : http://microbeonline.com/commonly-used-anaerobic-media-for-anaerobic-bacteriology/ (22 ธันวาคม 2558)

Pelczar and Chan. (1981). Elements of Microbiology p. 57.

Prazmowski, A. (1880). Untersuchung über die Entwickelungsgeschichte und Fermentwirking einiger Bacterien-Arten Hugo Voigt, Leipzig, p. 1-58.

Whitman, W. B. Bergey's Manual Trust Department of Microbiology 527. Biological Sciences Building University of Georgia Athens, USA. P. 749-810.

Xin, F. and He, J. (2012). Characterization of a Thermostable Xylanase from a Newly Isolate *Kluyvera* species and Its Applicaton for Biobutanol Production. Bioresource Technology 135 p. 309-315.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด เตรียมโดยผสมกับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารด้วย NaOH จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1. **Reinforced Clostridial Medium (RCM)**

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

*หมายเหตุ ผสมอาหารสำเร็จรูป 38 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร
กรณีต้องการเตรียมอาหาร RCM agar ให้เติมวุ้น 1.0 % ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ

2. **T6 (ปรับปรุงมาจากอาหาร TYA)**

Tryptone	6.0 กรัม	$FeSO_4$. $7H_2O$	10.0 มิลลิกรัม
Yeast Extract	2.0 กรัม	Ammonium Acetate	3.0 กรัม
Glucose	30.0 กรัม	Cystein Hydrochloride	0.5 กรัม
KH_2PO_4	0.5 กรัม	pH 6.5 ± 0.2	
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.3 กรัม		

กรณีต้องการเตรียมอาหาร T6 agar ให้เติมวุ้น 1.5 % ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารอินทรีย์และสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วย HPLC และกราฟมาตรฐาน

1. สารละลายกรดซิตริก

ชั่งผงซิตริก 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

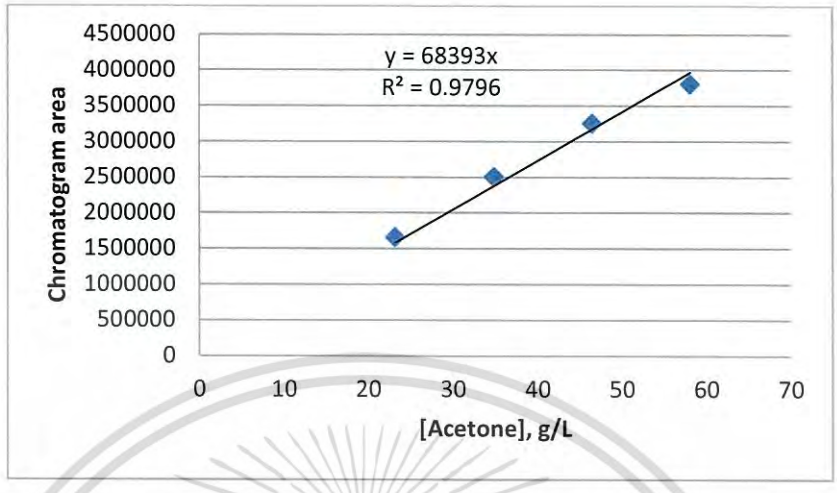
การเตรียมสารละลายอินทรีย์ในการวิเคราะห์

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

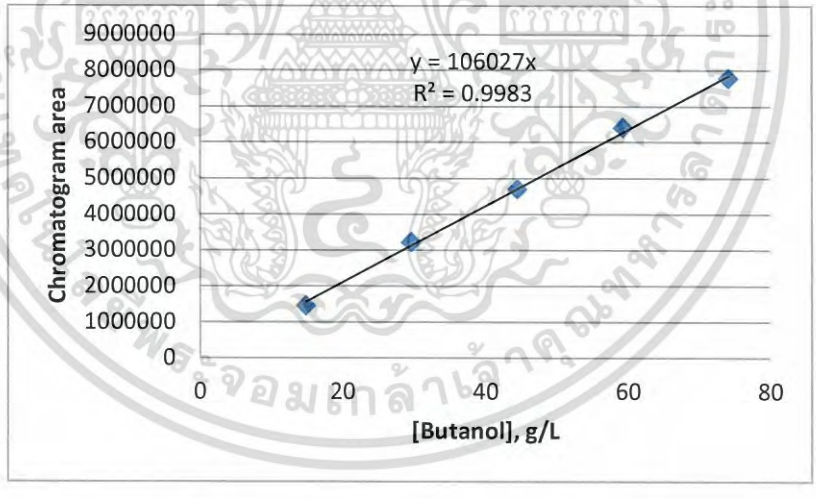
นำสารละลายทั้งหมดกรองผ่านชุดกรองระบบสุญญากาศ ใช้เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายโมบายเฟสและน้ำกลั่นปราศจากไอออน (De-ionized water) แล้วนำกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่อง Sonicator bath เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟสารละลายมาตรฐาน

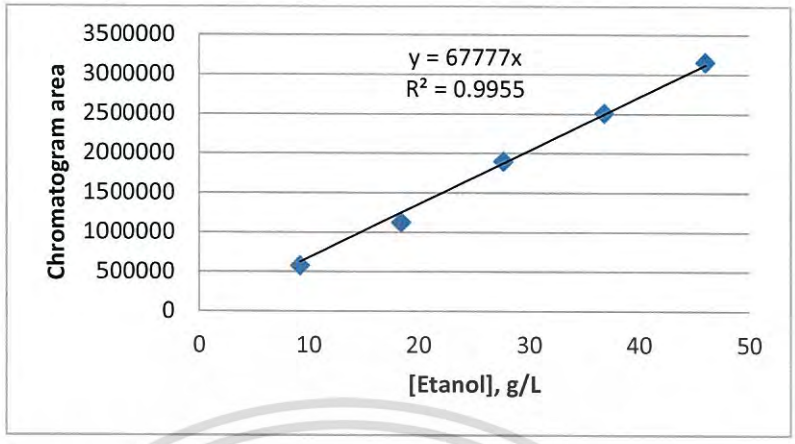


รูปที่ ข.1 กราฟสารละลายมาตรฐานอะซิโตน



รูปที่ ข.2 กราฟสารละลายมาตรฐานบิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.3 กราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี

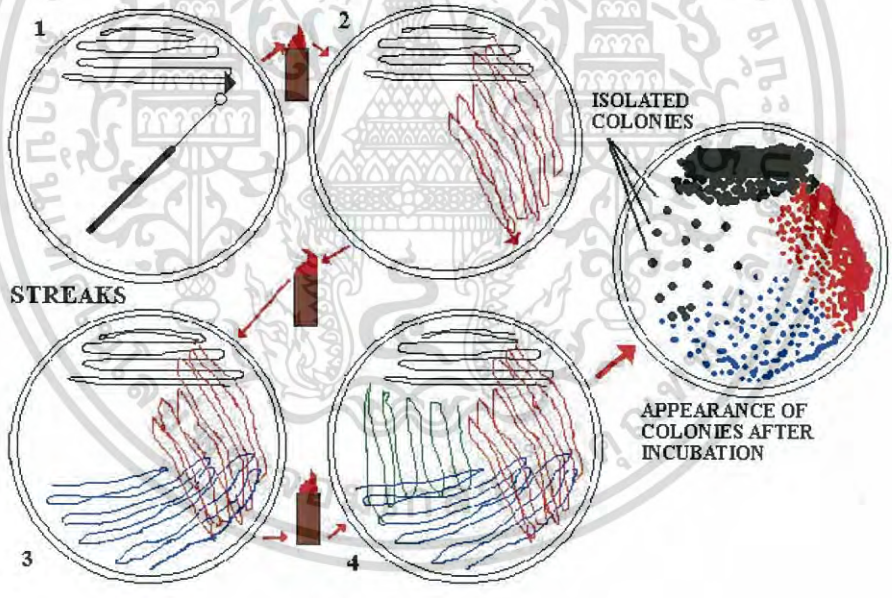
ส่วนผสมของแต่ละอาหารให้นำมาผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันโดยใช้เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) แล้วปิเปตลงสู่หลอดทดลองด้วยปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
เทคนิคการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

Streak-Plate Technique

เทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์คือ วิธี Cross streak plate ซึ่งทำได้โดยใช้ Loop แตะตัวอย่างแล้วลากหรือขีด (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Agar plate) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ ดังรูป ง (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา, 2556)



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ 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. ปล่อยสไลด์ทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง (Air dry)
5. ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ โดยใช้ความร้อน (Heat fixed) คือ นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ ประมาณ 2-3 ครั้ง ปล่อยให้สไลด์เย็นลง
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 ซับด้วยกระดาษทิชชู่ให้แห้ง
10. ทำการตรวจดูรูปร่างเชื้อแบคทีเรีย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า และ100 เท่า

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

วิธีการย้อมสปอร์

1. นำเชื้อแบคทีเรีย มาทำ Smear บนสไลด์ ปล่อยสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ
2. ใส่สี Malachite green ลงบนสไลด์จนท่วมบริเวณที่มีแบคทีเรีย
3. ใช้เปลวไฟอ่อนๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ลนเป็นเวลาประมาณ 5 นาที ระวังอย่าให้สีย้อมแห้งเติมสีย้อมเมื่อจำเป็น
4. ทิ้งสไลด์จนเย็น ล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง
5. ใส่สี Safranin O ลงไป ทิ้งไว้ 1 นาที
6. ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง
7. นำสไลด์ไปตรวจดูรูปร่างสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า และ 100 เท่า สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนเซลล์จะติดสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
ลักษณะทางกายภาพ

รูปที่ ฉ.1 ลักษณะโคโลนีของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792
โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ ไม่มันวาว แบน สีขาวขุ่น ขอบหยัก

รูปที่ ฉ.2 ลักษณะโคโลนีของ SC 1.1
กลม นูน ผิวหน้ามันและเรียบ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ฉ.3 ลักษณะโคโลนีของ WG
โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าขรุขระ มันวาว สีขาวขุ่น ขอบหยัก

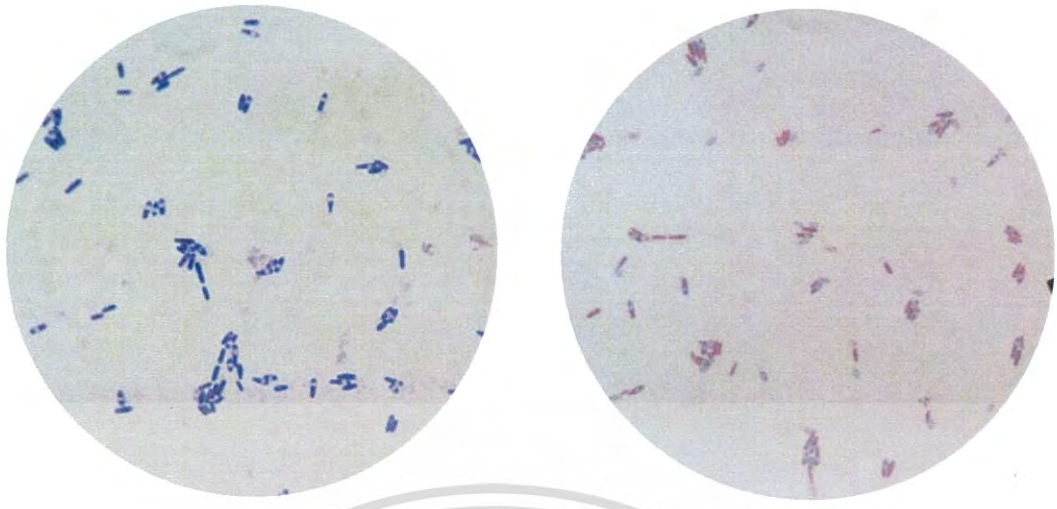
รูปที่ ฉ.4 ลักษณะโคโลนีของ WH
กลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีครีมขุ่น ขอบเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ฉ.5 ลักษณะโคโลนีของ WI
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

รูปที่ ฉ.6 ลักษณะโคโลนีของ WJ
โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้ามัน เรียบ แบน สีขาวขุ่น ขอบเว้าและหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



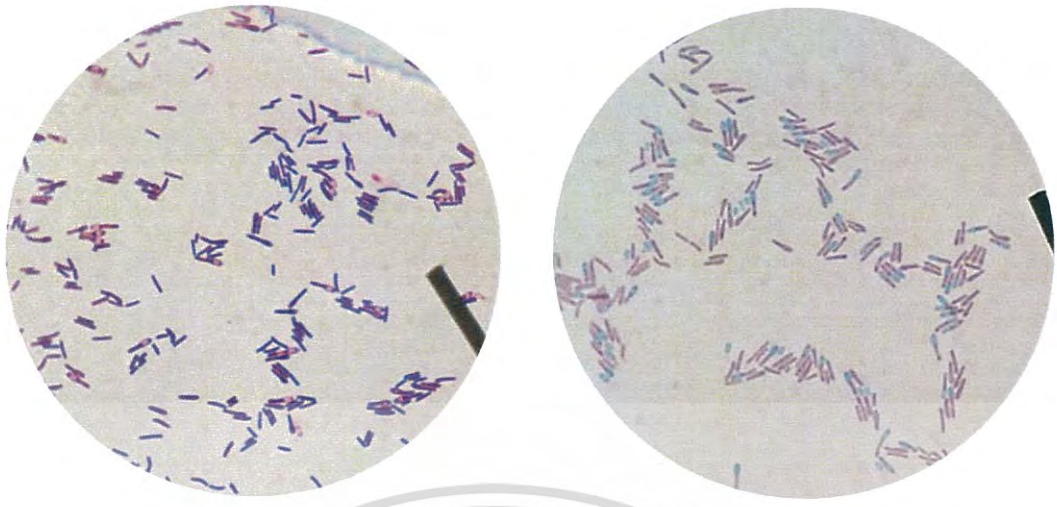
ก ข

รูปที่ ฉ.7 (ก) การติดสีย้อมแกรมของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792
รูปที่ ฉ.7 (ข) การติดสีย้อมสปอร์ของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792

2ก 2ข

รูปที่ ฉ.8 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส SC 1.1
รูปที่ ฉ.8 (ข) การติดสีย้อมสปอร์ของเชื้อรหัส SC 1.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



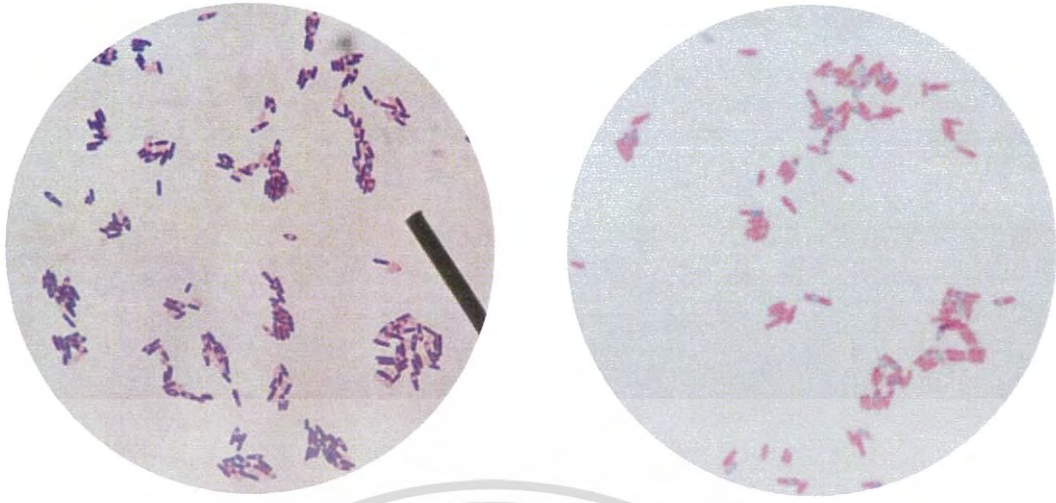
3ก 3ข

รูปที่ ฉ.9 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WG
รูปที่ ฉ.9 (ข) การติดสีย้อมสปอร์ของเชื้อรหัส WG

4ก 4ข

รูปที่ ฉ.10 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WH
รูปที่ ฉ.10 (ข) การติดสีย้อมสปอร์ของเชื้อรหัส WH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



5ข

5ก 5ข

รูปที่ ฉ.11 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WI
รูปที่ ฉ.11 (ข) การติดสีย้อมสปอร์ของเชื้อรหัส WI

6ก 6ข

รูปที่ ฉ.12 (ก) การติดสีย้อมแกรมของเชื้อรหัส WJ
รูปที่ ฉ.12 (ข) การติดสีย้อมสปอร์ของเชื้อรหัส WJ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช
ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ และการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตาราง ช.1 พื้นที่ใต้กราฟตัวทำละลายอินทรีย์ของเชื้อแต่ละไอโซเลต

รหัสเชื้อ	จำนวนซ้ำ	พื้นที่ใต้กราฟ			
		กรดซิตริก	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
Reference	1	1269815	218474	1987	286982
	2	1299129	136339	2483	174789
	3	1187133	113137	2161	1187133
SA1.1	1	1196190	133220	1443	183189
	2	1213730	8569	1250	77819
	3	1172612	8865	1192	14037
SA2.2	1	1214773	76105	3560	53757
	2	1158649	148248	3090	178933
	3	1245222	75343	3544	53097
SB1.1	1	1208118	115267	2832	61488
	2	1174575	161972	2485	161081
	3	1289357	63699	2724	0
SB2.1	1	1199816	116354	8705	0
	2	1183698	39967	1603	0
	3	1204189	236927	8877	0
SB2.2	1	1185483	30149	2507	34582
	2	1245687	82863	2145	76913
	3	1207176	68454	2052	62473
SC1.1	1	1115780	75186	2777	51869
	2	1191006	59995	109464	34499
	3	1125623	40156	110505	22788
WF	1	1125698	42813	1556	44571
	2	1133035	8339	7530	9287
	3	1216858	20698	3021	6298

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ช.1 (ต่อ) พื้นที่ใต้กราฟตัวทำละลายอินทรีย์ของเชื้อแต่ละไอโซเลต

รหัสเชื้อ	จำนวนซ้ำ	พื้นที่ใต้กราฟ			
		กรดซิตริก	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
WG	1	1075828	53087	15567	25254
	2	1067636	53092	15642	26324
	3	1108802	55200	15303	37500
WH	1	1120897	34171	15429	16325
	2	1153287	34095	15665	23290
	3	1215072	47976	13374	31994
WI	1	1158554	157868	14963	24737
	2	1128817	170180	15006	36302
	3	1227452	153534	15592	31916
WJ	1	1149679	84876	25529	28374
	2	3221222	90499	26069	39172
	3	1109858	99042	24078	49408

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ช.2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สารอินทรีย์	หมายเลขตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
ความเข้มข้นอะซิโตน	1.000	3	2.30410	0.776193	0.448135
	2.000	3	0.77973	1.115467	0.644015
	3.000	3	1.55404	0.711736	0.410921
	4.000	3	1.74966	0.821732	0.474427
	5.000	3	2.02680	1.525690	0.880858
	6.000	3	0.92001	0.398394	0.230013
	7.000	3	0.94956	0.294630	0.170105
	8.000	3	0.38619	0.291192	0.168120
	9.000	3	0.92125	0.004432	0.002559
	10.000	3	0.61599	0.101763	0.058753
	11.000	3	2.55045	0.239019	0.137998
	12.000	3	1.18333	0.590314	0.340818
	Total	36	1.32843	0.898730	0.149788
ความเข้มข้นบิวทานอล	1.000	3	0.02114	0.002151	0.001242
	2.000	3	0.01299	0.001269	0.000732
	3.000	3	0.03371	0.001613	0.000931
	4.000	3	0.02624	0.001590	0.000918
	5.000	3	0.06380	0.041212	0.023794
	6.000	3	0.02210	0.002796	0.001614
	7.000	3	0.76876	0.641051	0.370111
	8.000	3	0.04196	0.033251	0.019197
	9.000	3	0.17135	0.005360	0.003094
	10.000	3	0.15312	0.018474	0.010666
	11.000	3	0.15534	0.003584	0.002069
	12.000	3	0.20767	0.095887	0.055360
	Total	36	0.13985	0.256463	0.042744

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ช.2 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สารอินทรีย์	หมายเลขตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
ความเข้มข้นเอทานอล	1.000	3	8.49670	8.908091	5.143089
	2.000	3	1.43156	1.337412	0.772155
	3.000	3	1.50709	1.200603	0.693168
	4.000	3	1.17429	1.298817	0.749873
	5.000	3	0	0	0
	6.000	3	0.89096	0.312626	0.180495
	7.000	3	0.59764	0.250388	0.144562
	8.000	3	0.33078	0.357081	0.206161
	9.000	3	0.51179	0.106098	0.061256
	10.000	3	0.38151	0.110260	0.063659
	11.000	3	0.49656	0.101570	0.058641
	12.000	3	0.50800	0.305608	0.176443
	Total	36	1.36057	3.130170	0.521695
ความเข้มข้น ABE รวม	1.000	3	10.82198	8.533216	4.926655
	2.000	3	2.22427	2.410806	1.391879
	3.000	3	3.09484	1.910764	1.103180
	4.000	3	2.95019	2.113112	1.220006
	5.000	3	2.09060	1.559049	0.900117
	6.000	3	1.83308	0.707888	0.408699
	7.000	3	2.31596	0.229864	0.132712
	8.000	3	0.75893	0.612108	0.353400
	9.000	3	1.60439	0.104107	0.060106
	10.000	3	1.15061	0.184880	0.106740
	11.000	3	3.20235	0.316450	0.182702
	12.000	3	1.89869	0.967841	0.558783
	Total	36	2.82882	3.420975	0.570163

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ช.3 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในรูปแบบตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความเข้มข้นอะซิโตน	Between Groups	16.065	11	1.460	2.872	.015
	Within Groups	12.205	24	.509		
	Total	28.270	35			
ความเข้มข้นบิวทานอล	Between Groups	1.455	11	.132	3.750	.003
	Within Groups	.847	24	.035		
	Total	2.302	35			
ความเข้มข้นเอทานอล	Between Groups	173.556	11	15.778	2.236	.048
	Within Groups	169.372	24	7.057		
	Total	342.929	35			
ความเข้มข้น ABE รวม	Between Groups	227.237	11	20.658	2.719	.020
	Within Groups	182.370	24	7.599		
	Total	409.608	35			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ช.4 (ก) ความเข้มข้นของอะซิโตนเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
8.000	3	0.38619			
10.000	3	0.61599			
2.000	3	0.77973	0.77973		
6.000	3	0.92001	0.92001		
9.000	3	0.92125	0.92125		
7.000	3	0.94956	0.94956		
12.000	3	1.18333	1.18333	1.18333	
3.000	3	1.55404	1.55404	1.55404	1.55404
4.000	3	1.74966	1.74966	1.74966	1.74966
5.000	3		2.02680	2.02680	2.02680
1.000	3			2.30410	2.30410
11.000	3				2.55045
Sig.		0.054	0.075	0.096	0.137

ตาราง ช.4 (ข) ความเข้มข้นของบิวทานอลเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.000	3	0.01299	
1.000	3	0.02114	
6.000	3	0.02210	
4.000	3	0.02624	
3.000	3	0.03371	
8.000	3	0.04196	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ช.4 (ข) (ต่อ) ความเข้มข้นของบิวทานอลเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5.000	3	0.06380	
10.000	3	0.15312	
11.000	3	0.15534	
9.000	3	0.17135	
12.000	3	0.20767	
7.000	3		0.76876
Sig.		0.286	1.000

ตาราง ช.4 (ค) ความเข้มข้นของเอทานอลเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5.000	3	0.00000	
8.000	3	0.33078	
10.000	3	0.38151	
11.000	3	0.49656	
12.000	3	0.50800	
9.000	3	0.51179	
7.000	3	0.59764	
6.000	3	0.89096	
4.000	3	1.17429	
2.000	3	1.43156	
3.000	3	1.50709	
1.000	3		8.49670
Sig.		0.554	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ช.4 (ง) ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมเมื่อวิเคราะห์แบบ Duncan

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
8.000	3	0.75893	
10.000	3	1.15061	
9.000	3	1.60439	
6.000	3	1.83308	
12.000	3	1.89869	
5.000	3	2.09060	
2.000	3	2.22427	
7.000	3	2.31596	
4.000	3	2.95019	
3.000	3	3.09484	
11.000	3	3.20235	
1.000	3		10.82198
Sig.		0.359	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้