

กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ  
กระทรวงพาณิชย์

REGULATION ON LABEL, LOGO AND TRADE MARKS FROM  
COUNTRY PROTECTING TRADEMARKS

รัตติยา อังมณี  
RATTIYA ONGMALI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ผู้วิจัยได้ทำขึ้นภายใต้การสนับสนุนของ  
สถาบันวิจัยที่สี่แห่งคณะ  
เศรษฐศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

พ.ศ. 2555  
KMUTT-2012-SC-11-016-025

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดแยกแบคทีเรียที่สะสมลิพิดจากน้ำทิ้งของ  
อุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่

**ISOLATION OF LIPID ACCUMULATING BACTERIA FROM  
POULTRY PROCESSING WASTEWATER**



T123716

รัตติยา อ่องมะลิ

RATTIYA ONGMALI

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน...123716  
วัน, เดือน, ปี..23 11 2555



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-SC-M-016-025

**ISOLATION OF LIPID ACCUMULATING BACTERIA FROM  
POULTRY PROCESSING WASTEWATER**

**RATTIYA ONGMALI**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2012  
KMITL-2012-SC-M-016-025**

**COPYRIGHT 2012**

**FACULTY OF SCIENCE**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**คณะวิทยาศาสตร์**  
**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**  
**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดแยกแบคทีเรียที่สะสมไขมันจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่

Isolation of lipid accumulating bacteria from poultry processing wastewater

นักศึกษา

นางสาวรัตติยา อ่องมะลิ

รหัสประจำตัว

51068104

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เคมีสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์ฤกษ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ชลอ	จารุสุทธิรักษ์	
ผศ.ดร.สุวรรณี	จรรยาพูน	
รศ.ดร.ภาวิณี	ชัยประเสริฐ	
ผศ.ดร.สร้อยญา	พันธุ์ฤกษ์	
ผศ.ดร.อุสารัตน์	ถาวรชัยสิทธิ์	

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 24 พฤษภาคม พ.ศ. 2555 เวลา 9.00 – 12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 502 ชั้น 5 อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ 1



คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ศษณี ชนะบริพัฒน์)  
 คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 27 เดือน ๕๖ พ.ศ. ๕๕

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกแบคทีเรียที่สะสมลิพิดจากน้ำทิ้งของ
	อุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่
ชื่อนักศึกษา	นางสาวรัตติยา อ่องมะลิ
รหัสประจำตัว	51068104
ปริญญาวิชา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม
พ.ศ.	2555
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่แห่งหนึ่งในจังหวัดลพบุรี ตัวอย่างน้ำทิ้งที่ใช้ในการคัดแยกทำการเก็บรวบรวมจากบ่อฝังด้วยเทคนิคการเก็บตัวอย่างแบบผสมรวมแต่ละจุดเก็บ ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียด้วยเทคนิค spread plate ร่วมกับ cross streak พบว่าได้โคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียทั้งหมด 12 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ซึ่งเจริญในอาหารเหลว LB มีการสะสมลิพิดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับร้อยละ  $27.20 \pm 0.92$  โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16 เอส ไรโบโซมอลอาร์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย สามารถจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ได้เป็นสกุล *Aeromonas* จึงตั้งชื่อแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 นี้ว่า *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 จากการศึกษาปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าเซลล์ในช่วงต้นของระยะพักตัวมีการสังเคราะห์และสะสมลิพิดได้ในปริมาณสูงสุด เมื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนพบว่าเซลล์มีการเจริญและสะสมลิพิดได้มากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร และฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเซลล์จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.64 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณลิพิดร้อยละ  $16.74 \pm 1.44$  โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร หรือมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญในอาหารที่จำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต แต่มีการเพิ่มปริมาณกลูโคส หรือเพิ่มค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน จะทำให้เซลล์มีปริมาณชีวมวลและมีการสะสมลิพิดได้เพิ่มขึ้น ดังจะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.78 กรัมต่อลิตร และมีการสะสมลิพิดร้อยละ  $18.27 \pm 0.94$  เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 600

**คำสำคัญ** : ลิพิดจากจุลินทรีย์, จุลินทรีย์ผลิตไขมัน, การสะสมลิพิด

Title	Isolation of Lipid Accumulating Bacteria from Poultry Processing Wastewater
Student	Miss Rattiya Ongmali
Student ID	51068104
Degree	Master of Science
Program	Environmental Chemistry
Academic Year	2012
Advisor	Asst.Prof.Dr. Usarat Thawornchaisit
Co-advisor	Asst.Prof.Dr. Saranya Phunpruch

### ABSTRACT

In this research, the isolation of bacteria from a poultry processing wastewater in Lopburi province was conducted. Wastewater samples used as source for bacterial isolation were collected from a polishing pond using integrated sampling technique. Results from bacterial isolation by spread plate and cross streak techniques showed that a total of 12 isolates of single bacterial colonies was obtained, and bacterial isolate R4.4 grown on LB Broth was found to accumulate the highest cellular lipid content of  $27.20 \pm 0.92\%$  of cell dry weight. On the basis of 16S rDNA nucleotide sequence of bacteria, isolate R4.4 was belong to the genus *Aeromonas*. Therefore, the isolate R4.4 was designated as *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4. The study on effect of environmental factors on growth and lipid production from *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 in synthetic wastewater found that cells in the early stationary phase synthesized and accumulated the highest cellular lipid content. When the effect of carbon source and nitrogen source were investigated, it was found that maximum biomass and lipid content was obtained when using glucose or fructose as a carbon source and ammonium sulfate as a nitrogen source. Cultivation of *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 in synthetic wastewater containing 9 g/L of glucose and 0.1 g/L of ammonium sulfate, equivalent to a C/N ratio of 200 yielded biomass of 0.64 g/L and lipid content of  $16.74 \pm 1.44 \%$  (w/w). Cells grown in ammonium sulfate limited medium but increased glucose content or increasing C/N ratio could increase both biomass and lipid production as seen from the increase of dry cell weight to 0.78 g/L and lipid content to  $18.27 \pm 0.94 \%$  when cultivation of *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 in synthetic wastewater with C/N ratio of 600 compared to the C/N value of 200.

**Keywords** : Microbial lipid, Oleaginous microorganisms, Lipid accumulation

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ ที่ให้คอยให้ความรู้ คำแนะนำ ในการทำวิจัยตลอดมา รวมทั้งตรวจสอบวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์ อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา ซึ่งกรุณาสละเวลาให้ความรู้และคอยให้ความช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่าน ไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และ รศ.ดร.ภาวิณี ชัยประเสริฐ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มาลินี ชัยสุภกิจสินธุ์ อาจารย์ประจำสาขาวิชาพอลิเมอร์ ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dryer)

ขอขอบคุณ โรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่ จังหวัดลพบุรี ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องการเก็บตัวอย่างแหล่งน้ำทิ้งเพื่อมาใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในเรื่องการจัดหาสารเคมี และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ น.ส.สุรัตน์ดิพร รัตนะ, นายสามารถ ต่ายขาว และ น.ส.อังคนางค์ โสวจิตสตา กุล รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในสาขาวิชาชีววิทยา และสาขาเคมีทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ทุกคนที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ นายสุรินทร์ นางวันทนา นายนิมิตร และน.ส. ดวงกมล อ่องมะลิ บิดา มารดา น้องชาย และน้องสาวของข้าพเจ้า ที่ให้ความรัก ความเข้าใจ และสนับสนุนส่งเสริม ด้านการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้าโดยตลอดมา

รัตติยา อ่องมะลิ

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับลิปิด.....	4
2.1.1 ประเภทของลิปิด.....	4
2.1.2 กรดไขมัน.....	7
2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย.....	11
2.2.1 หลักการจำแนกแบคทีเรีย.....	12
2.2.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	15
2.2.3 การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	16
2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตไขมัน.....	18
2.4 การสังเคราะห์กรดไขมัน.....	22
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมน้ำมันของจุลินทรีย์.....	24
2.6 การใช้ประโยชน์ของไขมันจากจุลินทรีย์.....	27
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	28
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	32
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	32
3.1.1 อุปกรณ์.....	32

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	33
3.1.3 สารเคมีสำหรับการสกัดลิพิด.....	34
3.1.4 สารเคมีสำหรับการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ.....	34
3.1.5 สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR.....	34
3.1.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ.....	34
3.2 แหล่งที่มาของน้ำทิ้งที่ใช้ในคัดแยกแบคทีเรีย.....	34
3.3 การคัดแยกแบคทีเรีย.....	35
3.4 การเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรีย.....	36
3.5 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้คัดเลือกแบคทีเรียผลิตลิพิด.....	37
3.6 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดปริมาณสูง.....	37
3.7 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.....	38
3.8 การปรับสภาพแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	41
3.9 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นในน้ำเสียสังเคราะห์.....	42
3.10 ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	42
3.11 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	43
3.12 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	44
3.13 ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	44
3.14 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	45

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลงานวิจัยวิจัยและอภิปรายผล.....	46
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่ แช่แข็ง.....	46
4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดแยก ได้.....	47
4.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.....	49
4.4 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียใน น้ำเสียสังเคราะห์.....	52
4.5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	57
4.6 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	61
4.7 ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	64
4.8 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของ แบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	67
บทที่ 5 สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	71
เอกสารอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก.....	79

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันและน้ำมันพืชชนิดต่างๆ.....	7
2.2 สูตรโครงสร้าง จุดหลอมเหลว และจุดเดือดของกรดไขมัน.....	10
2.3 ปริมาณลิพิดของจุลินทรีย์บางสายพันธุ์.....	18
2.4 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับพืชน้ำมัน.....	20
2.5 ร้อยละของผลผลิต (% yield) ของลิพิดที่ได้จากจุลินทรีย์ผลิตไขมันเทียบกับพืชน้ำมัน.....	21
2.6 ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	26
3.1 องค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA.....	40
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA .....	40
3.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน.....	43
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อฝังของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง.....	46
4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn .....	53
ก.1 ตารางแสดงการเปิดสารละลายมาตรฐานกลูโคส.....	81
ข.1 ค่าความหนาแน่นโดยอาศัยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD <sub>600</sub> ) ของสารละลายเซลล์ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ใน LB Broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	85
ข.2 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิพิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน LB Broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	87
ข.3 ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD <sub>600</sub> ) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL- R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	88
ข.4 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	89
ข.5 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ 20.....	90

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข.6	ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD <sub>600</sub> ) และปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์ที่วัดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เป็น เวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำตาเลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....93
ข.7	ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์.....97
ข.8	ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD <sub>600</sub> ) และปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (Total Organic Carbon, TOC) ที่วัดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน.....98
ข.9	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิวคินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน.....100
ข.10	ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD <sub>600</sub> ) และปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์ที่วัดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน.....101
ข.11	ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์.....107
ข.12	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิวคินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน.....108
ข.13	ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD <sub>600</sub> ) และปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์ที่วัดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างกัน.....109
ข.14	ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์.....115
ข.15	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิวคินของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างชนิดกัน.....116
ข.16	ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD <sub>600</sub> ) และปริมาณน้ำตาเลรีดิวซ์ที่วัดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio แตกต่างกัน.....117

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข.17	ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....122
ข.18	น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio แตกต่างกัน.....123
ค.1	ผลของช่วงเวลาต่อการผลิตลิพิดที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....124
ค.2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด.....124
ค.3	การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีค้นแคนส์.....125
ค.4	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตลิพิดที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรม วิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....125
ค.5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด.....126
ค.6	การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีค้นแคนส์.....126
ค.7	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตลิพิด เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ได้จากการ ทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสม ลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....127
ค.8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด.....127
ค.9	การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีค้นแคนส์.....128
ค.10	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตลิพิด เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ได้จากการ ทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสม ลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....128
ค.11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด.....129
ค.12	การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีค้นแคนส์.....129

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค.13 ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการผลิตลิพิด เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	130
ค.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด.....	130
ค.15 การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีคั่นแคณส์.....	131
ค.16 ผลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตลิพิด ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้ โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์.....	131
ค.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด.....	132
ค.18 การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีคั่นแคณส์.....	132

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	มอโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ .....5
2.2	โครงสร้างฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride).....5
2.3	โครงสร้างของไกลโคลิพิด (glycolipid).....6
2.4	โครงสร้างของสฟิงโกซีน (sphingosine).....6
2.5	โครงสร้างของ Capric acid ( $C_9H_{18}COOH$ ).....8
2.6	โครงสร้างของกรด Obtusilic acid ( $C_9H_{17}COOH$ ).....9
2.7	โครงสร้างของ Oleic acid ( $C_{17}H_{33}COOH$ ).....9
2.8	โครงสร้างของ Linoleic acid ( $C_{17}H_{31}COOH$ ).....9
2.9	โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย.....12
2.10	รูปร่างและการเรียงตัวพื้นฐานของแบคทีเรีย.....14
2.11	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....15
3.1	บ่อฝังของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง.....35
3.2	ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง.....35
3.3	เทคนิคการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ cross streak.....36
3.4	การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น.....37
3.5	ลำดับขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rDNA.....38
3.6	QIAprep spin column.....41
4.1	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า.....47
4.2	ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ก) Y1.1, ข) W2.1, W2.2, W2.3 ค) C3.1, C3.2, C3.3 และ ง) R4.1, R4.2, R4.3, R4.4 และ R4.5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth นาน 72 ชั่วโมง.....48
4.3	ปริมาณลิพิดของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ โดยน้ำหนักของเซลล์แห้ง เมื่อ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB Broth นาน 72 ชั่วโมง.....49
4.4	ผลการตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์.....50

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.5	ผลิตผลของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR Product) จากการเพิ่มจำนวนของชิ้น 16S rDNA ของไอโซเลท R4.4.....51
4.6	ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคส 9 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C.....52
4.7	น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ 20 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C ตัวอักษรที่กำกับบนจุดแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple range test (DMRT).....54
4.8	ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคส 9 กรัมต่อลิตร (C/N ratio เท่ากับ 20) บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง.....56
4.9	ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (C/N ratio เท่ากับ 20) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....57
4.10	ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD <sub>600</sub> , ก) และปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (Total Organic Carbon, ข) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน (C/N ratio เท่ากับ 20) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....59
4.11	น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน (C/N ratio เท่ากับ 20) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ตัวอักษรที่กำกับบนจุดแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple range test (DMRT).....60

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12 ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $OD_{600}$ , ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสีย สังกะหรณ์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ และมีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ (C/N ratio เท่ากับ 20).....	61
4.13 ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $OD_{600}$ , ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสีย สังกะหรณ์ที่มีฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ และมีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ (C/N ratio เท่ากับ 20).....	62
4.14 น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ที่เติบโตในน้ำเสียสังกะหรณ์ที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างกัน (C/N ratio เท่ากับ 20) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้กลูโคส (ก) หรือฟรุกโตส (ข) เป็นแหล่งคาร์บอน.....	63
4.15 ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $OD_{600}$ , ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังกะหรณ์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่แตกต่างกัน.....	65
4.16 น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ที่เติบโตเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังกะหรณ์ที่มีแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน และมีการใช้กลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ.....	66
4.17 ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $OD_{600}$ , ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังกะหรณ์ที่มี C/N ratio เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง.....	68
4.18 น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 ที่เติบโตเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังกะหรณ์ที่มีแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสหรือค่า C/N ratio โดยมีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน.....	69

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.1	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar).....89
ข.2	โครมาโตแกรมของชนิดของกรดไขมันจากเซลล์แบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร.....91
ข.3	โครมาโตแกรมของชนิดของกรดไขมันมาตรฐาน (C <sub>9</sub> -C <sub>20</sub> ).....92
ข.4	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar).....97
ข.5	กราฟมาตรฐานของ TOC.....99
ข.6	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar).....107
ข.7	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar).....115
ข.8	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar).....122
ง.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R.4 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่มีการรายงานไว้ใน GenBank.....133

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปริมาณสำรองของน้ำมันดิบที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่สถานการณ์ความต้องการใช้พลังงานมีปริมาณสูงขึ้นตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลกที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงจำพวกฟอสซิล ทำให้การค้นคว้าหาแหล่งพลังงานทดแทนจัดเป็นหัวข้อวิจัยที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย หนึ่งในนั้นคือ เชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuels) โดยเฉพาะไบโอดีเซล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงเหลวจำพวกอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid mono alkyl ester, FFAE) ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของลิวดีนจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอลกับแอลกอฮอล์ในสภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยา โดยลิวดีนจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอลที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้แก่ ปาล์มน้ำมัน สนุ่ดำ และน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว เป็นต้น และจากการที่หลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทยมีความตื่นตัวในเรื่องไบโอดีเซล ส่งผลให้ความต้องการใช้พืชน้ำมัน โดยเฉพาะปาล์มน้ำมันมีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาการแย่งชิงวัตถุดิบระหว่างอุตสาหกรรมน้ำมันเพื่อการบริโภคและอุตสาหกรรมพลังงานทดแทน (Fargione *et al.*, 2008; Demirbas, 2009) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงการใช้พื้นที่การเกษตรและมีผลกระทบทางเศรษฐกิจจากการเพาะปลูกพืชอาหารเป็นการเพาะปลูกพืชน้ำมัน ที่อาจทำให้เกิดภาวะขาดแคลนอาหารในอนาคตก็จัดเป็นอีกหนึ่งปัญหาที่ได้รับการคาดหมายว่าจะเกิดขึ้น (Enweremadu and Mbarawa, 2009; Escobar *et al.*, 2009) จากปัญหาดังกล่าว ทำให้การค้นหาวัตถุดิบอื่นๆ ที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตไบโอดีเซลจึงเป็นหัวข้อวิจัยที่หลายฝ่ายให้ความสนใจ

นอกจากพืชน้ำมันแล้ว ลิวดีนจากจุลินทรีย์จัดเป็นวัตถุดิบทางเลือกประเภทหนึ่งที่มีความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เพราะนอกจากจะมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับน้ำมันพืชแล้ว ยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ตลอดปีไม่ขึ้นกับฤดูกาลและสภาพภูมิอากาศ ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงและพื้นที่น้อยกว่าการปลูกพืช นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการผลิตได้ (Papanikolaou *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009) ปัจจุบันงานวิจัยเรื่องการผลิตลิวดีนจากจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลส่วนใหญ่ศึกษาในสายขนาดเล็ก ยีสต์ และรา ในขณะที่ข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตลิวดีนของแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลมีอยู่อย่างจำกัด อีกทั้งแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบในด้านการเพาะเลี้ยงที่เหนือกว่าจุลินทรีย์อื่น คือ เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงง่าย และยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด (Gouda, Omar and Aouad, 2008) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย

ที่มีศักยภาพในการผลิตลิพิดจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งศึกษาผลของสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตลิพิดจากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง
2. เพื่อศึกษาชนิดและจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้จากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง โดยในขั้นตอนนี้จะแบ่งวิธีการดำเนินงานออกเป็น 3 ขั้นตอนย่อยได้แก่
  - 1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากจุดต่างๆ ของบ่อฝังที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงาน ด้วยวิธีการเก็บแบบผสมรวมแต่ละจุดเก็บ (Integrated sampling)
  - 1.2 คัดแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้โคโลนีเดี่ยวที่เป็นเชื้อที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค spread plate ร่วมกับเทคนิค cross streak
  - 1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้ในปริมาณสูงสุด โดยใช้การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละโคโลนีที่แยกได้ การศึกษาปริมาณการผลิตลิพิดของแบคทีเรียแต่ละโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth และการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในลิพิดที่สกัดได้
2. การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยใช้เทคนิคการศึกษาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ทำการทดลองแบบแบทช์ด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการแปรค่าปัจจัยที่ทำการศึกษาและทำการติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณลิพิดที่ผลิตได้

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้ รวมทั้งทราบชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

2. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้
3. ได้แหล่งวัตถุดิบทางเลือกที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมพลังงานทดแทนได้ต่อไป

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับลิพิด

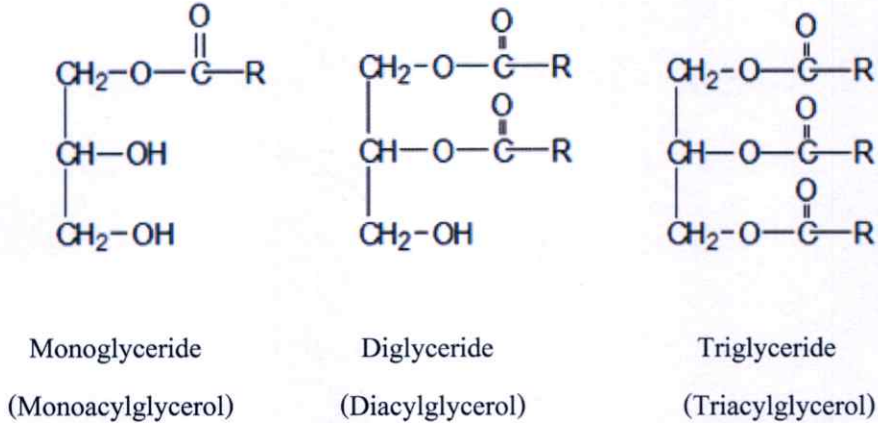
ลิพิด (lipid) จัดเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานสำรองของร่างกาย และเป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ในสิ่งมีชีวิต (ดาวัลย์, 2538) ลิพิดเป็นสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นธาตุหลัก ออกซิเจนมีอยู่ในสัดส่วนที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน ลิพิดบางชนิดอาจมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย สารชีวโมเลกุลประเภทนี้มีคุณสมบัติที่ต่างจากคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนคือ ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) แต่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) อย่างเช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เบนซีน อะซิโตน เอทานอล และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น ดังนั้นในการสกัดแยกลิพิดออกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้

#### 2.1.1 ประเภทของลิพิด

ลิพิดส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ ดังต่อไปนี้ (ดาวัลย์, 2538)

1. ลิพิดอย่างง่าย (Simple lipids) เป็นลิพิดที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับกรดหรือด่างหรือหากเกิดปฏิกิริยาก็จะทำให้อนุพันธ์ของกรดไขมันนั้นเป็นผลผลิตอย่างเดียว หรืออนุพันธ์ของไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลผลิตรวมกัน (มนูเทพ, 2533) ตัวอย่างของ simple lipid ได้แก่ เอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ถ้าแอลกอฮอล์นั้นเป็นกลีเซอรอล เรียกลิพิดนี้ว่า กลีเซอไรด์ (glyceride) หรือเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) ลิพิดชนิดนี้พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อของเซลล์พืช สัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ เอซิลกลีเซอรอล ยังแบ่งออกได้อีก 3 ประเภทตามจำนวน โมเลกุลของกรดไขมันที่ทำปฏิกิริยากับกลีเซอรอลคือ ถ้าหมู่  $-OH$  ของกลีเซอรอลถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันหนึ่ง โมเลกุล จะเรียกว่า โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ถ้าแทนที่ด้วยกรดไขมันสอง โมเลกุลเรียกว่า ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และถ้าถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันสาม โมเลกุลเรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งกลีเซอไรด์อย่างหลังนี้จัดเป็นชนิดของลิพิดอย่างง่ายที่พบมากที่สุด ในธรรมชาติ (รังสิณี, 2550; ภัทรและคณะ, 2551) และถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ในสภาพปกติอาจอยู่ในสถานะของแข็งหรือของเหลว ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ ไตรกลีเซอไรด์ในพืชส่วนใหญ่จะอยู่ในสถานะของเหลว และมีจุดหลอมเหลวต่ำ เนื่องจากมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่เรียก ไตรกลีเซอไรด์ในสภาพของเหลวนี้ว่า น้ำมัน (oil) ส่วนไตรกลีเซอไรด์ในสัตว์จะมีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นส่วนใหญ่

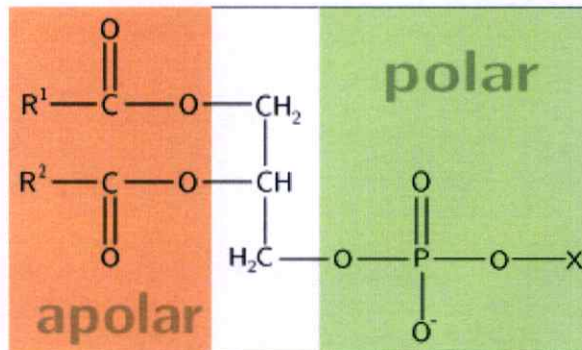
จึงพบในสถานะของแข็งหรือครึ่งแข็งครึ่งเหลวที่อุณหภูมิห้อง เรียกไตรกลีเซอไรด์ในสภาพของแข็งนี้ว่า ไขมัน (fat) ในกรณีที่แอลกอฮอล์ที่สร้างพันธะเอสเทอร์กับกรดไขมันมีขนาดใหญ่กว่ากลีเซอรอลหรือมีโมเลกุลขนาดใหญ่จัดเป็นวงซับซ้อน ลิพิดนั้นจะมีสภาพเป็นของแข็งที่อุณหภูมิและเรียกว่า ไข (wax)



### รูปที่ 2.1 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์

2. ลิพิดประกอบ (Compound lipids) เป็นลิพิดที่ประกอบด้วยเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอลและยังมีสารอื่นเพิ่มเข้ามาในโมเลกุลแบ่งออกเป็น 4 ประเภทตามกลุ่มของสารอื่นที่เพิ่มเข้ามาได้แก่

2.1 ฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) เรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า ฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) เป็นลิพิดที่ประกอบด้วยไขมันธรรมดา รวมอยู่กับฟอสเฟต มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.2 ฟอสโฟลิพิดเป็นชนิดของลิพิดที่พบมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติ รองจากไตรเอซิลกลีเซอรอล (ภัทรและคณะ, 2551) ส่วนใหญ่พบในเยื่อเซลล์ของพืชและสัตว์ เนื้อเยื่อประสาท น้ำเลือด ตัวอย่างของฟอสโฟลิพิดที่สำคัญได้แก่ เลซิทีน (lecithin) เซฟาลิน (cephalin) พลาสมาโลเจน (plasmalogen) เป็นต้น

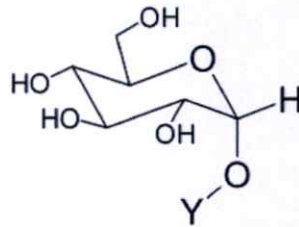


รูปที่ 2.2 โครงสร้างฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride)

2.2 ไกลโคลิพิด (Glycolipid) เป็นลิพิดที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบร่วมอยู่ด้วย ดังรูปที่ 2.3 ไกลโคลิพิดชนิดที่สำคัญคือ เซเรโบไซด์ (cerebroside) จะมีน้ำตาลกลูโคสเป็น

องค์ประกอบ สำหรับตัวที่มีน้ำตาลกาแล็กโทสเป็นองค์ประกอบคือ กาแล็กโทลิพิด (galactolipid) สารทั้งสองชนิดนี้ พบได้ที่เยื่อเซลล์ของเซลล์สมอง และเซลล์ประสาท

### Glycolipids

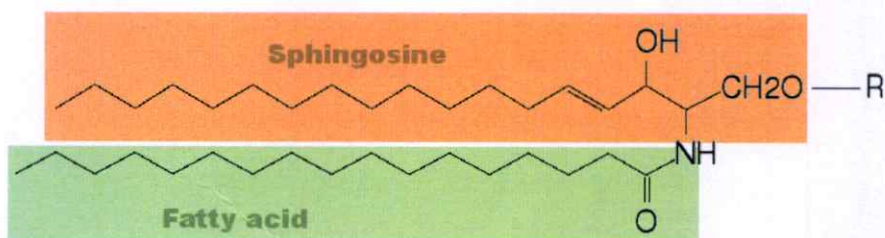


Y = Lipid

รูปที่ 2.3 โครงสร้างไกลโคลิพิด (glycolipid)

2.3 ไลโปโปรตีน (Lipoprotein) เป็นลิพิดที่จับอยู่กับโปรตีนหรือกรดอะมิโนอยู่ในโมเลกุลด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์แต่จับกันด้วย hydrophobic interaction ระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้ว (nonpolar part) ของลิพิด พบอยู่ในน้ำเลือด ทำหน้าที่ขนส่งพวกลิพิดในเลือดไปยังเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย

2.4 สฟิงโกลิพิด (Sphingolipid) เป็นลิพิดที่ประกอบด้วยกรดไขมัน สฟิงโกซีนหรืออนุพันธ์ของสฟิงโกซีน แสดงดังรูปที่ 2.4 พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ทั้งในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อสมองและประสาท ตัวอย่างเช่น สฟิงโกไมเอลิน (sphingomyelin), กาแล็กโทซีรีโบรไซด์ (galactocerebroside) เชื่อกันว่าสฟิงโกลิพิดทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแยกหมู่เลือด (blood group) ของเนื้อเยื่อและการจดจำระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ (cell recognition)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสฟิงโกซีน (sphingosine)

3. อนุพันธ์ของลิพิด (Derived lipids) เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวของลิพิดธรรมชาติและลิพิดประกอบ ซึ่งยังคงคุณสมบัติความเป็นลิพิดอยู่ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ รวมทั้งแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

4. ลิพิดเบ็ดเตล็ด (Miscellaneous lipids) เป็นสารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายลิพิด มักพบอยู่ร่วมกับลิพิดในธรรมชาติและจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดน้ำมันและไขมัน สาร

เหล่านี้ได้แก่ สเตอรอยด์ (steroid), เทอร์ปีน (terpene) และพวกวิตามินที่ละลายในไขมัน เช่น A, D, E, K เป็นต้น

### 2.1.2 กรดไขมัน (Fatty acid)

ลิพิดที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปสารผสม โดยมีไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) หรือไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) เป็นองค์ประกอบหลักสูงถึงร้อยละ 90 โดยปริมาตร (รังสีณี, 2550; กัทรและคณะ, 2551) กรดไขมันจึงจัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันและไขมันเกือบทุกชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.1 นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการกำหนดจุดหลอมเหลวและสถานะของลิพิด หัวข้อนี้จึงทำการทบทวนความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับกรดไขมัน

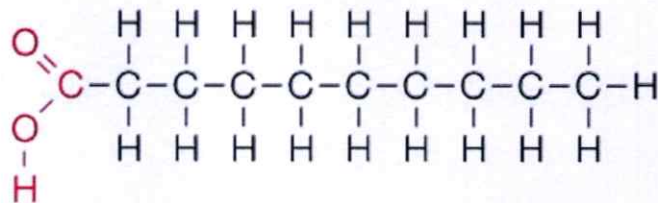
ตารางที่ 2.1 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในไขมันและน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดของลิพิด	ชนิดของกรดไขมัน							
	Myristic acid 14:0	Palmitic acid 16:0	Stearic acid 18:0	Oleic acid 18:1	Linoleic acid 18:2	Linolenic acid 18:3	Arachidic acid 20:0	Erucic acid 22:1
1. ถั่วเหลือง	1-2	6-10	2-5	20-30	50-60	5-11		
2. ข้าวโพด			2-5	19-49	34-62	น้อยมาก		
3. ถั่วลิสง			2-3	50-65	20-30			
4. มะกอก	0-2		2-3	73-84	10-12	น้อยมาก		
5. เมล็ดฝ้าย			1-2	23-35	40-50	น้อยมาก		
6. น้ำมัน (ไลโนเลอิก) ดอกคำฝอย			1.5	8.8	83.8			
7. น้ำมัน (โอเลอิก) ดอกคำฝอย			1.4	74.4	19.7			
8. น้ำมัน (โอเลอิก) เมล็ดพืช			1.3	59.9	21.1	13.2		
9. น้ำมัน (อีรูอิก)			0.8	13.1	14.1	9.7	7.4	50.7
10. เมล็ดพืช	7-10							
11. เนย	1.2		10-13	28-31	1-2.5	0.2-0.5		
12. น้ำมันหมู	3.6		12-18	40-50	7-13	0-1		
13. ไข่			20-25	37-43	2-3			
14. น้ำมันลินซีด			2-4	25-40	35-40	25-60		
15. ไขมันสัตว์สี่เท้า	2.43		12.96	44.32	6.97	0.67		

ที่มา : Linstromberg (1970) อ้างถึงใน Tutunea (2008)

กรดไขมันเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปลายด้านหนึ่งของโซ่คาร์บอนจะมีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) 1 หมู่ มีสูตรทั่วไปคือ  $\text{RCOOH}$  ซึ่ง R หมายถึง หมู่เอซิล (acyl group) โดยทั่วไปแล้วหมู่เอซิลที่พบเป็นพวกอะลิฟาติก แต่สิ่งมีชีวิตบางชนิดสามารถสังเคราะห์กรดไขมันที่มีหมู่เอซิลเป็นอะโรมาติกได้ ตัวอย่างเช่น กรดชาลมูกริก (chaulmoogric acid) (กุสุมา, 2552) กรดไขมันมีอยู่มากกว่า 70 ชนิดในเซลล์ต่างๆ ทั้งที่เป็นกรดไขมันที่มีพันธะเดี่ยวและพันธะคู่ โดยส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 4 ถึง 30 อะตอม (นิสากร, 2545) กรดไขมันแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดตามพันธะคู่ที่มีในหมู่เอซิลดังนี้

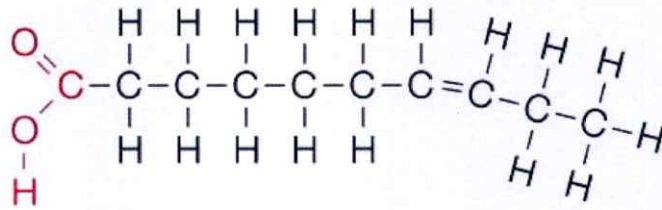
1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันมีหมู่เอซิลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกอัลเคน ซึ่งสายโซ่ของคาร์บอนและไฮโดรเจนอะตอมเชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมด มีสูตรทั่วไปคือ  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{COOH}$  แสดงตัวอย่างโครงสร้างกรดคาพิค (Capric acid) ดังรูปที่ 2.5 กรดไขมันอิ่มตัวมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ระหว่าง 14-24 อะตอม เนื่องจากไม่มีพันธะคู่ในโมเลกุล ดังนั้นการเขียนสัญลักษณ์แสดงชนิดของกรดไขมันจึงระบุเพียงจำนวนคาร์บอนที่พบในโมเลกุล ตัวอย่างเช่นกรดสเตียริกซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม จะเขียนสัญลักษณ์แสดงชนิดกรดเป็น 18:0 (ตารางที่ 2.1) ชนิดของกรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุดคือ กรดปาล์มมิก (palmitic acid) มีคาร์บอน 16 อะตอม ( $\text{C}_{16}$ ) และกรดสเตียริก (stearic acid) มีคาร์บอน 18 อะตอม ( $\text{C}_{18}$ ) (กุสุมา, 2552) กรดไขมันอิ่มตัวที่มีขนาดเล็ก ( $\text{C}_8\text{-C}_{14}$ ) พบในน้ำมันมะพร้าวและสัตว์เคี้ยวเอื้องอื่นๆ ส่วนกรดไขมันขนาดใหญ่ ( $\text{C}_{20}\text{-C}_{28}$ ) พบในเนื้อเยื่อสมอง



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ Capric acid ( $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{COOH}$ )

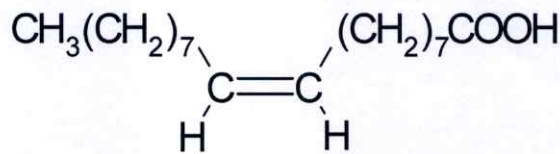
2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีหมู่เอซิลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกอัลคีน ซึ่งสายโซ่ของคาร์บอนจะมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่อย่างน้อย 1 คู่ มีสูตรทั่วไปคือ  $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_2$  ยกตัวอย่างเช่น กรดออปทัสซิลิก (obtusilic acid) แสดงดังรูปที่ 2.6 ในธรรมชาติพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว (ภัทรและคณะ, 2551) ซึ่งชนิดของกรดไขมันที่พบมากที่สุดคือ กรดโอเลอิก (oleic acid) (กุสุมา, 2552) กรดไขมันชนิดที่พบโดยทั่วไปมีจำนวนคาร์บอน 16 ถึง 20 อะตอม การเขียนสัญลักษณ์แสดงชนิดของกรดไขมันจะระบุข้อมูล 2 ส่วน ได้แก่ จำนวนคาร์บอนและจำนวนพันธะคู่ที่พบในโมเลกุล โดยใช้เครื่องหมายโคลอน (:) เป็นตัวแบ่งข้อมูล ตัวอย่างเช่น กรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากที่สุด (กุสุมา, 2552) มีจำนวนอะตอมคาร์บอน 18 อะตอม และมีจำนวนพันธะคู่ 1 แห่งในโมเลกุล จะ

เขียนสัญลักษณ์ แสดงชนิดกรดไขมันเป็น 18:1 (ตารางที่ 2.1) ตามจำนวนพันธะคู่ในโมเลกุล กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยคือ



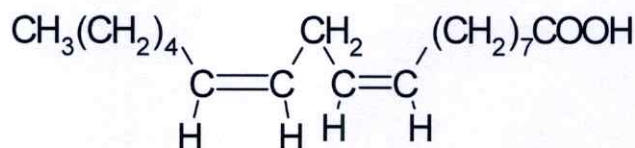
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของกรด Obtusilic acid ( $C_9H_{17}COOH$ )

2.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มี 1 พันธะคู่ (Monounsaturated fatty acid หรือ Monoenoic fatty acid) หรือที่เรียกว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว ตัวอย่างเช่น กรดโอเลอิก (oleic acid) ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่ 1 พันธะ แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ Oleic acid ( $C_{17}H_{33}COOH$ )

2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ (Polyunsaturated fatty acid หรือ Polyenoic fatty acid) หรือที่เรียกว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ในโมเลกุลจะมีไฮโดรเจนลดลง 2 อะตอมทุกๆ พันธะคู่ที่เพิ่มขึ้น และเป็นพันธะคู่ที่ไม่สังยุคกัน (nonconjugated double bond) ได้แก่ กรดลิโนเลอิกมี 2 พันธะคู่ (linoleic acid รูปที่ 2.8) กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) มี 3 พันธะคู่ กรดอะราคิโดนิก (arachidonic acid) มี 4 พันธะคู่ และกรดไอโคซะเพนตะอีนอิก (eicosapentaenoic acid, EPA) มี 5 พันธะคู่ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันจำเป็น โดยแหล่งที่พบจะได้จากน้ำมันปลาและจุลินทรีย์เช่น รา และสาหร่าย (ไพทอร์ย์, 2537)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของ Linoleic acid ( $C_{17}H_{31}COOH$ )

2.3. ไอโคซานอยด์ (Eicosanoid) เป็นอนุพันธ์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ และมีคาร์บอน 20 อะตอม (eicosa = 20 atom) ซึ่งเป็นสารต้นตอ (precursors) ของสารสำคัญต่างๆ ได้แก่ พรอสตาแกรนดิน (prostaglandin), พรอสตาซัยคลิน (prostacyclin) และ thromboxane เป็นต้น

สมบัติทางกายภาพของกรดไขมันสามารถสรุปได้ดังนี้

1. กรดไขมันเมื่ออยู่ในสภาพบริสุทธิ์ จะปราศจากสี กลิ่นและรส (นิศากร, 2545)

2. จุดหลอมเหลวของกรดไขมันขึ้นอยู่กับความยาวของสายโซ่คาร์บอนหรือจำนวนคาร์บอนอะตอมและจำนวนพันธะคู่ (ตารางที่ 2.2) จุดหลอมเหลวของกรดไขมันจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนคาร์บอนอะตอมที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวกับกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากันพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าของกรดไขมันอิ่มตัว สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากันแต่มีพันธะคู่ต่างกันดังกรณีกรดโอเลอิก (18:1) กรดลินอเลอิก (18:2) และกรดลินเลนิก (18:3) พบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าจะมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า

ตารางที่ 2.2 สูตรโครงสร้าง จุดหลอมเหลว และจุดเดือดของกรดไขมัน

กรดไขมัน	จำนวนคาร์บอนและพันธะคู่ในโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	จุดหลอมเหลว (°C)	จุดเดือด (°C)
Caprylic	C8:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	16.5	239
Capric	C10:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	31.3	269
Lauric	C12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	43.6	304
Myristic	C14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	58	332
Palmitic	C16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	62.9	349
Palmitoleic	C16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	33	n.a.
Stearic	C18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69.9	n.a.
Oleic	C18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16.3	n.a.
Linoleic	C18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-5	n.a.
Linolenic	C18:3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-11	n.a.
Arachidic	C20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	75.2	n.a.
Eicosenoic	C20:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}_{29}\text{COOH}$	23	n.a.
Behenic	C22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	80	n.a.

ที่มา : n.a. = not available

ที่มา : ศิริลักษณ์, 2550 อ้างอิงในเกษระวี, อนุพร และสุทธิมา (2550)

3. การละลาย เนื่องจากโครงสร้างของกรดไขมันสามารถแบ่งกรดไขมันออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลายน้ำได้เรียกส่วนนี้ว่า โพลาร์ (polar) ได้แก่ บริเวณหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) และส่วนที่ไม่ละลายน้ำเรียกว่า นอนโพลาร์ (non polar) ได้แก่ ส่วนสายที่เป็นไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นยิ่งสายโซ่ยาวขึ้น ความมีขั้วของกรดไขมันมีลดลง ส่งผลให้ละลายน้ำได้น้อยลง โดยไขมัน

ส่วนใหญ่ละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายเลย แต่ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ที่ร้อนและละลายได้ดีในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น (นิศากร, 2545)

4. กรดไขมันซึ่งมีพันธะคู่จะมีไอโซเมอร์ (isomer) แบบซิส (cis-) และทรานส์ (trans-) ที่มีจุดหลอมเหลวและสมบัติทางกายภาพอื่นๆ ที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 18 อะตอม และมีพันธะคู่ 1 คู่ จะมี 2 ชนิดคือ กรดโอเลอิก (oleic acid) ที่มีการจัดเรียงโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบ cis และกรดอีเลดิก (eladic acid) ที่จัดเป็นไอโซเมอร์แบบทรานส์โดยโครงสร้างแบบทรานส์มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า

### สมบัติทางเคมีของกรดไขมัน

กรดไขมันสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ที่ตำแหน่งของหมู่ COOH และหมู่เอซิล ดังนั้นเราอาจจำแนกประเภทของคุณสมบัติทางเคมีของกรดไขมันอิสระตามตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้

1. ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (Hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ในสภาวะกรดกับเบส เมื่อทำการไฮโดรลิซิสไขมันหรือน้ำมันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน 3 โมเลกุล ในการย่อยพวกไขมันก็จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเช่นเดียวกัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปส (lipase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของกรดไขมัน (deteriorate)

2. ปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) เป็นปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมันตรงตำแหน่งคาร์บอกซิล

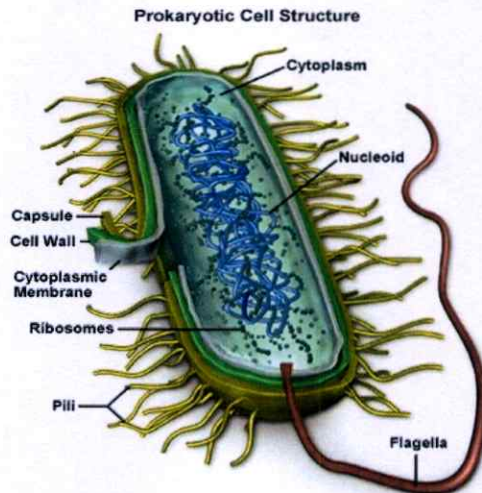
3. ปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) เป็นปฏิกิริยาเติมไฮโดรเจนที่พันธะคู่ของกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยใช้โลหะบางชนิดเช่น แพลทินัม (Pt), พาราเดียม (Pd), นิกเกิล (Ni) หรือทองแดง (Cu) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมทำเนยเทียม

4. ปฏิกิริยาการเติมฮาโลเจน (Halogenation) พันธะคู่ที่อยู่ในไขมันหรือน้ำมันชนิดไม่อิ่มตัวเกิดปฏิกิริยากับเติมสารพวกฮาโลเจน (halogen) เช่น คลอรีน ไอโอดีน และโบรมีนเติมเข้าไปตรงตำแหน่งของพันธะคู่ของกรดไขมัน

## 2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถพบได้ทั่วไปไม่ว่าจะเป็นในแหล่งน้ำ ในดิน และในอากาศ หรือแม้แต่ในร่างกายมนุษย์และสัตว์ แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มโพรคาริโอต (prokaryote) นั่นคือ ในเซลล์จะประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และไซโทพลาสซึม (cytoplasm) โดยในไซโทพลาสซึมจะมีไรโบโซม (ribosome) แต่ไม่มีนิวเคลียส ส่วน DNA จะเป็นรูปวงแหวนพันอยู่กับโปรตีนอยู่ในไซโทพลาสซึมเรียกว่า นิวคลีโอออยด์ (nucleoid) ดังรูปที่ 2.9 ภายนอกของเยื่อหุ้มเซลล์จะมีผนังเซลล์ (cell wall) ล้อมรอบเซลล์ไว้ทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้และ

ป้องกันเซลล์แตกอันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงดันออสโมติกระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตต่อไปได้ (นงลักษณ์, 2544) ความแข็งแรงของผนังเซลล์เกิดจากสารจำพวกเปปทิโดไกลแคน (นงลักษณ์, 2544) แบคทีเรียแกรมลบจะมีเยื่อหุ้มด้านนอกผนังเซลล์ (outer membrane) อีกชั้น แต่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี ทำให้เยื่อเมมเบรนต่างกัน (วิกิพีเดีย, 2553) องค์ประกอบของเซลล์อื่นๆ อย่างเช่น แคปซูล (capsule) แฟลเจลลา (flagella) พิลิ (pili) หรือพิมเบรีย (fimbriae) เป็นโครงสร้างที่พบในแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย  
ที่มา : Food Wiki (2011)

### 2.2.1 หลักการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้ตามลักษณะทางสรีรวิทยาของเซลล์ที่ตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสามารถจำแนกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ โดยเทคนิคทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ หัวข้อนี้จะทำการทบทวนความรู้เกี่ยวกับการจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไป

#### 1. การจำแนกตามลักษณะทางจุลภาค (Microscopic characteristic)

ลักษณะทางจุลภาค หมายถึงลักษณะของเซลล์แบคทีเรียที่ไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นอุปกรณ์ช่วยในการจำแนก ตัวอย่างของลักษณะทางจุลภาคที่นิยมตรวจสอบได้แก่ ลักษณะการติดสีแกรม ขนาด รูปร่างเซลล์ และการเรียงตัวของเซลล์

##### 1.1 การย้อมสีแกรม (Gram's stain)

การย้อมสีแกรมจัดเป็นวิธีมาตรฐานในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียตามลักษณะทางจุลภาค (ศุภยางค์, 2547) การย้อมสีแกรมทำได้หลังจากตรึงเซลล์ของแบคทีเรียบนแผ่นสไลด์แก้ว และย้อมด้วยสี Crystal violet ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน ตามด้วยการย้อมด้วยสี Gram iodine ซึ่งช่วยในการ

คงสี crystal violet ไว้ภายในเซลล์ เรียกลี Gram iodine นี้ว่า สารคงสี (modant) จากนั้นทำการล้างสีออก (decolorization) ด้วยแอลกอฮอล์ และตามด้วยการย้อมสี safranin ซึ่งมีสีแดง ลักษณะที่เห็นได้จากการติดสีแกรมถูกนำมาใช้จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มคือ

ก. แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) หมายถึง เชื้อที่สามารถคงสี Crystal violet ไว้ภายในเซลล์โดยไม่ถูกล้างออกในขั้นตอนการล้างสี ทำให้เซลล์ติดสีม่วงน้ำเงิน

ข. แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) หมายถึงเชื้อที่ไม่สามารถคงสี Crystal violet ไว้ภายในเซลล์ ทำให้สีถูกล้างออกในขั้นตอนการล้างสีเซลล์จึงติดสีแดงของสี Safranin

## 1.2 ขนาดและรูปร่างเซลล์

แบคทีเรียต่างชนิดกันก็จะมีขนาดของเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นขนาดของเซลล์ถูกนำมาใช้ในการจำแนกบอกลักษณะของเซลล์ที่สนใจได้ เซลล์ของแบคทีเรียโดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 1.2 ไมครอน (ภัทรชัย, 2549)

นอกจากการบอกข้อมูลในเรื่องขนาดของเซลล์ แบคทีเรียสามารถจำแนกออกเป็นประเภทได้ 3 กลุ่มตามรูปร่างของเซลล์ รูปที่ 2.10

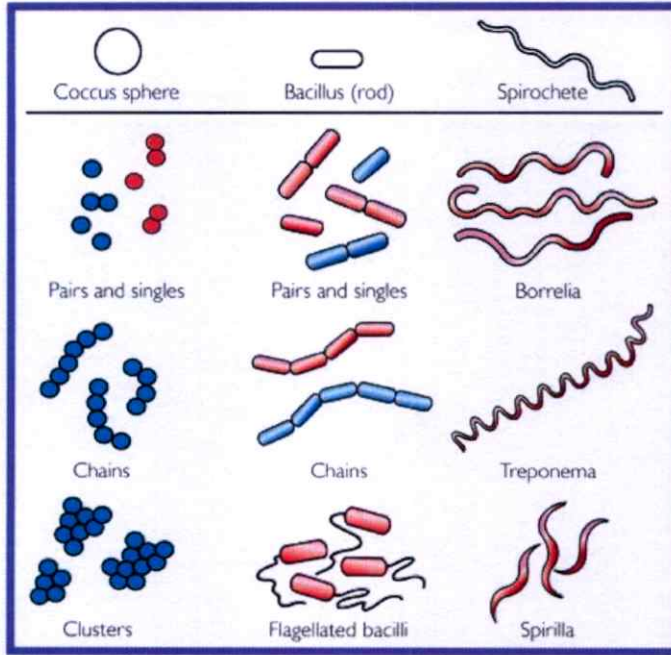
ก. เซลล์รูปกลม เรียกว่า coccus หรือ cocci การเรียงตัวของเซลล์อาจพบเป็นแบบเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ (pairs) ต่อกันเป็นสายโซ่ (chains) หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (clusters) ดังรูปที่ 2.10 ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีรูปร่างเซลล์เป็นแบบกลมได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus*, *Streptococcus* และ *Enterococcus* เป็นต้น

ข. เซลล์รูปแท่ง เรียกว่า rod, bacillus หรือ bacilli การเรียงตัวของเซลล์อาจพบเป็นแบบเซลล์เดี่ยว (singles) เซลล์คู่ (Pairs) ต่อกันเป็นสายโซ่ (chains) หรือมีแฟลกเจลลาเป็นส่วนประกอบ (รูปที่ 2.10) ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีรูปร่างเซลล์เป็นแบบแท่งได้แก่ เชื้อ *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

ค. เซลล์รูปเกลียว เรียกว่า spiral การเรียงตัวของเซลล์อาจพบเป็นแบบเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีรูปร่างเซลล์เป็นแบบเกลียวได้แก่ เชื้อในกลุ่ม spirochete เซลล์มีรูปร่างพอมและเป็นหยักหรือเกลียว

## 1.3. การเรียงตัวของเซลล์

เชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว (single) ลักษณะการเรียงตัวที่จำเพาะบางอย่างเช่น การเรียงตัวเป็นคู่ (pairs), สาย (chain) และกลุ่ม (cluster) ดังแสดงในรูปที่ 2.10 มีส่วนสำคัญในการจำแนกเชื้อ ตัวอย่างเช่น *Streptococcus* เป็นเชื้อแกรมบวกรูปกลมเรียงตัวเป็นสาย เชื้อ *Staphylococcus* เป็นเชื้อแกรมบวกรูปกลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม เป็นต้น (ภัทรชัย, 2549)



รูปที่ 2.10 รูปร่างและการเรียงตัวพื้นฐานของแบคทีเรีย (ภัทรชัย, 2549)

## 2. การจำแนกตามลักษณะทางมหภาค (Macroscopic characteristic)

การจำแนกแบคทีเรียตามลักษณะทางมหภาค คือการจำแนกด้วยลักษณะที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยทั่วไปจะดูจากลักษณะโคโลนีของกลุ่มเชื้อที่เจริญเติบโตบนอาหารที่เพาะเลี้ยงชนิดวุ้นแข็ง (solid agar) โดยพิจารณาจากขนาด รูปร่าง ความหนูน ผิวหน้า (ผิวมันหรือผิวด้าน) ขอบ (เรียบหรือขรุขระ) เนื้อโคโลนี (แห้งหรือมูก) ความขุ่น (ขุ่นหรือใส) สี (เช่น ขาว เทา หรือเหลือง) การสร้างเม็ดสี การสร้างสารหรือก๊าซหลังออกมาภายนอก และความสามารถของเชื้อในการสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) บริเวณรอบโคโลนีบนวุ้นเพาะเชื้อที่ผสมเม็ดเลือดแดง เป็นต้น

## 3. การจำแนกตามลักษณะทางชีวเคมี

ลักษณะทางชีวเคมีเป็นการศึกษาลักษณะการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ รวมถึงการตรวจหาผลผลิตที่เกิดขึ้นจากขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์หรือสารคัดหลั่งที่เซลล์สร้างขึ้น ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีนี้จะแสดงคุณสมบัติสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับจิ้นสและสปีชีส์ได้แบบคร่าวๆ มักจะเรียกการตรวจสอบแบบลักษณะทางเคมีนี้ว่า Biochemical test โดยจะมีหลากหลายวิธีที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งวิธีการทดสอบมักจะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง ยกตัวอย่างเช่น *E. coli* เป็นเชื้อแกรมลบ รูปร่างท่อน โดยจะมีการทดสอบ oxidase tests เพื่อดูความสามารถในการผลิตเอนไซม์ oxidase การทดสอบ TSI tests เพื่อดูการใช้น้ำตาลของเชื้อ เป็นต้น (ดรุณ และทิมัมพร, 2547)

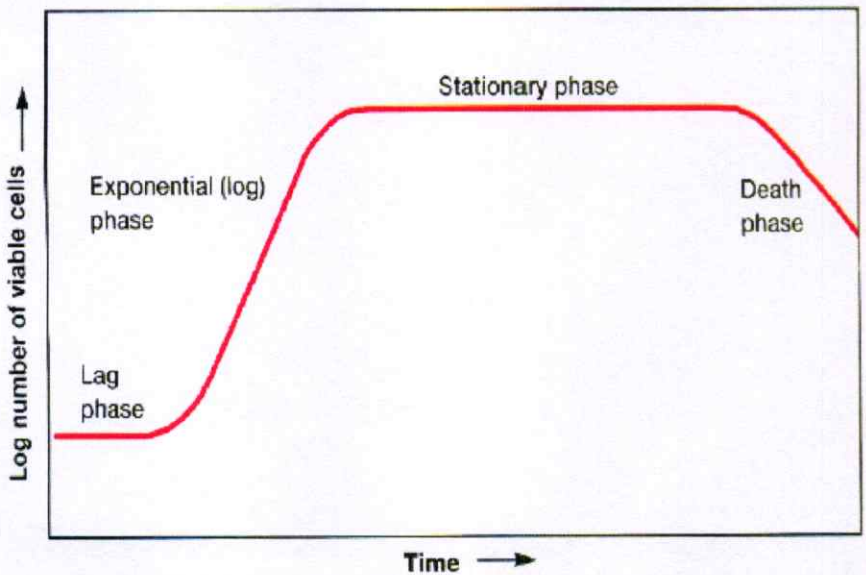
## 4. การจำแนกด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การจำแนกแบคทีเรียด้วยเทคนิควิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นการจัดจำแนกเชื้อแบบยืนยันความถูกต้องในระดับจิ้นสและสปีชีส์ของเชื้อที่เราสนใจ โดยจะต้องนำเชื้อที่สนใจไปทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอที่สกัดได้จะถูกนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์และทำ sequencing เพื่อหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน 16S rDNA ของจุลินทรีย์ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน โดยโปรแกรม BLASTn

2.2.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีการเจริญด้วยการขยายขนาดของเซลล์จนถึงระดับหนึ่ง จึงเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งตัวจากเซลล์แม่หนึ่งเซลล์ออกเป็นเซลล์ลูกสองเซลล์ หรือที่เรียกว่า binary fission โดยเซลล์ลูกทั้งสองประกอบด้วยโครงสร้างทางพันธุกรรมและส่วนประกอบของเซลล์ที่เหมือนกันทุกประการ และสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนต่อไป ระยะเวลาในวงจรชีวิตการเจริญของเซลล์แบคทีเรียตั้งแต่ถือกำเนิดขึ้นจากการแบ่งตัวของเซลล์แม่จนกระทั่งแบ่งตัวได้เซลล์ลูกเรียกว่า ระยะเวลาแบ่งตัว (generation time หรือ doubling time) แบคทีเรียแต่ละชนิดอาจมีระยะเวลาแบ่งตัวที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับสภาพแวดล้อม (เสาวนีย์, 2547) เชื้อต่างชนิดอาจมีระยะเวลาแบ่งตัวแตกต่างกันตั้งแต่ 20 นาที จนกระทั่งมากถึง 24 ชั่วโมง หรือเชื้อชนิดเดียวกันอาจมีระยะเวลาเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเจริญอยู่ในสภาพอุณหภูมิหรือความสมบูรณ์ของแหล่งอาหารแตกต่างกัน อัตราการเจริญเติบโตจึงขึ้นอยู่กับระยะเวลาแบ่งตัวของเชื้อที่สนใจ โดยเชื้อที่มีระยะเวลาแบ่งตัวสั้นมีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วจนแม้แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาแบ่งตัวที่ไม่เท่ากัน แต่พบว่าลักษณะแบบแผนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน โดยการเจริญของแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะแสดงได้ด้วยกราฟการเจริญ (growth curve) ดังในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (เสาวนีย์, 2547)

จากรูปที่ 2.11 พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่

1. ระยะเตรียมการ (Lag phase) คือ ช่วงเริ่มต้นนับจากเมื่อเริ่มลงเชื้อแบคทีเรีย (inoculate) ในอาหารใหม่เป็นต้นไป ซึ่งในช่วงนี้ยังไม่เห็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างชัดเจน โดยทั่วไปจะเป็นช่วงเวลาที่เซลล์ต้องการเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ และเมื่อปรับได้แล้วจึงมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น ช่วงนี้จบลงเมื่อเริ่มเห็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ระยะเวลาของช่วงนี้อาจสั้นยาวต่างกัน ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของอาหาร หรือสภาวะแวดล้อม เป็นต้น ในบางกรณีอาจไม่พบช่วง Lag phase นี้เลย หากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ (inoculum) และสภาวะที่จะลงเชื้อใหม่มีความใกล้เคียงกัน

2. ระยะเพิ่มจำนวนหรือระยะแบ่งตัว (Exponential หรือ Log phase) เป็นสภาวะที่เซลล์มีการเจริญเติบโต หรือแบ่งเซลล์แบบ binary fission อย่างคงที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีอัตราการเจริญที่คงที่

3. ระยะคงที่ (Stationary phase) หรือในบางครั้งเรียกระยะพักตัว เป็นสภาวะที่การเจริญแบบ exponential ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์หมดลงแล้วคือ หยุดการเจริญเติบโต ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุบางประการเช่น สารอาหารหมด หรือเกิดมีการสร้างสารพิษบางอย่างที่มีผลให้หยุดการเจริญ หรืออาจมีจำนวนเซลล์หนาแน่นมากจนไม่อาจมีที่ว่างให้เซลล์ใหม่ๆ ได้ (lack of biological space) (เสาวนีย์, 2547) ในช่วงเวลานี้หากวัดการเจริญเติบโตของเซลล์จะไม่สามารถแยกได้ว่ามีเซลล์ตายเท่าไร และเซลล์ในจำนวนเท่าใดที่ยังมีการแบ่งตัวอยู่อย่างต่อเนื่อง ช่วงนี้จะไม่เห็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เส้นกราฟจะเบนออกในแนวราบอีกครั้งหนึ่ง และในช่วงนี้เองที่แบคทีเรียบางชนิดอาจมีการสร้างสารที่เรียกว่า secondary metabolites เช่น ยาปฏิชีวนะ หรือแบคทีเรียบางชนิดมีการสร้าง spore เกิดขึ้น (เสาวนีย์, 2547) นอกจากนี้ในแบคทีเรียสะสมน้ำมันอย่างเช่น *Gordonia* sp. DG และ *Rhodococcus opacus* PD630 ก็พบการสะสมลิพิดเกิดขึ้นได้ดีที่สุด เมื่อเซลล์เติบโตในระยะพักตัว (Gouda, Omar and Aouad, 2008)

4. ระยะตาย (Death phase) เป็นช่วงที่ต่อเนื่องจาก stationary phase เซลล์ต่างๆ เริ่มตาย ซึ่งอาจไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงหากวัดการเจริญ โดยยกการนับจำนวนเซลล์ได้กล้องจุลทรรศน์หรือวัดเป็นค่าความขุ่น การที่จะเห็นเส้นกราฟตกลงได้ต้องวัดการเจริญของเซลล์มีชีวิตเท่านั้น โดยการทำได้คือ viable count หรือ plate count

### 2.2.3 การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (เสาวนีย์, 2547)

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียคือ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ วิธีการวัดการเจริญเติบโตทำได้ 2 แบบคือ การวัดมวลของเซลล์หรือการวัดจำนวนเซลล์

การวัดมวลของเซลล์อาจทำได้ทั้งทางตรง และทางอ้อมได้แก่

1. การวัดน้ำหนักของเซลล์ ทั้งในรูปแบบของเซลล์ที่เปียกและแห้ง (wet cell weight and dry cell weight) น้ำหนักเซลล์เปียกคือ ชั่งน้ำหนักเซลล์ที่ได้มาทันทีหลังจากปั่นเซลล์ให้ตก

ตกตะกอนลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ทั้งนี้ต้องทราบปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์อยู่ด้วย เพื่อจะทราบเป็นน้ำหนักเซลล์ต่อหน่วยปริมาตร ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งคือ ต้องนำเซลล์ที่ปั่นตกตะกอนมานั้น มาอบด้วยความร้อนปานกลางประมาณ 60-80 องศาเซลเซียส เพื่อให้ น้ำระเหยออกจากตะกอนให้หมดก่อน จึงนำมาชั่งน้ำหนัก นอกจากการชั่งน้ำหนักแล้ว อาจใช้วิธีวัดปริมาตรของเซลล์ที่ได้หลังจากปั่นตกตะกอนก็ได้

2. การวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้ออันเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้ต้องอาศัยเครื่องมือวัดความเข้มของแสงที่เรียกว่า spectrophotometer วัดออกมาเป็นค่าความหนาแน่นโดยแสง (Optical density, OD) ซึ่งโดยทั่วไปการวัดความขุ่นจะวัดที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm. ซึ่งวิธีนี้หากได้ทำการหาค่ามาตรฐานของแบคทีเรียแต่ละชนิดว่าที่ความขุ่นเท่าใดจะให้จำนวนเซลล์หรือให้น้ำหนักเซลล์เท่าใดไว้แล้ว เมื่อวัดค่าความขุ่นของตัวอย่างได้ค่า OD ออกมา ก็จะคำนวณกลับเป็นค่าจำนวนหรือน้ำหนักเซลล์ได้ด้วย วิธีนี้จะ ได้ผลดีก็ต่อเมื่อมีจำนวนเซลล์ประมาณ  $10^7$  cells/ml. ขึ้นไป

3. การวัดปริมาณสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เช่น ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโปรตีนทั้งหมด หรือปริมาณ DNA ทั้งหมด

4. การวัดปริมาณสารเคมีที่เป็นผลมาจากการเจริญของแบคทีเรียเช่น ปริมาณออกซิเจนที่สร้างขึ้นหรือถูกใช้ไปหรือปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกสร้างขึ้นหรือถูกใช้ไปหรือปริมาณ ATP ที่ถูกสร้างขึ้น เป็นต้น

สำหรับการวัดค่าจำนวนเซลล์นั้นทำได้ทั้งการวัดจำนวนเซลล์ทั้งหมดหรือการวัดจำนวนเฉพาะเซลล์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้ได้แก่

1. การนับจำนวนเซลล์โดยตรงจากใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยหยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์อยู่ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีการแบ่งเป็นตารางเพื่อให้ทราบขอบเขตที่ต้องนับออกมาเป็นจำนวนเซลล์ต่อหน่วยปริมาตรเช่น haemocytometer เป็นต้น วิธีนี้จะใช้ได้ก็ต่อเมื่อมีเซลล์จำนวนไม่น้อยกว่า  $10^7$  cells/ml. ข้อจำกัดของวิธีนี้จะนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ไม่ว่าเซลล์นั้นจะมีชีวิตอยู่หรือตายแล้ว

2. การนับจำนวนเซลล์เฉพาะที่ยังมีชีวิตอยู่ ทำโดยการนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ที่ต้องการมาตรวจนับมาเกลี่ย (spread technique) ให้กระจายบนผิวหน้าอาหารที่เป็นวุ้นแข็ง (solid หรือ agar medium) นำไปบ่มที่อุณหภูมิพอเหมาะกับการเจริญของเชื้อประมาณ 24 ชั่วโมง เชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่จะโตบนอาหารวุ้นนั้น เกิดเป็นโคโลนี (colony) ของแบคทีเรียซึ่งจะมีลักษณะจำเพาะ นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นได้จากการเกลี่ยบนอาหาร ก็จะทราบจำนวนเซลล์ต่อหน่วยปริมาตรได้ ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ หากมีมากกว่า 1 เซลล์ที่โตขึ้นมาในที่เดียวกันจะทำให้การนับจำนวนคลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้แล้วยังนับจำนวนได้เฉพาะเซลล์ที่โตได้ภายใต้สภาวะที่ใช้บ่มอาหารวุ้นเท่านั้น

### 2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตไขมัน (Oleaginous microorganisms)

ไขมันจากจุลินทรีย์จัดเป็นหัวข้อที่มีการศึกษามานาน โดยเฉพาะการนำไปใช้ผลิตทางการค้าในรูปของไขมันหรืออนุพันธ์ของไขมัน เพราะจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็ว และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด (ไพฑูรย์, 2537) จุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่ทั้งยีสต์ รา สาหร่าย และแบคทีเรียสามารถผลิตและสะสมลิพิดไว้ภายในเซลล์ โดยบางชนิดสามารถผลิตและสะสมลิพิดได้มากกว่า 20 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เรียกจุลินทรีย์ดังกล่าวว่า จุลินทรีย์ผลิตไขมัน (Oleaginous microorganisms) (Miao and Wu, 2006; Chisti, 2007; Meng *et al.*, 2009)

ลิพิดที่สะสมโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerols, TAGs) นอกจากนี้สามารถพบได้ในรูปไข (waxes) และ โพลีเอสเตอร์ (polyesters) (Ratledge and Wynn, 2002) ซึ่งจะมีปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันแตกต่างกันขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2.3 และ 2.4) ลิพิดในจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ รา และสาหร่าย ส่วนมากแขวนลอยอยู่ในไซโทพลาสซึมในรูปหยดน้ำมัน ในขณะที่ลิพิดในแบคทีเรียจะสะสมไว้ที่ cell envelope (มณฑุเทพ, 2533) การสะสมลิพิดในเซลล์จุลินทรีย์เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนอยู่อย่างจำกัด และมีแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่มากเกินไป (Miao and Wu, 2006; Ratledge and Wynn, 2002) การขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสร้างสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และทำให้เซลล์เติบโตได้ช้าลงหรือหยุดการเจริญเติบโต (Ratledge and Wynn, 2002) การสลายตัวของแหล่งคาร์บอนจะทำให้เกิดการสะสม NADPH ซึ่งจะถูกผลักดันให้เซลล์เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ลิพิดมากขึ้น (มณฑุเทพ, 2533; Yamane *et al.*, 1997 and Johnson and Schroeder, 1996 อ้างคำในรัตนภรณ์, 2551)

**ตารางที่ 2.3** ปริมาณลิพิดของจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ (มณฑุเทพ, 2533; Alvarez and steinbüchel, 2002; Meng *et al.*, 2008)

ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการเลี้ยง	แหล่งคาร์บอนที่ใช้	ปริมาณลิพิด (Lipid content % w/w)
<b>แบคทีเรีย (Bacteria)</b>			
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	shake	gluconate	52.2
<i>Rhodococcus ruber</i>	shake	glucose	35.0
<i>Arthobacter</i> sp.	n.a.	n.a.	40
<i>ACP netobacter calcoaceticus</i>	n.a.	n.a.	27.28
<i>Streptomyces albus</i>	n.a.	glucose	2.2
<i>Streptomyces coelicolor</i>	n.a.	glucose	3.8
<i>Streptomyces griseus</i>	n.a.	glucose	2.8
<i>Streptomyces lividans</i>	n.a.	glucose	4.6

## ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการเลี้ยง	แหล่งคาร์บอน ที่ใช้	ปริมาณลิปิด (Lipid content % w/w)
<b>ยีสต์ (Yeast)</b>			
<i>Candida curvata</i> D	fermenter	whey	50.0
<i>Candida lipolytica</i>	shake	glucose	36.0
<i>Candida paralipotica</i>	shake	glucose	32.0
<i>Cryptococcus terricolus</i>	shake and fermenter	glucose	55.0-65.0
<i>Lipomyces lipofer</i> IF00673	shake	glucose	63.5
<i>Lipomyces lipofer</i> CBS 944	shake	glucose	37.0
<i>Lipomyces lipofer</i> 199	shake	peatoxide	44.0
<i>Lipomyces starkeyi</i>	static	glucose	63.0
<i>Lipomyces starkeyi</i> IF00678	shake	glucose	43.0
<i>Lipomyces starkeyi</i>	fermenter	glucose	37.0
<i>Lipomyces starkeyi</i> IAM4753	shake	glucose	15.0
<i>Lipomyces tetrasporus</i> sp.	shake	glucose/urea	16.0-64.0
<i>Lipomyces</i> sp. No. 33	shake	glucose	67.0
<i>Lipomyces</i> sp. No. 33	shake	xylose	48.0
<i>Lipomyces</i> sp. No. 33	shake	wastes and molasses	66.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	shake and fermenter	molasses	40.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	fermenter	glucose	57.0-64.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	fermenter	com sugar	48.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	fermenter	ethanol	62.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	fermenter	alkanes	32.0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	shake	glucose	49.0-71.0
<i>Trichosporon cutaneum</i>	fermenter	glucose	45
<b>รา (Fungi)</b>			
<i>Aspergillus flavus</i>	static	glucose	28.0
<i>Aspergillus minutus</i>	static	glucose	35.0
<i>Aspergillus nidulans</i>	static	glucose	27.0-51.0
<i>Aspergillus terreus</i>	static	sucrose	51.0-57.0
<i>Chaetomium globosum</i>	static	lactose	54.0
<i>Fusarium</i> sp.	shake	whey	30.0-39.0
<i>Cunning hamella</i> sp.	shake	glucose	45.0-56.0
<i>Mocor circinelloides</i>	shake and static	glucose	45.0-65.0
<i>Mortierella vinacea</i>	shake	various carbon sources	25.0-66.0

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการเลี้ยง	แหล่งคาร์บอนที่ใช้	ปริมาณลิปิด (Lipid content % w/w)
<b>สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae)</b>			
<i>Botryococcus braunii</i>	n.a.	n.a.	25.0-75.0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	n.a.	n.a.	27.0
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	n.a.	n.a.	28.0
<i>Chlorella vulgaris</i>	n.a.	n.a.	30.0
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	n.a.	n.a.	72.0
<i>Chlorosarcinopsis negevinsis</i>	n.a.	n.a.	32.0
<i>Nizschia sp.</i>	n.a.	n.a.	45.0-47.0
<i>Schizochytrium sp.</i>	n.a.	n.a.	50.0-77.0
<i>Scenedesrus sp. 3</i>	n.a.	n.a.	25.0

n.a. = not available

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับน้ำมันจากพืช

แหล่งที่มาของกรดไขมัน	ชนิดของกรดไขมันและ (%) ที่พบในเซลล์					
	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<b>จุลินทรีย์</b>						
แบคทีเรีย <sup>1</sup>						
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	25.70	9.50	3.50	22.0	-	-
<i>Rhodococcus opacus</i> UFA4	47.10	17.80	18.80	6.40	-	-
รา <sup>2</sup>						
<i>Aspergillus nidulans</i>	14.50	-	-	30.80	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	29.50	-	-	52.40	-	-
ยีสต์ <sup>3</sup>						
<i>Rhodotorula glutinis</i>	37	4	7	48	3	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	11	6	1	28	51	1
จูดสาหร่าย <sup>4</sup>						
<i>Codium fernandezianum</i>	29.27	-	0.50	15.14	8.25	16.93
<i>Codium dimorphum</i>	54.49	-	0.24	20.39	2.17	9.83

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

แหล่งที่มาของกรดไขมัน	ชนิดของกรดไขมันและ(%) ที่พบ					
	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<b>น้ำมันพืช</b>						
น้ำมันรำ <sup>5</sup>	16.90	0.20	1.60	39.10	33.40	1.60
น้ำมันถั่วเหลือง <sup>5</sup>	10.30	0.20	3.80	22.80	51.00	6.80
น้ำมันมะพร้าว <sup>5</sup>	8.20	0.20	2.80	2.80	1.80	-
น้ำมันปาล์ม <sup>5</sup>	43.50	0.30	4.30	36.60	9.10	0.20
น้ำมันสบู่ดำ <sup>6</sup>	26.72	0.22	3.67	33.82	13.77	0.40

- ที่มา :
1. Alvarez and Steinbüchel, 2002
  2. Azeem, Neelagund and Rathod, 1999
  3. Li, Du and Liu, 2008
  4. Goecke *et al.*, 2010
  5. ชันวา อ้างอิงในรวิวรรณ, 2542
  6. จักรพงษ์ และคณะ, 2553

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของผลผลิต (% yield) ของลิกนินที่ได้จากจุลินทรีย์ผลิตไขมันเทียบกับพืชน้ำมันดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ร้อยละของผลผลิต (% yield) ของลิกนินที่ได้จากจุลินทรีย์ผลิตไขมันเทียบกับพืชน้ำมัน

แหล่งที่มาของกรดไขมัน	Oil yield (L/ha)	Percent of existing US cropping area <sup>a</sup>
1. Cron	172	846
2. Soybean	446	326
3. Canola	1,190	122
4. Jatropha	1,892	77
5. Coconut	2,689	54
6. Oil palm	5,950	24
7. Microalgae <sup>b</sup>	136,900	1.1
8. Microalgae <sup>c</sup>	58,700	2.5

<sup>a</sup> For meeting 50% of all transport fuel needs of the United States.

<sup>b</sup> 70% oil (by wt) in biomass.

<sup>c</sup> 30% oil (by wt) in biomass.

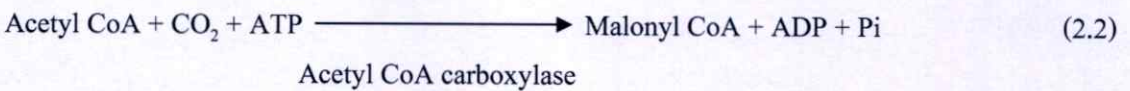
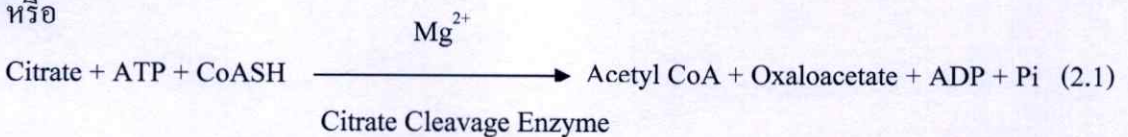
ที่มา : Chisti. Y, 2007

## 2.4 การสังเคราะห์กรดไขมัน

การสังเคราะห์ไขมันส่วนใหญ่เกิดในไซโทพลาสซึม โดยใช้อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl coenzymeA, Acetyl CoA) ซึ่งเกิดจากการออกซิโดซ์ไขมัน กลูโคส และกรดไขมันบางชนิดเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดไขมัน (ไพทอร์ย์, 2537; มนุเทพ, 2553) กลูโคสจะเป็นแหล่งที่มาสำคัญของ Acetyl CoA โดยเริ่มจากการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวท (pyruvate) ในไซโทพลาสซึมด้วยวิถีไกลคอลลีซิส จากนั้นไพรูเวทจะถูกนำเข้าสู่ไมโทคอนเดรียและเปลี่ยนเป็น Acetyl CoA ซึ่งไม่สามารถซึมผ่านผนังของไมโทคอนเดรียออกสู่ไซโทพลาสซึมได้โดยตรงแต่มีวิธีการในการนำเอา Acetyl CoA ออกสู่ไซโทพลาสซึม

i) เกิดปฏิกิริยา deacylation กลายเป็น acetate ซึ่งผ่านออกสู่ไซโทพลาสซึมได้และจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl CoA อีกครั้งโดยเอนไซม์ Acetic thiokinase ซึ่งพบมากในไซโทพลาสซึม (มนุเทพ, 2553)

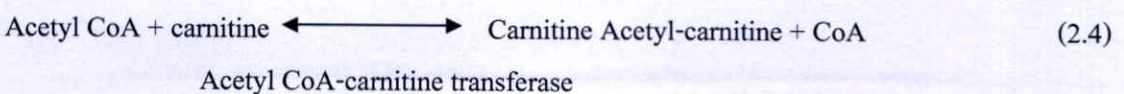
ii) เกิดปฏิกิริยา condensation กับ oxaloacetate ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวัฏจักร Tricarboxylic ภายในไมโทคอนเดรียกลายเป็นซิเตรท (citrate) จากนั้น citrate จึงผ่านออกมาอยู่ในไซโทพลาสซึมและสลายตัวให้ oxaloacetate และ Acetyl CoA โดย oxaloacetate สามารถผ่านกลับเข้าไปในไมโทคอนเดรียได้ ในขณะที่ Acetyl CoA ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันโดยตรงดังสมการ 2.1 (มนุเทพ, 2553) และบางส่วนถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูป Malonyl CoA ดังสมการ 2.2 (ไพทอร์ย์, 2537) หรือ



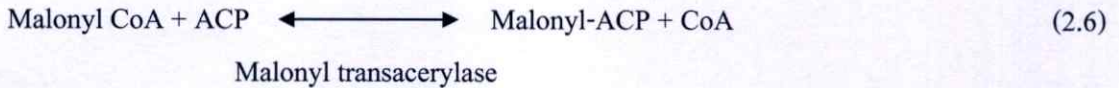
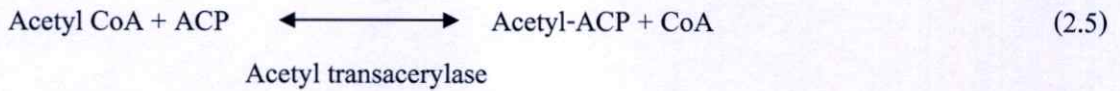
iii) Citrate ซึ่งอาจไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียได้ดีพอ จะถูกเปลี่ยนเป็น  $\alpha$ -ketoglutarate ในวัฏจักร Tricarboxylic และเปลี่ยนเป็น glutamate ในไมโทคอนเดรียดังแสดงในสมการ 2.3 ซึ่ง glutamic acid จะผ่านเข้าไปในไซโทพลาสซึมและเปลี่ยนเป็น oxaloacetate และ Acetyl CoA ในที่สุด (มนุเทพ, 2553)



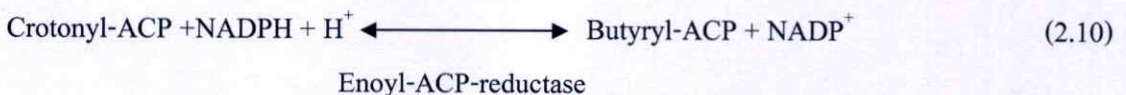
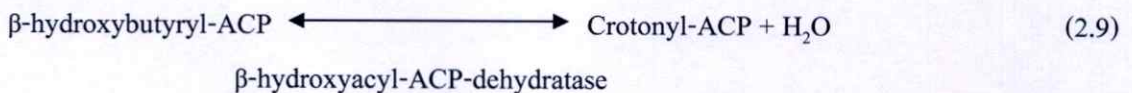
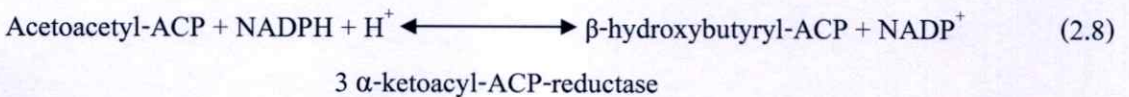
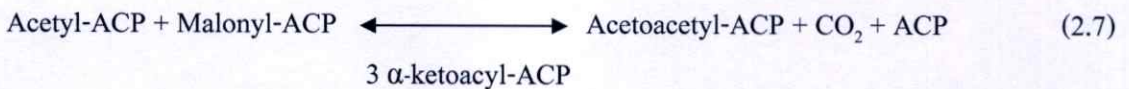
iv) เกิดการรวมตัวคาร์นิทีน (carnitine) ได้เป็น acetyl carnitine ซึ่งซึมผ่านไมโทคอนเดรียแล้วทำปฏิกิริยากับ CoA เปลี่ยนเป็น Acetyl CoA และ carnitine อีกครั้งในไซโทพลาสซึม ดังสมการ 2.4 (มนุเทพ, 2533)



v) การสังเคราะห์กรดไขมันเกิดขึ้นในไซโตพลาซึมใน *Escherichia coli* จะเริ่มจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Acetyl CoA และ Malonyl CoA ที่สร้างขึ้นกับ Acyl carrier protein (ACP) ได้เป็น Acetyl ACP (C<sub>2</sub>) และ Malonyl ACP (C<sub>2</sub>) ดังสมการที่ (2.5) และ (2.6) (Gottschalk, 1985)



จากนั้น Acetyl-ACP จะรวมตัวกับ Malonyl CoA ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายตัวจนได้ butyryl-ACP เป็นผลผลิตดังสมการ (2.7-2.10) (Gottschalk, 1985)



Butyryl-ACP (C<sub>4</sub>) จะเข้าทำปฏิกิริยากับ Malonyl-CoA ปฏิกิริยา (2.7-2.10) จะเกิดขึ้นซ้ำๆ ไป โดยแต่ละครั้งที่รับ Malonyl-CoA ใหม่ 1 ตัวจะได้ Acyl-ACP ที่มีคาร์บอนเพิ่มขึ้นทีละตัวเป็น C<sub>6</sub>propionyl-ACP (C<sub>6</sub>) จนถึง palmitoyl-ACP (C<sub>16</sub>) เอนไซม์ชุดนี้จะหยุดทำงาน palmitoyl-ACP จะถูกย่อยสลาย โดยเอนไซม์ deacylase ได้กรดปาล์มมิติก ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวยาวที่สุดที่จะสร้างได้ ด้วยเอนไซม์กลุ่มนี้ (ไพทอร์ย, 2537) จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันจะเห็นว่าต้องใช้ปริมาณ NADPH เป็นจำนวนมากสำหรับขั้นตอนรีดักชัน ทำให้ในสภาวะที่มีการขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อและทำให้การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกหรือโปรตีนซึ่งเป็นกระบวนการใช้ NADPH ซ้ำลงหรือหยุดไปทำให้ NADPH เกิดการสะสมในเซลล์มากขึ้น และถูกผลักดันไปใช้ในการสร้างกรดไขมันของเซลล์มากขึ้น ทำให้จุลินทรีย์มีการผลิตไขมันเพิ่มขึ้น (มณฑุ, 2533)

## 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดในจุลินทรีย์

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียคือ การเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งนับว่าเป็นการสืบพันธุ์ของแบคทีเรีนั่นเอง โดยปกติแบคทีเรียแต่ละเซลล์จะแบ่งตัวจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ที่เหมือนกัน เรียกว่า binary fission กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นได้จากจะขึ้นกับเชื้อแบคทีเรียที่สนใจแล้ว การเติบโตยังต้องอาศัยสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ด้วย โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และการสะสมน้ำมันของจุลินทรีย์ประกอบด้วยปัจจัยหลายอย่างได้แก่

### 1. ชนิดของสารอาหาร

1.1 แหล่งคาร์บอน คาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญเติบโตแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ อนินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์คาร์บอน โดยอนินทรีย์คาร์บอนที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเติบโตของแบคทีเรียได้แก่ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรึงได้จากอากาศ หรือเกลือคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตที่ละลายน้ำได้ เรียกการเจริญเติบโตแบบที่ใช้อินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานว่า แบบออโตโทรฟิก (autotrophic) นอกจากนี้อนินทรีย์คาร์บอนจุลินทรีย์สามารถใช้คาร์บอนในรูปของสารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างของสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ (ลัดดา, 2540) เรียกการเจริญเติบโตโดยใช้คาร์บอนรูปนี้เป็นแหล่งพลังงานว่า แบบเฮเทอโรโทรโทรฟิก (heterotrophic) แหล่งคาร์บอนไม่เพียงมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ยังมีผลต่อการสะสมลิพิดของ Oleaginous microorganism จากการศึกษาของ Alvarez and Steinbüchel (2002) เมื่อใช้กลูโคสในปริมาณสูงเป็นแหล่งอินทรีย์คาร์บอนและลดปริมาณไนโตรเจนลงทำให้ภายในเซลล์มีปริมาณการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการสะสมลิพิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3 Gouda, Omar and Aouad, (2008) ทำการศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอลของแบคทีเรีย *Gordonia* sp. และ *Rhodococcus opacus* พบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ผลิต TAGs ได้สูงสุดถึง 96% และ 93% โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อใช้กากน้ำตาลย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน TAGs มีปริมาณลดลงเหลือ 57.8% และ 88.9% เมื่อใช้เปลือกส้มเป็นแหล่งคาร์บอน

1.2 แหล่งไนโตรเจน ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ในจุลินทรีย์ที่ขาดไนโตรเจนจะมีการสร้างสารประเภทคาร์บอนเช่น น้ำมันหรือแป้งมาแทน (ลัดดา, 2540) จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งรูปของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร เมื่อเปรียบเทียบชนิดของไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการสะสมลิพิดของ *Rhodococcus opacus* PD630 และ *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 (Alvarez, Kalscheuer and Steinbüchel, 2000) อีกทั้งยังพบว่า

เมื่อทำการลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนลง จะทำให้ประสิทธิภาพในการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Gordonia* sp. และ *R. opacus* เพิ่มขึ้น (Gouda, Omar and Aouad, 2008) ส่วนไนโตรเจนในรูปอินทรีย์สารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ เอไมด์ เอมีน ยูเรีย และ แอสพาจีน เป็นต้น ทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยไนโตรเจนจะทำให้ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้น แต่ในจุลินทรีย์ที่มีปริมาณเซลล์มากจะมีการผลิตและสะสมลิพิดต่ำ จึงจำกัดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการผลิตและสะสมลิพิดสูงขึ้น ยกตัวอย่างเช่น เมื่อใช้สภาวะความเข้มข้นของแอมโมเนียเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร ทำให้ เชื้อ *Rhodococcus opacus* PD630 และ *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 สามารถสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ 75.8% CDW, w/w แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นเป็น 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณการสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลลดลงตามไปด้วย (Alvarez, Kalscheuer and Steinbüchel, 2000)

1.3 แหล่งเกลือแร่ เกลือแร่มีผลต่อการรักษาสมดุลของสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้เป็นปกติ เกลือแร่ยังมีผลต่อการถ่ายเทอิเล็กตรอนในรูปของอ็อกซิเจน เพื่อให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ดำเนินไปได้ จุลินทรีย์บางชนิดต้องการเกลือแร่บางชนิดในการเจริญเติบโต เช่น แบคทีเรียแลคติกต้องการธาตุแมงกานีส เป็นต้น จากการศึกษาความเข้มข้นของแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus braunii* พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแร่ธาตุดังต่อไปนี้คือ ไคไฮโดรเจนโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) เท่ากับ 0.0195 กรัมต่อลิตร, โพแทสเซียมไนเตรท ( $\text{KNO}_3$ ) เท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4$ ) เท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร และเฟอร์ริกซิเตรต ( $\text{Fe.citrate}$ ) เท่ากับ 0.0185 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูงสุด 0.65 กรัมต่อลิตร และผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูงสุด 50.65 % (Dayananda *et al.*, 2005) และยังพบว่าเฟอร์ริกคลอไรด์ มีผลต่อการเจริญและสะสมลิพิดในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เมื่อให้เฟอร์ริกคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น  $1.2 \times 10^{-5}$  โมลต่อลิตร จะให้การเจริญของสาหร่ายสูงสุดและได้ปริมาณลิพิดสูงสุด 56.6 % (Liu, Wang และ Zhou, 2007)

## 2. อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลต่อการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ต่างๆ ในการศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการสะสมไขมันของเชื้อยีสต์ *Trichosporon fermentans* พบว่า เชื้อราชนิดนี้สามารถสะสมลิพิดได้มากขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ C/N จาก 108 เป็น 140 โดยการสะสมลิพิดเกิดได้ดี เมื่อใช้อัตราส่วน C/N เท่ากับ 140 และมีแนวโน้มการสะสมลิพิดลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ C/N จาก 140 เป็น 248

### 3. น้ำ (Water)

มวลของแบคทีเรียที่เรียกว่า 80% เป็นน้ำและในระหว่างการเจริญของเซลล์ทั้งสารอาหารที่เซลล์นำเข้าสู่ภายในและของเสียที่เกิดขึ้นและต้องการปล่อยออกสู่ภายนอกเกิดขึ้นในสภาพของเหลวหรือสารละลาย ดังนั้นแบคทีเรียเจริญได้จะต้องการน้ำในปริมาณมาก แบคทีเรียต่างชนิดกันจะสามารถอดทนต่อการอยู่รอดภายใต้สภาวะที่ขาดน้ำได้ดีไม่เท่ากัน บางชนิดอาจมีกระบวนการพิเศษเกิดขึ้นเพื่อช่วยให้เซลล์ทนต่อความแห้งแล้งนั้นได้

### 4. อุณหภูมิ (Temperature)

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมมีผลทำให้ขบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์สามารถทำงานได้ปกติ และทำให้เซลล์สามารถเจริญแบ่งตัวได้รวดเร็ว เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.6 เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่รวมทั้งเชื้อก่อโรคในคนจัดอยู่ในกลุ่ม mesophile ซึ่งเจริญได้ดีที่ 30-37 องศาเซลเซียส เชื้อในกลุ่ม psychrophile เจริญได้ดีในที่อุณหภูมิต่ำโดยเฉลี่ยประมาณ 15-20 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อในกลุ่ม thermophile เจริญได้ดีในที่อุณหภูมิสูงโดยเฉลี่ยประมาณ 60-90 องศาเซลเซียส เชื้อใน 2 กลุ่มหลังมักเป็นเชื้อที่พบอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีระดับอุณหภูมิต่างไปจากปกติมาก Zhu, Zong and Wu (2008) พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเติบโตและสะสมลิพิดของเชื้อยีสต์ *Trichosporon fermentans* โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตชีวมวลได้สูงสุดถึง 27.5 g/L และได้ปริมาณลิพิดสูงสุด 60.6 % เมื่อมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C

ตารางที่ 2.6 ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	อุณหภูมิต่ำสุด (°C)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	อุณหภูมิสูงสุด (°C)
Psychrophiles	-5 ถึง 5	12-15	15-20
Psychrotrophs	-5 ถึง 5	20-30	30-35
Mesophiles	5-15	30-45	35-47
Thermophiles	40-45	55-75	60-90

### 5. ความเป็นกรดต่าง (pH)

แบคทีเรียทั่วไปเจริญได้ดีที่ pH 7 ซึ่งเป็นกลางและไม่สามารถเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างมากๆ แต่ก็พบว่าแบคทีเรียบางชนิดเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะเป็นกรดมากเรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า Acidophiles ตัวอย่างเช่น *Thermobacillus thiooxidans* เจริญได้ดีที่ pH 2-4 แบคทีเรียจำพวก *Sulfolobus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 1-5 และ *Thermoplasma acidophilum* เจริญเติบโตได้ดีที่ pH 0.8-3.0 จุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง pH สูงกว่า 8 เรียกจุลินทรีย์นี้ว่า Alkalophiles ตัวอย่างเช่น *Thermomicrobium roseum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 8.2-8.5 ซึ่งจะพบในบ่อน้ำพุร้อนและ *Exiguabacterium aurantiacum* พบในน้ำทิ้งจากกระบวนการทำให้มันฝรั่งสุก (potato processing) เป็นต้น แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้จะโตช้ามากหรือไม่โตเลย

ภายใต้ระดับ pH 7 และพบพีเอชมีผลต่อการสะสมลพิษของยีสต์ *Rhotorula glutinis* ในน้ำเสียจากการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) (Xue *et al.*, 2006) พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถสะสมลพิษได้ 10 % และลดค่า COD ได้ถึง 85% เมื่อน้ำเสียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีค่า pH เท่ากับ 5.5 เมื่อ pH ต่ำกว่า 5 เชื้อชนิดนี้จะมีความสามารถในการสะสมลพิษลดลง

## 6. อากาศ (Oxygen)

แบคทีเรียบางชนิดต้องการ oxygen เพื่อการเจริญเติบโตแต่บางชนิดต้องการน้อยหรือไม่ต้องเลย กลุ่มที่จำเป็นต้องมี oxygen เพื่อการเจริญเติบโตเรียกว่า stric หรือ obligate aerobes และพวกที่จำเป็นต้องไม่มี oxygen เลยจึงจะเจริญเติบโตได้เรียกว่า stric หรือ obligate anaerobes ส่วนพวกที่ต้องการ oxygen ในการเจริญเติบโตแต่พอจะเจริญเติบโตได้บ้างแม้จะไม่มี oxygen เรียกว่า facultative aerobes และในทางกลับกับพวกที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มี oxygen แต่เจริญเติบโตได้บ้างในสภาวะที่มี oxygen เรียกว่า facultative anaerobes และในจำพวกที่ต้องการ oxygen แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าระดับปกติในบรรยากาศเรียกว่า microaerphiles ในแบคทีเรียทั้งหมดนี้บางชนิดสามารถเคลื่อนที่เข้าหาหรือออกห่างจาก oxygen ได้เรียกว่า aerotaxis

## 7. ระดับประจุไอออนและแรงดันออสโมติก

เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถทนต่อความแตกต่างในความเข้มข้นของประจุไอออนและแรงดันออสโมติกได้ในระดับสูง เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์สามารถควบคุมสมดุลของระดับประจุไอออนและแรงดันออสโมติกระหว่างภายในและภายนอกเซลล์เช่น การควบคุมสมดุลของโซเดียม ( $\text{Na}^+$ ) โพแทสเซียม ( $\text{K}^+$ ) และไฮโดรเจน ( $\text{H}^+$ ) ซึ่งมีประจุบวก และคลอไรด์ ( $\text{Cl}^-$ ) ซึ่งมีประจุลบ เชื้อกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงเรียกว่า osmophile

## 8. ความเข้มข้นของเกลือ

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือมากน้อยต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้แม้มีอยู่เพียงเล็กน้อย แบคทีเรียบางชนิดต้องการเกลือปริมาณหนึ่งในการเจริญแต่แบคทีเรียบางกลุ่มอาจเจริญได้แม้อยู่ในสภาวะที่มีเกลือมากๆ เราเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า halophilic bacteria เช่นเดียวกับน้ำตาล แม้เกลือจะช่วยแบคทีเรียบางกลุ่มเจริญได้ แต่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมากๆ จะทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย

## 2.6 การใช้ประโยชน์ของไขมันจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ผลิตไขมันสูง (Oleaginous microorganisms) เป็นจุลินทรีย์ที่มีการสะสมไขมันเกินกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้งภายในเซลล์ (Meng *et al.*, 2009) พบว่าลพิษที่สกัดได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ส่วนใหญ่จะพบในด้านของพลังงานทดแทนในรูปของเชื้อเพลิงเหลวไบโอดีเซล ยกตัวอย่างเช่น การผลิตน้ำมันจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก ซึ่งน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ของสาหร่ายที่ได้นี้จะนำไปเป็นวัตถุดิบตั้งต้นของการ

ผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากพบกรดไขมันชนิดสายโซ่ยาวที่มีคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม โดยมีกรดสเตียริก กรดโอเลอิก และกรดปาล์มมิก เป็นองค์ประกอบหลักคล้ายกับน้ำมันจากพืช โดยพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กนี้จะให้ปริมาณการสะสมลิพิดได้สูงถึง 47.8% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (รัตนภรณ์ และงามนิจ, 2553) และยังพบว่าเชื้อ *E. coli* เมื่อนำมาใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมหรือการตัดต่อยีน ผลปรากฏว่าเชื้อ *E. coli* สามารถสะสมกรดไขมันได้มากกว่า 50 % และยังสามารถผลิตกรดไขมันที่จำเพาะต่อการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้อีกด้วย (Lu, Vora and Khosla, 2008)

นอกจากนี้ยังพบประโยชน์ที่หลากหลายจากจุลินทรีย์สะสมน้ำมันยกตัวอย่างเช่น การผลิตไขมันโกโก้ (cocoa butter) จากยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* และ *Cryptococcus curvatus* ซึ่งได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ แต่ต่อมาในภายหลังนิยมเลือกผลิตกรดไขมันชนิดที่มีราคาสูงเช่น ARA, DHA และ EPA ซึ่งกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดเป็นอย่างมาก (พรพจน์, 2549)

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**ยศวดี (2547)** ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล ซึ่งสาหร่ายชนิดนี้จะถูกคัดแยก มาจากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยจะทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Modified Chu 13 และ Kratz and Myers media ซึ่งมีค่าเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.7 ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25 °C และมีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% อัตรา 1 ลิตร/นาที่ ซึ่งมีการแปรค่าความเข้มข้น (3,000, 5,000 และ 10,000 ลักซ์) ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ พบว่าสาหร่ายเติบโตสูงสุดในอาหาร Modified Chu 13 ที่ความเข้มข้น 3,000 ลักซ์ มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.52 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลที่ไม่ปรับสารอาหารในเตรทและน้ำทิ้งที่ปรับปริมาณสารอาหารในเตรท พบว่าสาหร่ายเติบโตสูงสุดในน้ำทิ้งที่มีการปรับปริมาณสารอาหารในเตรท และเมื่อสกัดไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่ายโดยทำการเปรียบเทียบผลของวิธีการทำให้เซลล์แห้งระหว่างการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และวิธี Freeze drying ต่อปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่าย *Botryococcus braunii* พบว่าวิธีการทำให้เซลล์แห้งแบบ Freeze drying จะให้ปริมาณน้ำมันดีกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °C

**รัตนภรณ์ และงามนิจ (2553)** ทำการศึกษาการผลิตน้ำมันจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเฮโทรโทรฟิก เพื่อประโยชน์ในการเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซล โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเป็นเวลา 8 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมในเตรท 0.5 กรัมต่อลิตร กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร หรืออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 280 พบว่าสาหร่ายให้ปริมาณเซลล์ 6.3 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจริญจำเพาะ 0.229 d<sup>-1</sup> และมีปริมาณลิพิด 47.8% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

**อภิเชษฐ์ และรัตนภรณ์ (2553)** ได้ทำการศึกษาการกักแยกยีสต์ไขมันสูงเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล จากตัวอย่างดินทั้งหมด 53 ตัวอย่างที่เก็บในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่นและจังหวัดใกล้เคียง พร้อมกับศึกษาสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของยีสต์ไขมันสูง จากการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ที่กักแยกได้ใน Lipid accumulation medium เป็นเวลา 8 วัน มีค่าเป็นกรดต่าง เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 30 °C โดยใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนและกลูโคส 80 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น พบว่ายีสต์ไอโซเลท U5/2 มีการสะสมลิพิดภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 23.26 % โดยน้ำหนักแห้ง การเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน ทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้น แต่จะมีการผลิตลิพิดได้ต่ำลง นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสและจำกัดปริมาณของไนโตรเจน ทำให้ยีสต์มีการสะสมลิพิดได้ดีขึ้น

**Alvarez, Kalscheuer and Steinbüchel (2000)** ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียในอาหาร Mineral salts medium (MSM) ต่อการสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลในเชื้อ *Rhodococcus opacus* PD630 และ *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 ผลปรากฏว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร ที่ระยะ late exponential และ stationary growth phase เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลได้สูงสุด 75.8 % โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นเป็น 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณการสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลลดลงตามไปด้วย

**Canonica and Pisano (1987)** ทำการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ FAME ของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* และ *Aeromonas caviae* ด้วยวิธี gas liquid chromatograph พบว่ากรดไขมันที่พบในองค์ประกอบ FAME ที่ได้ประกอบด้วย C12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 16:1, 18:1 และ 3-OH 14:1 และเมื่อใส่ยา antibiotic cerulenin ทำให้เซลล์ลดระดับการผลิต fatty acid ที่มีคาร์บอนที่เป็นสายโซ่ยาวลงและแสดงการเพิ่มขึ้นของ fatty acid จำพวก C14:0 และ 3-OH 14:0 และลดปริมาณ total unsaturated fatty acid ด้วย

**Daron, et al. (1969)** ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่สกัดได้จากเชื้อ Thermophilic พวก *Bacillus* sp. โดยทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซิเตท (acetate) และกลูโคส (glucose) เป็นแหล่งคาร์บอน พร้อมทั้งศึกษาผลของอุณหภูมิ (40, 50 และ 60 °C) มีการเก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วง mid-exponential phase ต่อองค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้ จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 60 °C พบว่าได้ลิพิดสูงสุด  $7.7 \pm 0.2$  % และในอาหารที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนจะพบกรดไขมันส่วนใหญ่จะมีจำนวนคาร์บอน 16 หรือ 17 อะตอมมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 80-90 % และยังพบอีกว่าเมื่อใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนเปอร์เซ็นต์กรดไขมันที่เป็น โซ่กิ่งจะลดลงจาก 79 % ไปเป็น 57 % แต่ถ้าใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะลดลงจาก 56 ไปเป็น 30 %

**Gouda, Omar and Aouad (2008)** ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไขมันจากการเพาะเลี้ยง *Gordonia* sp. DG และ *Rhodococcus opacus* PD630 ในน้ำทิ้งจากการเกษตร โดยทำการเปรียบเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลปรากฏว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการสะสมลิพิดสูงสุดในช่วง stationary phase ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *Gordonia* sp. และ *R. opacus* สามารถสะสมลิพิดได้ 72 และ 80% ตามลำดับ และเมื่อใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรจำพวกกากน้ำตาลย่อย เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถสะสมลิพิดได้สูงสุด 96 และ 93% ตามลำดับ นอกจากนี้พบอีกว่าพวกเปลือกส้มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) ได้สูงสุด 57.8 และ 88.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองนั้นยังพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิดคือ การใช้สารสกัดที่ได้จากเปลือกส้ม 60% (v/v) แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้สามารถทำให้เกิดการสะสมลิพิดได้ถึง 80% (w/w) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

**Lu, Vora and Khosla (2008)** ศึกษาผลของการผลิตของกรดไขมันอิสระในเชื้อ *E. coli* โดยผ่านการตัดต่อยีนแล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร M9 minimal media ซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีการควบคุมอุณหภูมิ 30 °C มีค่าเป็นกรดต่าง 7 ผลปรากฏว่าเชื้อ *E. coli* สามารถสะสมกรดไขมันได้มากกว่า 50 % และยังสามารถผลิตกรดไขมันที่จำเพาะต่อการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ ยังพบอีกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพในการชักนำให้สะสมกรดไขมันในเชื้อ *E. coli* ได้ดี และในระยะ 12 ชั่วโมงแรกของช่วง post-induction phase สามารถสะสมกรดไขมันในระบบ fed-batch ได้ถึง 4.8 %

**Olukoshi and Packter (1994)** ศึกษาผลของการสะสม Triacylglycerols (TAG) ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* 4 สายพันธุ์ ในอาหาร CM และ YEME medium พบว่าการเจริญเติบโตในระยะ post-exponential phase จะมีการสะสม TAG อยู่ในช่วง 50-150 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังพบว่าเมื่อเลี้ยง แบคทีเรีย *Streptomyces lividans* เมื่อให้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ จะเพิ่มการผลิต TAG และ glycogen เท่ากับ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกทั้งยังพบว่า *Streptomyces coelicolor* สายพันธุ์นี้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนคือกลูโคสหมักในอาหาร YEME medium จะสามารถผลิต Actinorhodin ได้

**Saxena et al. (1998)** ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน อัตราส่วน C/N และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *Rhodotorula minuta* II P-33 ต่อการสะสมลิพิด ผลปรากฏว่าเชื้อมีการสะสมลิพิดได้สูงสุด 22.5 % กับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และอัตราส่วนที่เหมาะสมของ C/N เท่ากับ 30 เชื้อสามารถสะสมลิพิดได้ 48 % ยังพบอีกว่าการควบคุมอุณหภูมิมีผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมัน ซึ่งกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้จากเชื้อ *Rhodotorula minuta* II P-33 อยู่ในช่วง C<sub>7</sub>-C<sub>18</sub>

**Vicente et al. (2009)** ทำการผลิตไบโอดีเซลจากการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดน้ำมันจากราชนิด *Mucor circinelloides* โดยศึกษาเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากตัวทำละลาย 3 ประเภทได้แก่ ตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform : methanol ตัวทำละลาย

ผสมระหว่าง Chloroform : methanol : น้ำ และ n-hexane ซึ่งผลการทดลองพบว่า Chloroform : methanol (2:1 V/V) จะให้ปริมาณน้ำมันสูงสุด เท่ากับ  $19.9 \pm 1.3$  wt %

**Xue et al. (2006)** ศึกษาวิธีใหม่ในการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ 4 สายพันธุ์คือ *Rhodotorula glutinis*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* 2 สายพันธุ์ ในแหล่งน้ำทิ้งโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ที่เจือจางและปรับค่าความเป็นกรดต่างแล้ว ซึ่งมี COD เริ่มต้นเท่ากับ 43,210 mg/L โดยมีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 2.0-2.5 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ผลปรากฏว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมคือ เมื่อใช้ COD เริ่มต้นเท่ากับ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดต่าง 5.5 และความเข้มข้นของสารอาหาร 12% ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี สามารถย่อยสลาย COD ได้สูงสุด  $85.1 \pm 1.0\%$  และได้ปริมาณ total lipid content เท่ากับ  $9.04 \pm 0.11$  % และยังพบอีกว่า crude lipid ที่ได้จาก *Rhodotorula* สามารถเป็นแหล่งวัตถุดิบในการนำไปผลิตไบโอดีเซลได้เนื่องจากมีองค์ประกอบของ methyl ester เท่ากับ  $92.54 \pm 2.0\%$

**Zhu, Zong and Wu (2008)** ศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยง *Trichosporon fermentans* ในอาหารที่จำกัดไนโตรเจนเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลที่ได้มาจากอุตสาหกรรมการเกษตร ผลปรากฏว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่จำกัดไนโตรเจนที่มีเพปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่าปริมาณลิพิดสูงสุด เท่ากับ 57 % แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบอาหารที่มี C/N ratio เท่ากับ 163 ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 25 °C จะให้ปริมาณลิพิดสูงสุดเท่ากับ 62.4 % และเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งอาหารที่เตรียมจากกากน้ำตาลที่ได้มาจากอุตสาหกรรมการเกษตร ให้ปริมาณลิพิดน้อยกว่าเท่ากับ 35.3 %

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) Olympus, UFX-DX, Japan
2. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Incubator shaker) (Unitron, United instrument)
3. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoblock) (Biosan, TDB-120, Thailand)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Spectrafuge 16M, labnet, Germany)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z383K, Germany)
6. เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
7. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) (Perkin Elmer 480, USA)
8. ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (Advance, Mupid<sup>®</sup> - exu, Japan)
9. ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation) (Syngene, MD1 1019, Japan)
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Visible Spectrophotometer) Shimadzu, UV-1601, Japan
11. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dryer) Heto-Holten, DK 3450, Denmark
12. เครื่องระเหยความดันสูญญากาศ (Evaporator) Becthai, Thailand
13. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Cyberscan 2000<sup>pH</sup>, Singapore)
14. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง AG 2004, Mettler Toledo
15. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
16. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Binder control, Japan)
17. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Lab focus, Contherm Thermotec 2000, Thailand)
18. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Hirayama Hiclave HV-50, Japan)
19. ไมโครปิเปต (Micropipette)
20. หลอดocenetripiw จังขนาด 50 มิลลิลิตร

21. ลูปเข็มเชื้อ (Loop)
22. แผ่นกระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Coverslip)
23. ตะเกียงแอลกอฮอล์
24. กิวเวต (Semimicro rectangular 10 mm) Hellma, USA
25. จุกยาง
26. ภาชนะเครื่องแก้วต่างๆ (Glasswares)
27. ชุดทดสอบ (kit)
  - 27.1 ชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit) (Qiagen, Germany)
  - 27.2 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) (Qiagen, Germany)
  - 27.3 ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA Wizard<sup>®</sup> SV Genomic DNA Purification System) (Qiagen, Germany)

### 3.1.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) (Biomark<sup>™</sup> Laboratories, India)
2. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) (Caro Erba , Italy)
3. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) (Caro Erba , Italy)
4. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (Fluka-Garantie, Switzerland)
5. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Fluka-Garantie, Switzerland)
6. ซูโครส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (Caro Erba , Italy)
7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Univar, Australia)
8. โซเดียมไนเตรท ( $NaNO_3$ ) (Caro Erba, Italy)
9. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ) (BDH chemical, England)
10. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $Na_2HPO_4$ ) (Merck, Germany)
11. แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone) (BioMark<sup>™</sup>, India)
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) (Caro Erba , Italy)
13. ฟรุคโตส ( $C_6H_{12}O_6$ ) (Caro Erba , Italy)
14. เฟอริกคลอไรด์ ( $FeCl_3$ ) (Fluka-Garantie, Switzerland)
15. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ ) (Caro Erba, Italy)
16. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) (Univar, Australia)
17. ยูเรีย ( $CO(NH_2)_2$ ) (Univar, Australia)

18. แกลกโตส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (Univar, Australia)
19. ฐัน (agar)
20. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract powder) (Himedia<sup>®</sup>, India)
21. แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $NH_4Cl$ ) (Caro Erba, Italy)
22. แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ ) (Caro Erba, Italy)

### 3.1.3 สารเคมีสำหรับการสกัดลิวติด

1. คลอโรฟอร์ม ( $CH_2Cl$ ) (sigma, USA)
2. เมทานอล ( $CH_3OH$ ) (Scharlau, Spain)

### 3.1.4 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. กลีเซอรอล (Glycerol) (Fluka-Garantie, Switzerland)
2. ทริสไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) (Scharlau, Spain)
3. เอทานอล ( $C_2H_5OH$ ) (Fischer, USA)

### 3.1.5 สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR

1. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Biolab, USA)
2. แมกนีเซียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (Ajax, Australia)
3. ดีโออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, Madison, USA)

### 3.1.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

1. เจลสตาร์ (gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
2. อะกาโรส (agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
3. ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) (Analytical grade, BDH, England)
4. กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) (Merck, Germany)
5. ฝาแอมป์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (Invitrogen, USA)

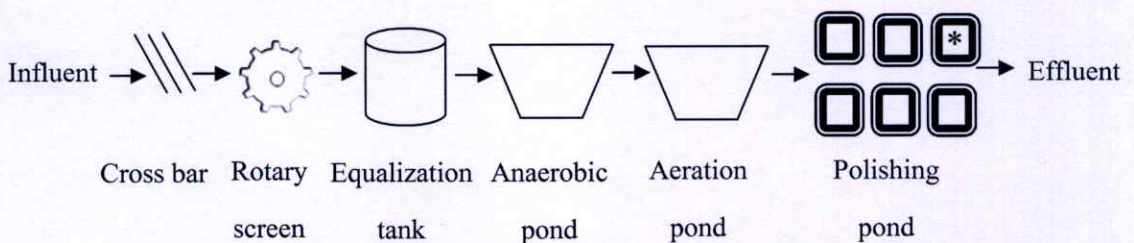
## 3.2 แหล่งที่มาของน้ำทิ้งที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรีย

ตัวอย่างน้ำทิ้งใช้เป็นแหล่งน้ำทิ้งในการคัดแยกแบคทีเรียทำการเก็บรวบรวมจากบ่อฝังล้าดับสุดท้ายของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง (รูปที่ 3.1) บ่อฝังดังกล่าวมีขนาดความจุ 4,800  $m^3$  ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (รูปที่ 3.2 เครื่องหมาย \* แสดงจุดเก็บตัวอย่าง) โดยทำการเก็บรวบรวมน้ำทิ้งจากจุดต่างๆ ของบ่อฝัง ด้วยวิธีการเก็บตัวอย่างแบบผสมรวมแต่ละจุดเก็บ (Integrated sampling) โดยใช้กระบวยตักน้ำและทำการจ้วงเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง ซึ่งระยะทางการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งมีระยะห่างจากขอบบ่อฝังประมาณ 2

เมตร ตัวอย่างถูกเก็บรวบรวมในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 ที่เวลาประมาณ 11.30 น. น้ำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้มีคุณลักษณะดังนี้อุณหภูมิของน้ำเท่ากับ 29 องศาเซลเซียส pH 7 ค่า COD 60 มิลลิกรัมต่อลิตร BOD 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TKN 30 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ถูกนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียต่อไป



รูปที่ 3.1 บ่อผึ่งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง



รูปที่ 3.2 ระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง

### 3.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

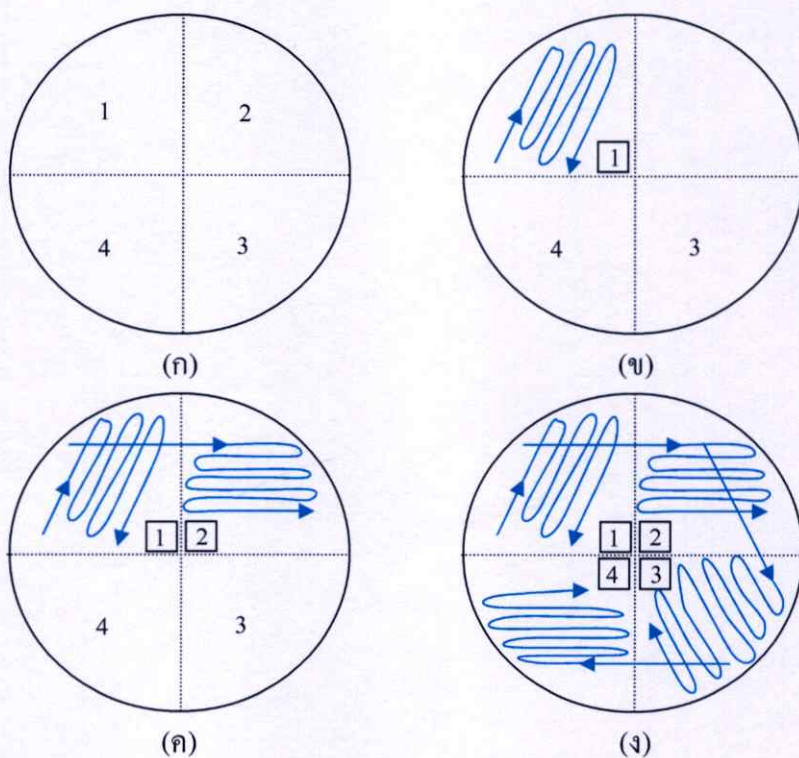
1. เจือจางตัวอย่างน้ำทิ้งแบบ 10 เท่า (Ten-fold serial dilution) ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ในอาหารเหลวสูตร Luria-Bertani (LB Broth) ที่ระดับ  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-5}$

2. ปิเปตสารละลายน้ำทิ้งที่อัตราเจือจาง  $10^{-1}$  ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงที่ตำแหน่งตรงกลางของจานเพาะเชื้อที่บรรจุบนอาหารแข็งสูตร Luria-Bertani (LB agar) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำแท่งแก้วตัวแอล (spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาเกลี่ยน้ำตัวอย่างให้กระจายทั่วจานเพาะเชื้อ กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำซ้ำแต่ใช้สารละลายน้ำทิ้งที่อัตราเจือจาง  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-5}$  ตามลำดับ

3. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง จะใช้ลูปเชยเชื้อ (loop) เชยเอาเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวออกจากจานเพาะเชื้อในข้อ 2 ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) แล้วนำเชื้อที่อยู่ปลาย loop ไปทำการลากหรือขีด (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อใหม่ที่มีอาหารแข็ง LB บรรจุอยู่ โดยเริ่มจากการขีดเส้นเป็นแนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้นในบริเวณพื้นที่หมายเลข 1 ของจาน (รูปที่ 3.3 ก-ข) จากนั้นนำ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วไปขีดลากเชื้อจากบริเวณพื้นที่หมายเลข 1 มาหนึ่งครั้ง แล้วลากเส้นเป็นแนวระนาบติดต่อกันในบริเวณพื้นที่หมายเลข 2 (รูปที่ 3.3 ค) ทำซ้ำด้วยวิธีการแบบเดียวกันจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีทั้งหมด 4 ระบาย (รูปที่ 3.4) จากนั้นทำการกลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

4. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 จนได้เชื้อโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

5. นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา



รูปที่ 3.3 เทคนิคการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ cross streak

### 3.4 การเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรีย

โคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่แยกได้ในหัวข้อ 3.3 จะถูกเก็บในรูปแบบของหัวเชื้อ (stock culture) ด้วยการเพาะเลี้ยงใน LB agar ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายลงบนอาหารแข็งใหม่ทุกๆ เดือน

### 3.5 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้คัดเลือกแบคทีเรียผลิตลิพิด

ก่อนการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิพิด จะมีการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (seed culture) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เชื้อ stock culture ในหัวข้อ 3.4 มา 1 โคโลนี นำไปตากลงบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร LB agar
2. กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เชื้อเอาเชื้อที่เป็น โคโลนีเดี่ยวลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหาร LB Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าด้วยที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงดังรูป 3.4 จะได้ seed culture เพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.4 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

### 3.6 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้ในปริมาณสูง

Seed culture ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่เตรียมได้ในหัวข้อ 3.5 จะถูกนำมาศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต (growth curve) และวิเคราะห์ปริมาณลิพิดของเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สะสมลิพิดได้ในปริมาณสูง ซึ่งการทดลองสามารถทำได้ดังนี้

1. ปิเปิด seed culture จากข้อ 3.5 ลงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จนได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.1 เมื่อนำไปวัดค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Optical density,  $OD_{600}$ )

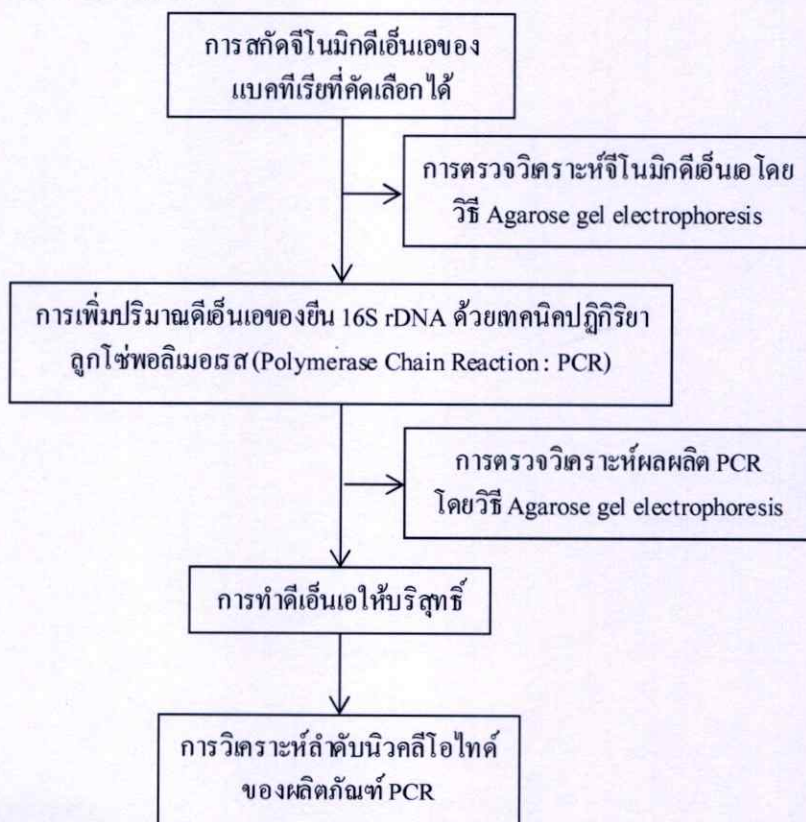
2. นำไปบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C พร้อมทั้งเปิดสารละลายเซลล์ไปวัดค่า OD<sub>600</sub> ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง

3. เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงอีก 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)

4. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้และวิเคราะห์ปริมาณลิวคินอ้างอิงตามวิธีการ Bligh and Dyer (1959) (ดูรายละเอียดวิธีการในภาคผนวก ก.3)

### 3.7 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

การศึกษานิวคลีโอไทด์และจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จะประกอบด้วยขั้นตอนการวิเคราะห์ 4 ขั้นตอนหลักดังแผนภาพที่ 3.5 ซึ่งมีวิธีการดำเนินงานดังนี้



รูปที่ 3.5 ลำดับขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rDNA

#### 1. การสกัดและการตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ถูกนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของด้วยชุดทดสอบ DNA Wizard<sup>®</sup> SV Genomic DNA Purification System Kit (Promega, USA) ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการดังนี้

1.1 เขี่ยโคลนเดี่ยวของ seed culture ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย cell lysis ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ที่มีสารละลาย proteinase K ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำหลอดไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที

1.2 นำหลอดไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กลับหลอดไปมาทุกๆ 5 นาที จนครบ 15 นาที

1.3 เติมสารละลาย MPC protein precipitation reagent ปริมาตร 150 ไมโครลิตร vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

1.4 ดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 475 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

1.5 เทส่วนใสด้านบนทิ้ง หลังจากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75 % เอทานอลปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

1.6 เทส่วนใสทิ้ง และตั้งหลอดไว้จนเอทานอลระเหยหมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม RNase เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.1 เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัมและเติมบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนจนอะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

2.2 เติมเจลสตาร์ในอัตราส่วนเจลสตาร์ 1 ส่วนต่ออะกาโรส 10,000 ส่วน แล้วเทใส่แม่พิมพ์ ทิ้งไว้ให้แข็ง วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ (chamber) เทบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA ให้ท่วมอะกาโรสเจล หยอดสารละลายดีเอ็นเอที่มีสีย้อมลงในช่อง (well)

2.3 จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 45 นาที

2.4 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

## 3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

เตรียมสารละลาย master mix มีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาตามลำดับดังตารางที่ 3.1 ลงในหลอด PCR บรรจุหลอด PCR ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) โดยวิธี agarose gel electrophoresis ตามวิธีที่ระบุในข้อ 2

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ PCR 5 เท่า	10
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1
แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์	3
ไพรเมอร์ตัวที่ 1: 27F 5 ไมโครโมลาร์ <sup>†</sup>	2.5
ไพรเมอร์ตัวที่ 2: 1492R 5 ไมโครโมลาร์ <sup>‡</sup>	2.5
เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร <sup>††</sup>	3
จีโนมิกดีเอ็นเอ	0.5
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	27.5
ปริมาตรสุทธิ	50

<sup>†</sup>ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Hongxiang *et al.*, 2008)

<sup>‡</sup>ไพรเมอร์ 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') (Hongxiang *et al.*, 2008)

<sup>††</sup> ตัวเร่งปฏิกิริยา

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	Initial Denaturation	94	5 นาที
2	Denaturation	94	30 วินาที
	Annealing	50	45 วินาที
	Primer Extension	72	90 วินาที
	} 35 รอบ		
3	Final Extension	72	10 นาที

#### 4. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

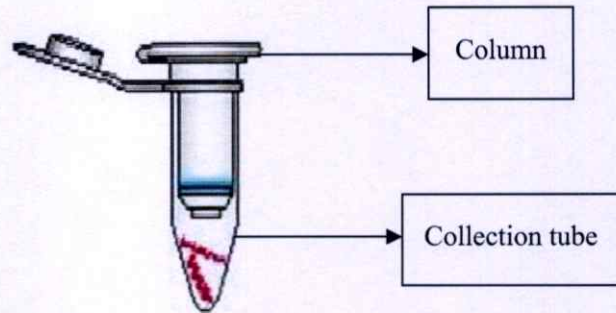
นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดสอบ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการดังนี้

4.1 เติมน้ำบัฟเฟอร์ DF ในปริมาณ 5 เท่าของปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน QIAprep spin column (รูปที่ 3.6) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.2 เทส่วนใสใน Collection tube ที่เติมน้ำบัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.3 เทส่วนใสที่ก่อก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนใสที่เหลือติด column ย้าย column มายังหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจันใหม่

4.4 เติมบัฟเฟอร์ Elution ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์



รูปที่ 3.6 QIAprep spin column

#### 4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ First base (Malaysia) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน GenBank (National Center for Biotechnology Information, (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

### 3.8 การปรับสภาพแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์

1. เตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นของไอโซเลทที่มีการผลิตลิวซีนสูงสุดตามขั้นตอนที่ 1 และ 2 ของหัวข้อ 3.5

2. เชื้อเชื้อลงในอาหาร LB Broth ที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ผสมในสัดส่วน 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จนได้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.1 เมื่อนำไปวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์โดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ )

3. นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พร้อมกับทำการวัดค่า  $OD_{600}$  ที่เวลาต่าง ๆ กัน จนค่า  $OD_{600}$  มีค่าเท่ากับ 1.5

4. ทำการทดลองในข้อ 2-3 ซ้ำ ด้วยการถ่ายเชื้อลงในอาหาร LB Broth ที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ผสมในสัดส่วน 20, 40, 60, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3. แบคทีเรียที่สามารถเติบโตได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ จะถูกเก็บรักษาในรูปของหัวเชื้อ (Stock culture) ด้วยการเพาะเชื้อบนน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการเติมวุ้นให้อยู่ในรูปอาหารแข็ง (Synthetic wastewater agar; SW Agar) พร้อมกับถ่ายลงอาหาร SW Agar ใหม่ในทุกเดือน

### 3.9 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นในน้ำเสียสังเคราะห์

ก่อนทำการทดลองเรื่องปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิด จะมีการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (seed culture) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เชื้อ stock culture ในหัวข้อ 3.8 มา 1 โคลนีนี้นำไปตากลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร SW Agar
2. กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เชื้อเอาเชื้อที่เป็น โคลนีนีเดียวลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มด้วยการเขย่าแบบต่อเนื่องที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้ seed culture เพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

### 3.10 ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1. ปิเปต seed culture ที่ได้จากข้อ 3.9 ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จนได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.1 เมื่อนำไปวัดค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ )
2. นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์เพื่อนำไปวัดค่า  $OD_{600}$  และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง (ดูรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในภาคผนวก ก.4)
3. เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปทำให้เซลล์แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)
4. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณลิพิดอ้างอิงตามวิธีการ Bligh and Dyer (1959) (ดูรายละเอียดวิธีการในภาคผนวก ก.3) และวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในลิพิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Gas chromatograph	Agilent 6850 Series II Networked GC System
Column	HP-ULTRA 2 25 m x 0.22 mm i.d. x 0.33 $\mu$ m capillary column (Agilent J&W GC Columns, USA.)
Temperature program	Injector temperature : 250 °C Oven temperature : 170 °C (initial temperature), holding at 170 °C for 0.60 min, then increased from 170 °C to 288 °C at 28 °C/min for 5.83, holding at increased to 310 °C at 60 °C/min, holding for 1.25 min Detector temperature : 300 °C
Injection mode	Split ratio : 40:1, Split flow 50.1 ml/min (เฮกเซน)
Hydrogen carrier gas	Flow rate 30 ml/min (99.999% purity) (Labgaz, Thailand)

### 3.11 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1. ปิเปิดกล้าเชื้อเริ่มต้น (seed culture) จากข้อ 3.9 ลงในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนกระทั่งมีค่า  $OD_{600}$  เริ่มต้นประมาณ 0.1 กำหนดให้มีความเข้มข้นของกลูโคสและความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตรและ 1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 20

2. นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

3. ปิเปิดสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง (ดูรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในภาคผนวก ก.4) และที่เวลา 36 ชั่วโมงจะทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying

4. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้ จากนั้นนำเซลล์แห้งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วไปทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิดอ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) ดูรายละเอียดวิธีการในภาคผนวก ก.3

5. ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสเป็นฟรุกโตส, ซูโครส, แลคโตส, กรดโพธิโอนิก, กรดบิวไทริก และ โซเดียมอะซิเตท ตามลำดับ โดยในกรณีที่ชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นกรดและเกลือของกรด จะทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (Total Organic Carbon, TOC) ในสารละลายที่ระยะเวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง

### 3.12 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิกนินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1. ปิเปตกล้าเชื้อเริ่มต้น (seed culture) จากข้อ 3.9 ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนกระทั่งมีค่า OD<sub>600</sub> เริ่มต้นประมาณ 0.1 กำหนดให้มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและ กำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำเสียมีค่าคงที่เท่ากับ 0.015 โมลไนโตรเจนต่อลิตร หรือค่า C/N ratio เท่ากับ 20

2. นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

3. ปิเปตสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง (ดูรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในภาคผนวก ก.4) และที่เวลา 36 ชั่วโมงจะทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying

4. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้ จากนั้นนำเซลล์แห้งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วไปทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิกนินอ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) ดูรายละเอียดวิธีการในภาคผนวก ก.3

5. ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรต และยูเรีย ตามลำดับ

### 3.13 ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิกนินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1. ปิเปตกล้าเชื้อเริ่มต้น (seed culture) จากข้อ 3.9 ลงในน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร จนกระทั่งมีค่า OD<sub>600</sub> เริ่มต้นประมาณ 0.1 กำหนดให้มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และกำหนดให้ความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าคงที่เท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำเสียเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร

2. นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

3. ปิเปตสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง (ดูรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในภาคผนวก ก.4) และที่เวลา 36 ชั่วโมงจะทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying

4. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้ จากนั้นนำเซลล์แห้งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วไปทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิดอ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) ดูรายละเอียดวิธีการในภาคผนวก ก.3

5. ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ โดยใช้การเพิ่มหรือลดปริมาณของไนโตรเจนจาก 0 เป็น 0.1, 1, 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

### 3.14 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1. ปิเปิดกล้าเชื้อเริ่มต้น (seed culture) จากข้อ 3.9 ลงในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนจนกระทั่งมีค่า  $OD_{600}$  เริ่มต้นประมาณ 0.1 กำหนดให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นค่า C/N ratio เท่ากับ 100

2. นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

3. ปิเปิดสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ กันจนครบ 72 ชั่วโมง (ดูรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในภาคผนวก ก.4) และที่เวลา 36 ชั่วโมงจะทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze drying

4. นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก เพื่อวัดปริมาณชีวมวลที่ได้ จากนั้นนำเซลล์แห้งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วไปทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิดอ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) ดูรายละเอียดวิธีการในภาคผนวก ก.3

5. ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนค่า C/N ratio ในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ โดยใช้การเพิ่มหรือลดปริมาณกลูโคสจนมี C/N จาก 100 เป็น 200, 400, 600 และ 800 ตามลำดับ

## บทที่ 4

### ผลงานวิจัยและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดจากน้ำทิ้ง ซึ่งเก็บรวบรวมจากบ่อฝังของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้สูงสุดมาจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ซึ่งสามารถอธิบายผลได้ดังนี้

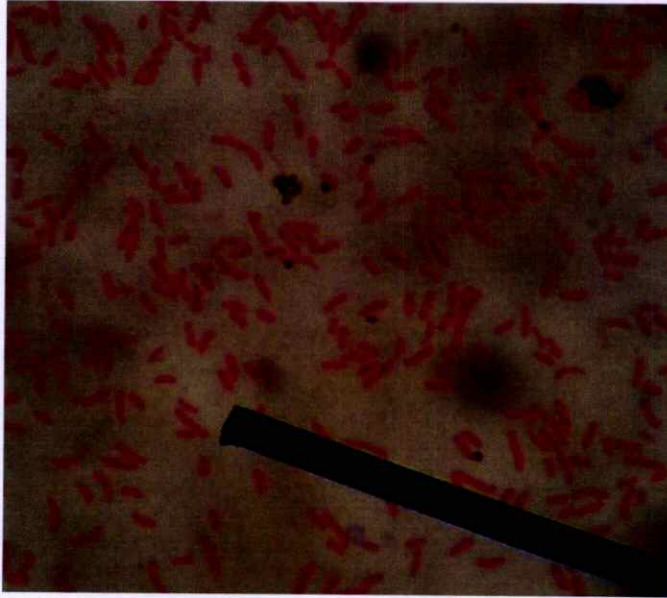
#### 4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง

ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่เก็บรวบรวมได้จากบ่อฝังของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง ด้วยวิธีการเจือจางแบบ 10 เท่า (Ten-fold Serial dilution) ร่วมกับเทคนิค spread plate และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB Agar) พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทิ้งได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท ภายหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.1)

**ตารางที่ 4.1** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อฝังของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนิบนอาหารแข็ง LB	สีของโคโลนี	ลักษณะรูปร่าง	การข้อมแกรม
1	Y1.1	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีเหลือง	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
2	W2.1	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีขาว	รูปร่างกลม	แกรมลบ
3	W2.2	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีขาว	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
4	W2.3	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีขาว	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
5	C3.1	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
6	C3.2	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
7	C3.3	ทรงกลมผิวหน้าเรียบ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
8	R4.1	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
9	R4.2	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
10	R4.3	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
11	R4.4	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ
12	R4.5	ทรงกลมผิวหน้าขรุขระ	สีครีม	รูปร่างท่อน	แกรมลบ

จากตารางที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 12 ไอโซเลท มีลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะและสีของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบและมีสีเหลือง ซึ่งมีรหัสเชื้อคือ Y1.1 กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบ สีขาว ใช้รหัสเชื้อคือ W2.1, W2.2 และ W2.3 กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีทรงกลมผิวหน้าเรียบ สีครีม ซึ่งใช้รหัสเชื้อคือ C3.1, C3.2 และ C3.3 และกลุ่มที่ 4 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีทรงกลมผิวหน้าขรุขระ สีครีม ที่มีรหัสเชื้อคือ R4.1, R4.2, R4.3, R4.4 และ R4.5 เมื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรม (Gram staining) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากย้อมติดสีแดงของ safranin-O และเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือแท่ง (rod) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้น ไอโซเลท W2.1 เมื่อส่องดูรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตัวอย่างลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียรหัสเชื้อ R4.4 แสดงดังรูปที่ 4.1

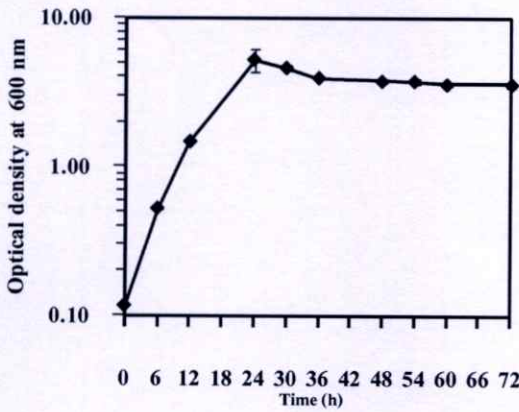


รูปที่ 4.1 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

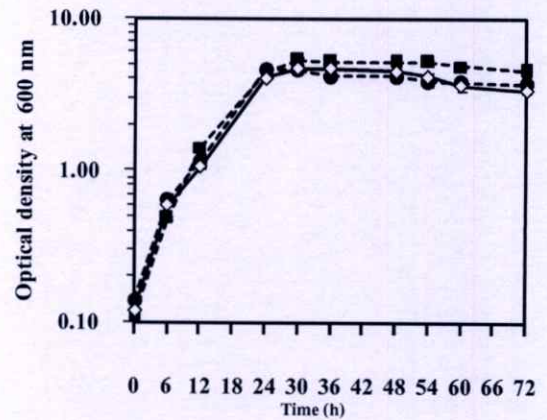
#### 4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์และความสามารถในการผลิตลิพิด โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกัน โดยแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นรูปแบบการเจริญเติบโตจะมีลักษณะคงที่ (รูปที่ 4.2) ดูรายละเอียดใน

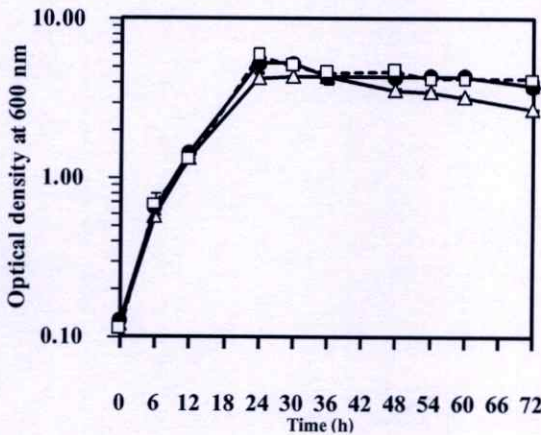
ภาคผนวก ข.1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียในแต่ละไอโซเลทสามารถเจริญได้เป็นอย่างดี เนื่องจากในอาหารเหลว LB เป็นอาหารเหลวสูตรสมบูรณ์ (enriched medium) ที่ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากเปปโตินและสารสกัดจากยีสต์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์



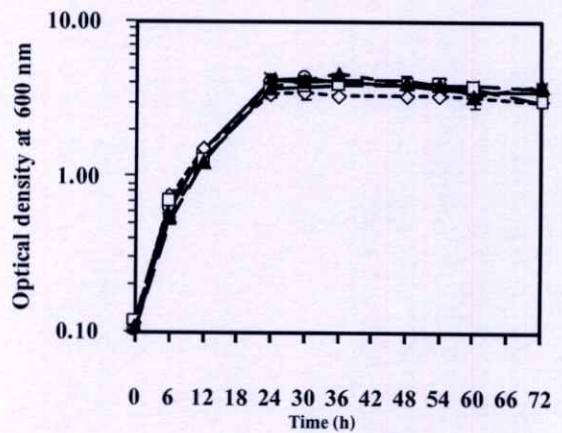
(ก)



(ข)



(ค)

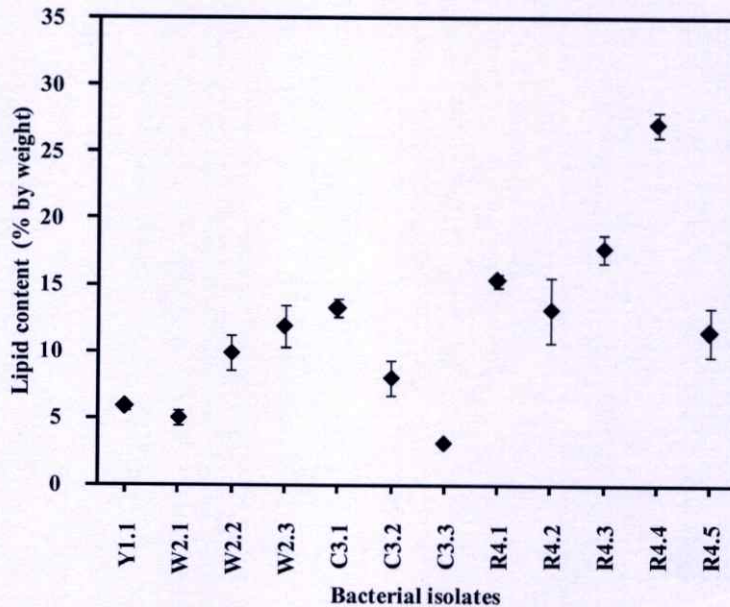


(ง)

**รูปที่ 4.2** ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ก) Y1.1 (—◆—) ข) W2.1 (—■—), W2.2 (—●—), W2.3 (—◇—) ค) C3.1 (—△—), C3.2 (—●—), C3.3 (—□—) และ ง) R4.1 (—○—), R4.2 (—■—), R4.3 (—◇—), R4.4 (—□—) และ R4.5 (—▲—) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth นาน 72 ชั่วโมง

เมื่อนำเซลล์แห้งของแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB นาน 72 ชั่วโมง ไปทำการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม เมทานอลและน้ำ อ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) เพื่อหาปริมาณลิพิด (Lipid content) พบว่ามีแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 เพียงไอโซเลทเดียวที่ให้ปริมาณลิพิดมากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง โดยให้ปริมาณลิพิดเท่ากับร้อยละ  $27.2 \pm 0.92$  โดยน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 4.3) ส่วนเชื้อที่ให้ปริมาณลิพิดรองลงไปตามลำดับคือ ไอโซเลทในรหัส R4.3, R4.1, C3.1, R4.2, R4.5, W2.3, W2.2, C3.2, W2.1, Y1.1 และ C3.3 ซึ่งมี

ปริมาณลิพิดเท่ากับร้อยละ  $17.80 \pm 1.1$ ,  $15.380 \pm 0.51$ ,  $13.23 \pm 0.69$ ,  $13.19 \pm 2.40$ ,  $11.90 \pm 1.79$ ,  $11.90 \pm 1.58$ ,  $9.91 \pm 1.29$ ,  $8.06 \pm 1.30$ ,  $5.04 \pm 0.50$ ,  $5.88 \pm 0.26$  และ  $3.19 \pm 0.21$  โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.3 ทั้งนี้การผลิตลิพิดที่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการนำอาหารเข้าไปในเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้สูงสุดไปใช้ในการศึกษาต่อไป



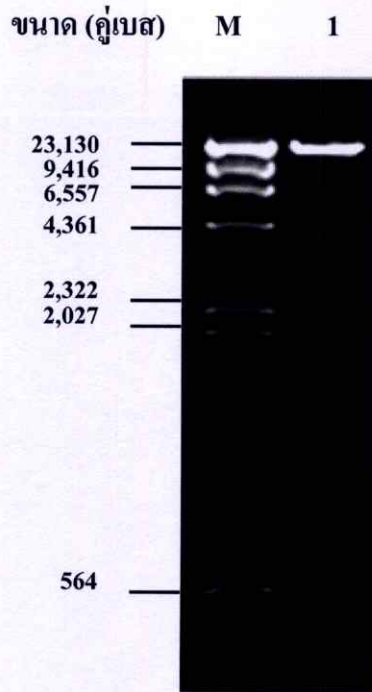
**รูปที่ 4.3** ปริมาณลิพิดของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ โดยน้ำหนักของเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB Broth นาน 72 ชั่วโมง

#### 4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียผลิตลิพิดที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ไอโซเลทของแบคทีเรีย R4.4 ถูกนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ซึ่งผลที่ได้เป็นดังนี้คือ

##### 4.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 โดยใช้ชุด Wizard® SV Genomic DNA Purification System Kit (Promega, USA) และนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าปรากฏแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ไม่มีรอยป็นของแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกย่อย และไม่ปรากฏแถบของอาร์เอ็นเอ (รูปที่ 4.4)



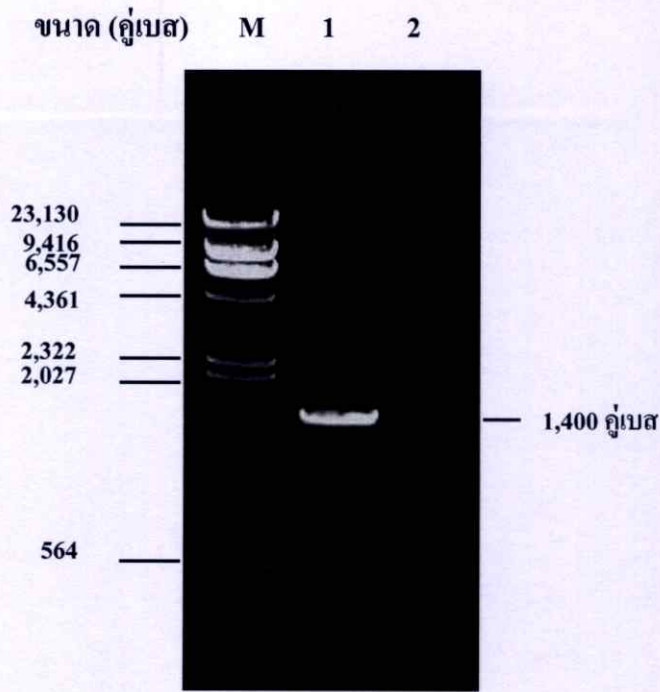
**รูปที่ 4.4** ผลการตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์

เลน M DNA size marker  $\lambda$  DNA/ *Hind*III

เลน 1 จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4

#### 4.3.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase chain reaction)

จากการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ร่วมกับไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และไพรเมอร์ 1,492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย (Hongxiang *et al.*, 2008) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และหูดควบคุม ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอมาตรฐานและเติมสารทุกตัวที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ได้ผลดังรูปที่ 4.5



**รูปที่ 4.5** ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR Product) จากการเพิ่มจำนวนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท R4.4

เลน M DNA size marker  $\lambda$  DNA/ *Hind*III

เลน 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4

เลน 2 การทดลองควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอ

จากรูปที่ 4.5 พบว่าการเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA ของไอโซเลท R4.4 ได้ผลิตผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเกิดขึ้นอย่างชัดเจน (เลน 1) โดย PCR product มีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ซึ่งเท่ากับ 1,456 คู่เบส (Hongxiang *et al.*, 2008) นอกจากนี้ไม่พบผลิตผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันในการทดลองควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทน DNA (เลน 2) แสดงให้เห็นว่า PCR product ของเชื้อไอโซเลท R4.4 ไม่มีการปนเปื้อนและมีความบริสุทธิ์สูง

#### 4.3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA จากแบคทีเรียไอโซเลท R4.4

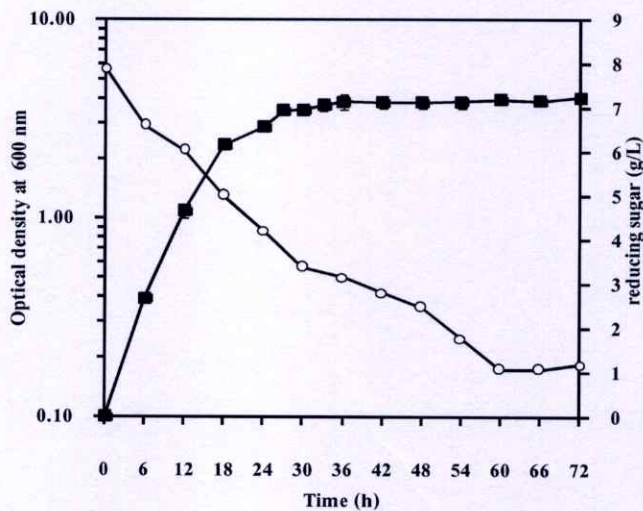
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 ความยาว 1,400 คู่เบส เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ถึงร้อยละ 99.61-99.90 แสดงดังตารางที่ 4.2 (รายละเอียดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ดูได้ในภาคผนวก ง.1) ดังนั้นจึงตั้งชื่อแบคทีเรีย

ไอโซเลท R4.4 นี้ว่า *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 (KMITL หมายถึง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, R4.4 หมายถึง แบคทีเรียมีรูปร่างโคโลนีเป็นทรงกลม (Round) ตัวที่ 4.4 )

#### 4.4 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

##### 4.4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ระยะเวลาต่างๆ ทำได้โดยเพาะเลี้ยง *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีปริมาณกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 20 พร้อมทั้งติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการวัดค่าความหนาแน่นโดยอาศัยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) จนครบ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.6 )



**รูปที่ 4.6** ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (■) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (○) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคส 9 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C

จากรูปที่ 4.6 พบว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ ดังจะเห็นได้จากค่าความหนาแน่นโดยแสงของสารละลายเซลล์ (OD<sub>600</sub>) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0.100 เป็น 2.325 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 18 ชั่วโมง สอดคล้องกับการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์จาก 7.650 เป็น 4.753 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ความหนาแน่นของเซลล์จะมีค่า

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโอโซเลท R4.4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม

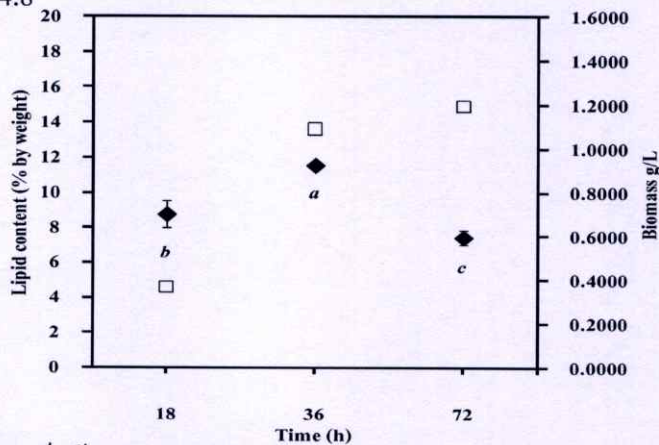
BLASTn

ลำดับที่	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	Accession No.	Sequencing identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Aeromonas sobria</i> strain JY081016-1	GQ232759	99.90 (1030/1031)	Zhang and Qin, 2009
2	<i>Aeromonas sobria</i> strain NQ090701	HM358836	99.71 (1029/1032)	Zhang, 2010
3	<i>Aeromonas sobria</i> strain LD081008A-1	GQ205446	99.71 (1030/1034)	Zhang and Qin, 2009
4	<i>Aeromonas hydrophila</i> NBRC 12658	AB680307	99.71 (1034/1037)	Nakagawa, Muramatsu, Miyashita, Sugimoto, and Kamakura, 2011
5	<i>Aeromonas veronii</i> strain G10-2A	JN644562	99.71 (1034/1037)	Chandel, Parikh, Kulkarni, Mendki, Tikar, Sharma, Parashar, Shouche and Veer, 2011
6	<i>Aeromonas veronii</i> strain BMA12_2B	JN644542	99.71 (1034/1037)	Chandel, Parikh, Kulkarni, Mendki, Tikar, Sharma, Parashar, Shouche and Veer, 2011
7	<i>Aeromonas veronii</i> strain JF4612	JN120274	99.71 (1043/1046)	Goldschmidt-Clermont, Kuhnert and Burr, 2011
8	<i>Aeromonas veronii</i> strain YA090911	GU735964	99.71 (1034/1037)	Wang, Yan and Xie, 2010
9	<i>Aeromonas veronii</i> strain CYJ202	FJ940848	99.71 (1034/1037)	Li and Yang, 2009
10	<i>Aeromonas calicicola</i> strain 03037TRG	AY347679	99.61 (1033/1037)	Figueras, Suarez-Franquet, Chacon, Soler, Navarro, Alejandro, Grasa, Martinez-Murcia and Guarro, 2010
11	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> strain MSSRFD110	HQ454998	73.38 (1045/1424)	Jegan, Prabuvathy, and Sudha, 2010
12	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain KB6	JF327445	71.18 (1045/1468)	Fenice, Pesciaroli, Cupini and Selbmann, 2011
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AV2	JQ839149	70.85 (1045/1475)	Deshpande, 2012
14	<i>Pseudomonas putida</i> isolate Te1	HE659513	70.37 (1045/1485)	Damam, 2012
15	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> strain ME BHU1	JN033548	68.48 (1045/1504)	Singh, Singh, Gulati and Kiran, 2011

ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเป็นระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่พบ OD<sub>600</sub> มีค่าสูงสุด โดยมีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 3.874 หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เรียกได้ช้าลง ดังจะเห็นได้จากค่า OD<sub>600</sub> ตั้งแต่เวลา 36 ชั่วโมงเป็นต้นไปนั้นมีค่าค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียได้เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะเวลาคงตัว (stationary phase) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของค่า OD<sub>600</sub> กับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่ามีแนวโน้มที่สอดคล้องกัน นั่นคือเมื่อความหนาแน่นโดยแสงมีค่าเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ จนมีค่าคงที่เมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงนานถึง 60 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 มีการเจริญเติบโตและใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จึงเลือกระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เวลา 18, 36 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์อยู่ในช่วงเวลากการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันคือ ช่วงระยะแบ่งตัว (exponential phase), ช่วงต้นของระยะคงตัว (early stationary phase) และช่วงปลายของระยะคงตัว (late stationary phase) มาศึกษาปริมาณลิพิดเพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตลิพิดของแบคทีเรียต่อไป

#### 4.4.2 การผลิตลิพิดของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

เซลล์ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง 3 ช่วงเวลาต่างกัน ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ถูกนำมาสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipid) ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายและการชั่งน้ำหนักตามวิธีการของ Bligh and Dryer (1959) รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณองค์ประกอบของกรดไขมันในลิพิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8



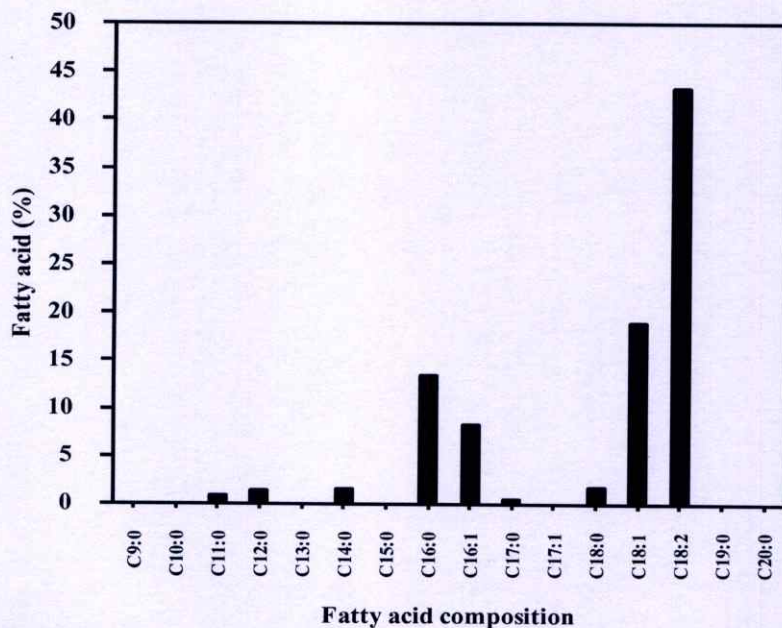
รูปที่ 4.7 น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย

*Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ 20 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C ตัวอักษรที่กำกับบนจุดแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple range test (DMRT)

จากรูปที่ 4.7 พบว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 โดยน้ำหนักของเซลล์แห้งที่ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนานขึ้นจาก 18 ชั่วโมง เป็น 36 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มเวลาจาก 36 ชั่วโมงเป็น 72 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 1.0901 เป็น 1.1939 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่มีระยะการเจริญต่างกันพบว่า ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง ซึ่งจัดเป็นช่วงระยะแบ่งตัว (exponential phase, รูปที่ 4.6) แบคทีเรียจะมีการผลิตลิพิดได้ร้อยละ  $8.78 \pm 0.78$  โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.7) และเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่การเจริญเติบโตในช่วงปลายของระยะแบ่งตัว (late exponential phase) หรือช่วงต้นของระยะพักตัว (early stationary phase) นั่นคือที่เวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 สามารถสะสมลิพิดได้สูงสุด โดยมีปริมาณลิพิดเท่ากับร้อยละ  $11.58 \pm 0.23$  โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียนานขึ้นถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายของระยะพักตัว (late stationary phase; รูปที่ 4.6) พบว่าการผลิตลิพิดมีค่าลดลงเหลือเพียงร้อยละ  $7.46 \pm 0.44$  โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง อิทธิพลของเซลล์ในระยะการเจริญเติบโตที่ต่างกันต่อความสามารถในการผลิตลิพิด ได้มีการรายงานไว้ทั้งจากการศึกษาการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Rhodococcus* sp. (Alvarez, Kalscheuer and Steinbüchel, 2000; Gouda, Omar and Aouad, 2008), *Gordonia* sp. (Gouda, Omar และ Aouad, 2008) และจุลินทรีย์ผลิตลิพิดอื่นๆ ได้แก่ ยีสต์ไอโซเลท OYS3 (รัตนภรณ์, 2551), เชื้อรา *Monascus purpureus* (Rasheva, Kujumdzieva and Hallet, 1997) และของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* (Liu, Wang and Zhou, 2008), กับสาหร่าย *Botryococcus braunii* (พวงพกา และพิมพ์พรณ, 2548) โดยในงานวิจัยของ Alvarez, Kalscheuer and Steinbüchel (2000) ได้ศึกษาการผลิตลิพิดจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols, TAGs) ของแบคทีเรียสกุล *Rhodococcus* สองสายพันธุ์ได้แก่ *Rhodococcus opacus* PD630 และ *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 เมื่อเซลล์อยู่ในช่วงระยะเวลาเติบโตที่ต่างกัน พบว่าแบคทีเรียจะเริ่มผลิต TAGs ในสถานะที่ขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร และแบคทีเรียจะมีการสะสมลิพิดเพิ่มขึ้นพร้อมกับการเจริญของเซลล์ โดยให้ปริมาณสูงสุดเมื่อเซลล์เข้าสู่ในระยะพักตัว นั่นคือเมื่อเพาะเลี้ยงใน mineral salt medium ที่มี gluconate เป็นแหล่งคาร์บอนนาน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้การผลิตลิพิดเกิดขึ้นได้ดีเมื่อเซลล์อยู่ในช่วงต้นของระยะพักตัวนั้น อาจเป็นผลมาจากในช่วงเวลาดังกล่าว เซลล์มีการเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ช้าลงเมื่อเทียบกับเซลล์ในระยะแบ่งตัว แบคทีเรียจึงนำสารอาหารไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบอื่นๆ ของเซลล์ได้น้อยลง ทำให้สารอาหารที่เหลือถูกนำไปสร้างกรดไขมันและเกิดการสะสมลิพิดขึ้น ในขณะที่เซลล์ในช่วงปลายของระยะพักตัว อย่างเช่นการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีการผลิตลิพิดที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ในช่วงต้นของระยะพักตัว อาจเป็นผลจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนอาจมีอยู่อย่างจำกัด (รูปที่ 4.6) ทำให้

เซลล์นำลิพิดที่เก็บสะสมไว้ออกมาสลายเพื่อให้ได้พลังงานในการดำเนินชีวิตต่อไป จากผลการทดลองข้างต้น จึงเลือกระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 นาน 36 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Flame Ionization Detector (GC-FID) พบว่าลิพิดที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดไขมันหลัก 3 ชนิดเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้คือ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) กรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) และกรดปาล์มมิติก (palmitic acid; C16:0) ในปริมาณ 43.2, 18.98 และ 13.48 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันชนิดอื่นๆ คือ กรดอัลเตคคาโนอิก (undecanoic acid; C11:0) กรดลอริก (lauric acid; C12:0) กรดไมริสติก (myristic acid; C14:0) กรดปาล์มมิโตเลอิก (palmitoleic acid; C16:1) กรดเฮปตาเดคคาโนอิก (heptadecanoic acid; C17:0) และกรดสเตียริก (stearic acid; C18:0) ดังรูปที่ 4.8) คูรายละเอียดในภาคผนวกรูปที่ ข.2 เมื่อพิจารณาชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในพืชน้ำมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันรำ (ชันวา อ้างอิงใน รวีวรรณ, 2542) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 มีศักยภาพในการผลิตลิพิดเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

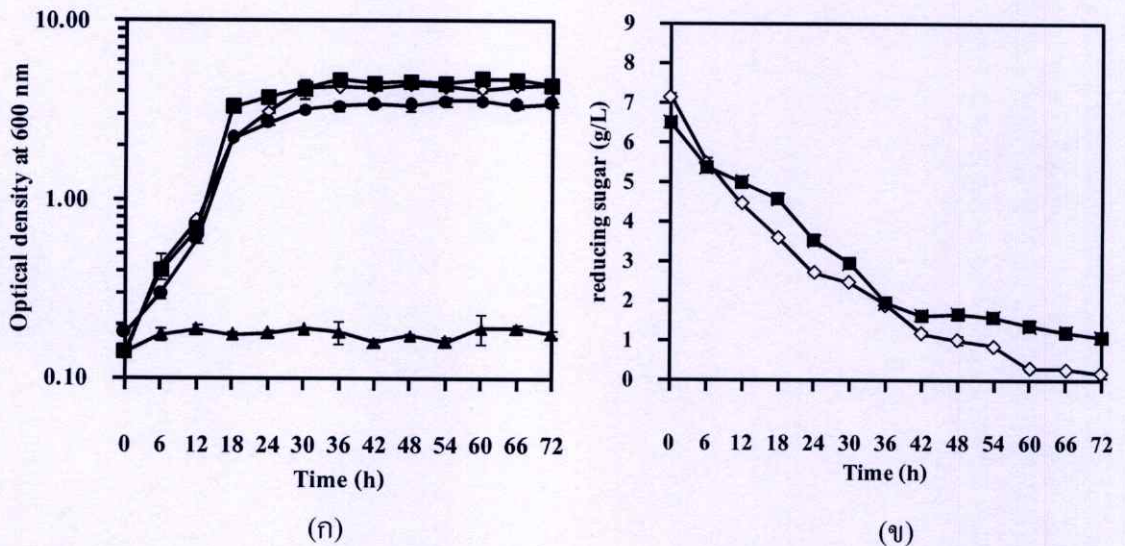


**รูปที่ 4.8** ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคส 9 กรัมต่อลิตร (C/N ratio เท่ากับ 20) บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

## 4.5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

### 4.5.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่แปรผันชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส (glucose), ฟรุคโตส (fructose), ซูโครส (sucrose) และแลคโตส (lactose) กำหนดให้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำเสียสังเคราะห์มีค่า C/N ratio คงที่เท่ากับ 20 พร้อมกับติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการวัดค่าค่าความหนาแน่นโดยอาศัยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) จนครบ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.9)



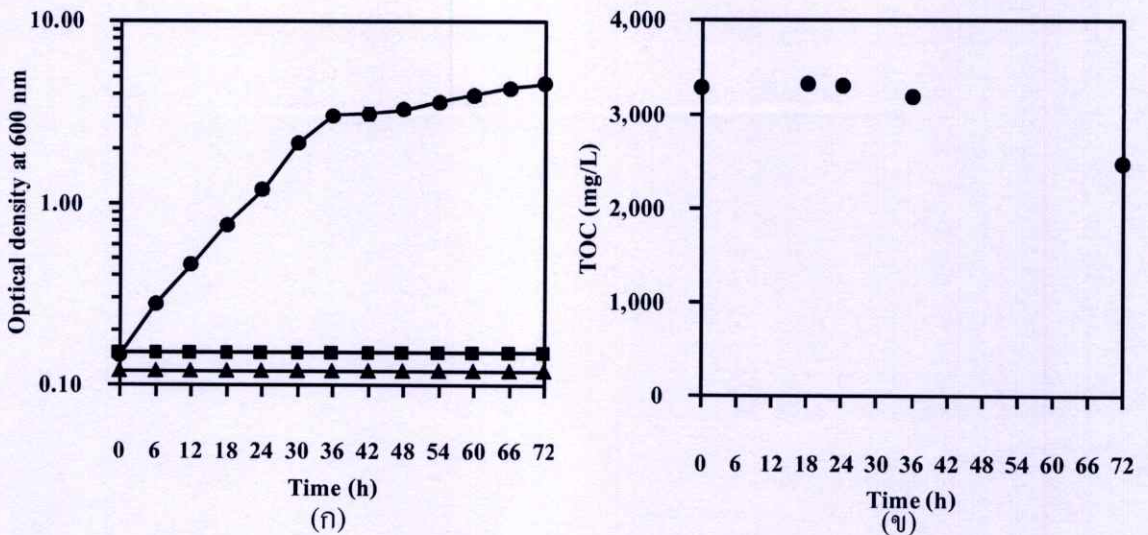
**รูปที่ 4.9** ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (C/N ratio เท่ากับ 20) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อ (◇) = กลูโคส, (■) = ฟรุคโตส, (▲) = แลคโตส, และ (●) = ซูโครส

จากรูปที่ 4.9 พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 สามารถเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ดีในน้ำเสียที่มีกลูโคสหรือฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังจะเห็นได้จากค่าความหนาแน่นโดยอาศัยแสงของสารละลายเซลล์ OD<sub>600</sub> มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0.137 เป็น 4.371 และ 0.142 เป็น 4.344 ตามปริมาณการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ (รูปที่ 4.9 ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเสียที่มีกลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนนาน 18 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียยังเติบโตโดยใช้

ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามค่า OD<sub>600</sub> ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีซูโครสจะมีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับค่า OD<sub>600</sub> ของสารละลายเซลล์ที่เติบโตโดยมีกลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน อีกทั้ง ค่า OD<sub>600</sub> ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน มีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าน้ำตาลอีกสองชนิด ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากกลูโคสและฟรุกโตสจัดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีโครงสร้างอย่างง่าย ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อกับน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มีโครงสร้างซับซ้อน อย่างเช่น ซูโครสหรือแลคโตส ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Wu *et al.*(2010) ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Trichosporon capitatum* โดยใช้กลูโคส, ฟรุกโตส, ซูโครส และแลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาพบว่าเซลล์ของ *Trichosporon capitatum* เติบโตได้ดีในฟรุกโตสและกลูโคส โดยมีปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งเท่ากับ 13.0 และ 12.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองลงไปคือ ซูโครสและแลคโตส โดยมีปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งเท่ากับ 10.6 และ 2.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kaboosi and Behbahani (2012) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดไขมันจำพวกกรดลิโนเลนิก (C18:3) ของเชื้อ *Mortierella isabellina* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน และพบว่าเชื้อรา *Mortierella isabellina* เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเมื่อใช้กลูโคสและฟรุกโตสเทียบกับการใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

#### 4.5.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกรดอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการแปรผันชนิดของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate), กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และกรดบิวไทริก (butyric acid) กำหนดให้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำเสียสังเคราะห์มีค่า C/N ratio เท่ากับ 20 พร้อมกับติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการวัดค่าความหนาแน่นโดยอาศัยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) จนครบ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.10

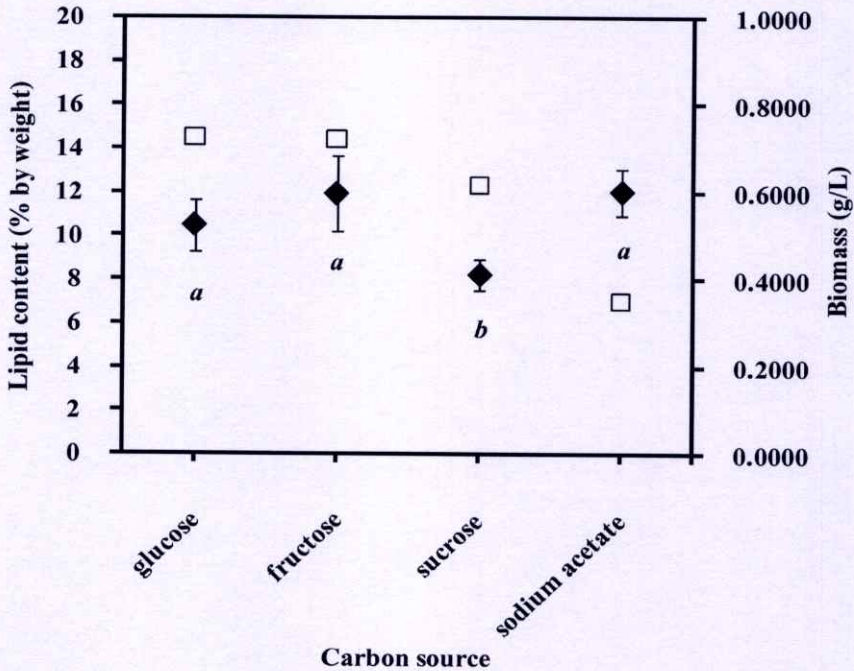


**รูปที่ 4.10** ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $OD_{600}$ ; ก) และปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (Total Organic Carbon, ข) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกรดอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน (C/N ratio เท่ากับ 20) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อโซเดียมอะซิเตท (●), กรดโพธิโอนิก (▲), กรดบิวทริก (■)

จากรูปที่ 4.10 พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 สามารถเติบโตได้ดีในน้ำเสียที่มีโซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในกรดโพธิโอนิกและกรดบิวทริก ดังจะเห็นได้จากค่าความหนาแน่นโดยแสงของสารละลายเซลล์  $OD_{600}$  ที่เพาะเลี้ยงในโซเดียมอะซิเตท มีค่าค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 0.148 เป็น 4.586 สอดคล้องกับปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดที่มีค่าลดลงตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น (รูป 4.10 ข) ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากโซเดียมอะซิเตท ซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่าเมื่อเทียบกับ กรดโพธิโอนิก และกรดบิวทริก ทำให้เซลล์นำไปใช้ในการเติบโตได้ง่ายกว่า และเมื่อเปรียบเทียบ  $OD_{600}$  ของเซลล์ที่เติบโตในน้ำเสียที่มีโซเดียมอะซิเตท (รูปที่ 4.10) กับค่า  $OD_{600}$  ของเซลล์ที่เติบโตในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.9) พบว่าการเติบโตของเซลล์ในน้ำเสียที่มีโซเดียมอะซิเตทเกิดขึ้นได้ช้ากว่า ซึ่งความสามารถในการเติบโตที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำตาลเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในกรดอินทรีย์ระเหยง่ายได้มีการรายงานไว้ทั้งจากการศึกษาการเติบโตของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (Kooij, Visser and Hijnen, 1980) และยีสต์ผลิตไขมันสูง *Yarrowia lipolytica* (Fontanille et al., 2012) โดยการศึกษาการเติบโตของ *Aeromonas hydrophila* พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตและมีระยะ lag phase เพียง 4 ชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในโซเดียมอะซิเตท ทำให้เซลล์มีระยะ lag phase นานขึ้นถึง 2 วัน

#### 4.5.3 การผลิตลิพิดของแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิด

เซลล์ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่เพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมงในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีกลูโคส, ฟรุคโตส, ซูโครส และ โซเดียมอะซิเตท เป็นแหล่งคาร์บอน มาสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipid) ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายและการชั่งน้ำหนักตามวิธีการของ Bligh and Dryer (1959) ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.11



**รูปที่ 4.11** น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน (C/N ratio เท่ากับ 20) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ตัวอักษรที่กำกับบนจุดแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple range test (DMRT)

เมื่อพิจารณาปริมาณลิพิดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 4 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส และ โซเดียมอะซิเตท พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซูโครสมีปริมาณลิพิดต่ำสุด เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอีก 3 ชนิด (รูปที่ 4.11) ในขณะที่ปริมาณลิพิดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในกลูโคส ฟรุคโตส และ โซเดียมอะซิเตท มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค.5 และ ค.6 โดยมีปริมาณลิพิดเท่ากับร้อยละ  $10.49 \pm 1.20$ ,  $11.96 \pm 1.72$  และ  $12.07 \pm 1.05$  โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.11) อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 สามารถเติบโตโดยใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าโซเดียมอะซิเตท ดังจะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส มีค่าสูงกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยใช้

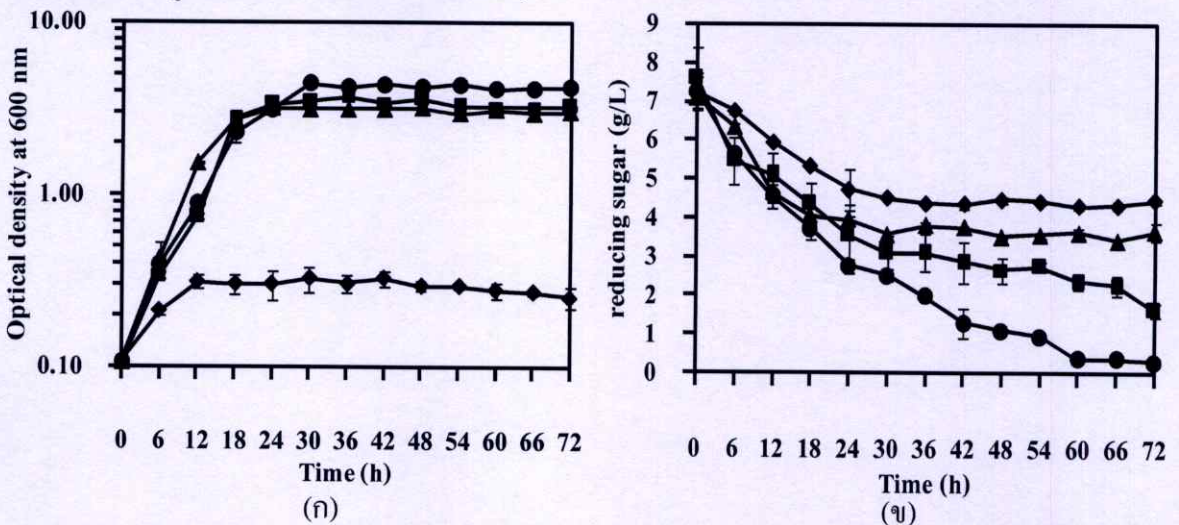
โซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน สอดคล้องกับผลการศึกษาในเรื่องความหนาแน่นโดยแสงของสารละลายเซลล์ที่กล่าวถึงในหัวข้อ 4.5.2 ที่ผ่านมา จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จึงเลือกกลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 สามารถสะสมลิพิดได้ใกล้เคียงกับเมื่อใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จะมีการเจริญเติบโตได้ดีและมีน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่า

#### 4.6 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย

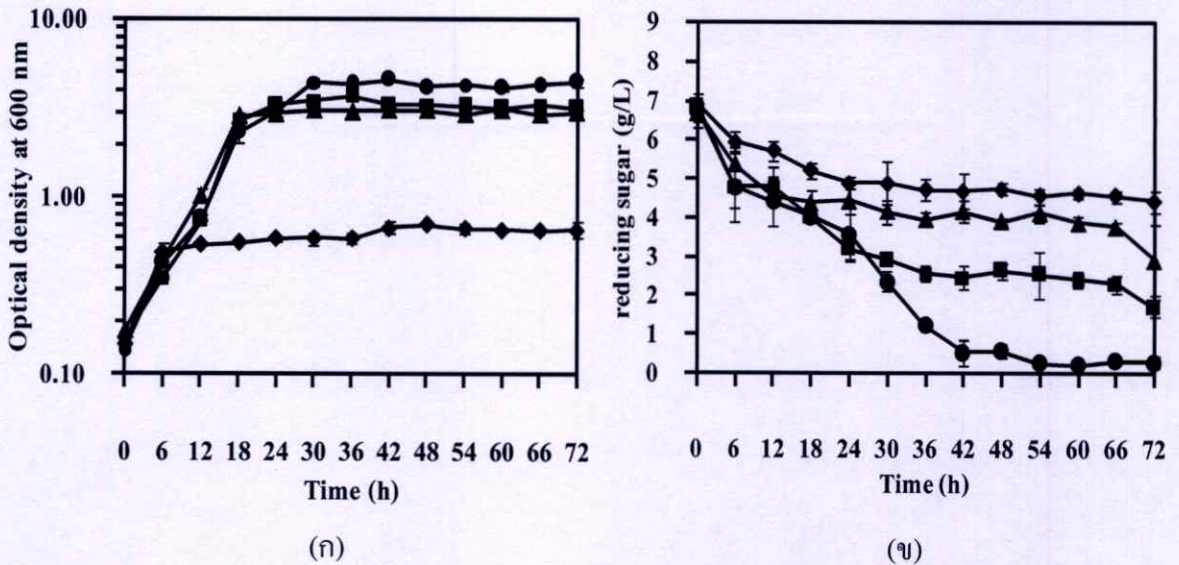
##### *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

##### 4.6.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ทำได้โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ ), โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ), และยูเรีย ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) กำหนดให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนมีค่าคงที่ คือ 0.015 โมลไนโตรเจนต่อลิตร หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 20 โดยมีกลูโคสหรือฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พร้อมกับติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการวัดค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density,  $\text{OD}_{600}$ ) จนครบ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ )



รูปที่ 4.12 ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ , ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ และมีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ (C/N ratio เท่ากับ 20) เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟต (●), ยูเรีย (▲), แอมโมเนียมคลอไรด์ (■) และโซเดียมไนเตรท (◆)



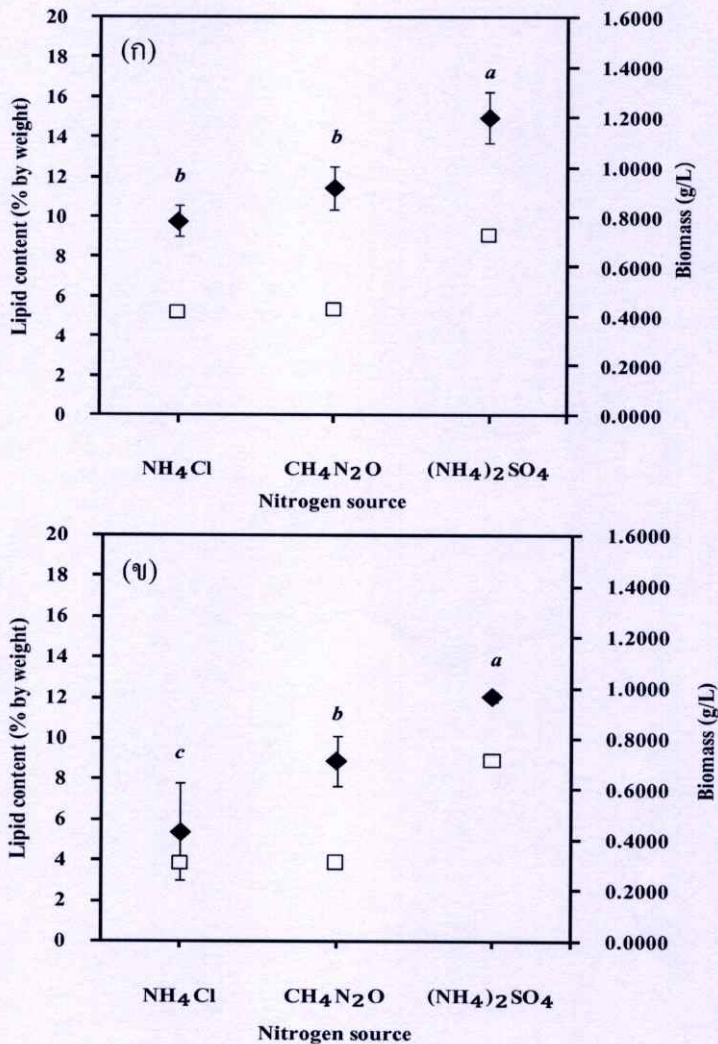
**รูปที่ 4.13** ความหนาแน่น โดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $OD_{600}$ , ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสีย สังกะระห้ที่มีฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ และมีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ (C/N ratio เท่ากับ 20) เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟต (●), ยูเรีย (▲), แอมโมเนียมคลอไรด์ (■) และโซเดียมไนเตรท (◆)

จากรูปที่ 4.12ก และ 4.12ข พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 สามารถใช้ไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตได้ทั้งในรูปสารอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยความสามารถในการใช้ไนโตรเจนแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตได้ดีที่สุด รองลงไปที่คือ แอมโมเนียมคลอไรด์, ยูเรีย และโซเดียมไนเตรท ตามลำดับ ดังจะเห็นได้จากค่า  $OD_{600}$  มีค่าเพิ่มขึ้นมากที่สุดจาก 0.106 เป็น 4.216 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนนาน 72 ชั่วโมง สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น (รูปที่ 4.12 ข) เมื่อพิจารณาการเติบโตของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าผลที่ได้มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 4.13ก และ 4.13ข) จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น จึงเลือกเซลล์ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต, ยูเรีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ ซึ่งมีค่า  $OD_{600}$  สูงสุดสามลำดับแรกไปศึกษาปริมาณลพิษต่อไป

#### 4.6.2 การผลิตลพิษของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

เซลล์ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่เพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมคลอไรด์ และยู

เรีย ยกเว้น โซเดียมไนเตรทถูกนำมาสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipid) ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 น้ำหนักของเซลล์แห้ง ( $\square$ ) และปริมาณลิพิด (Lipid content,  $\blacklozenge$ ) ของแบคทีเรีย

*Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่เติบโตในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน (C/N ratio เท่ากับ 20) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้กลูโคส (ก) หรือฟรุกโตส (ข) เป็นแหล่งคาร์บอน

จากรูปที่ 4.14 พบว่าการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแหล่งไนโตรเจน ปริมาณลิพิดมีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน รองลงไปคือ ยูเรีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยเซลล์มีปริมาณลิพิดเท่ากับร้อยละ  $12.07 \pm 0.63$ ,  $8.92 \pm 0.18$  และ  $5.40 \pm 1.24$  เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.14 ก) เมื่อพิจารณาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตลิพิดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่มีฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนยังมีผลต่อการเติบโตของแบคทีเรีย

*Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ดังจะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในแอมโมเนียมซัลเฟต ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในยูเรียและแอมโมเนียมคลอไรด์จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งในปริมาณใกล้เคียงกัน ผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย

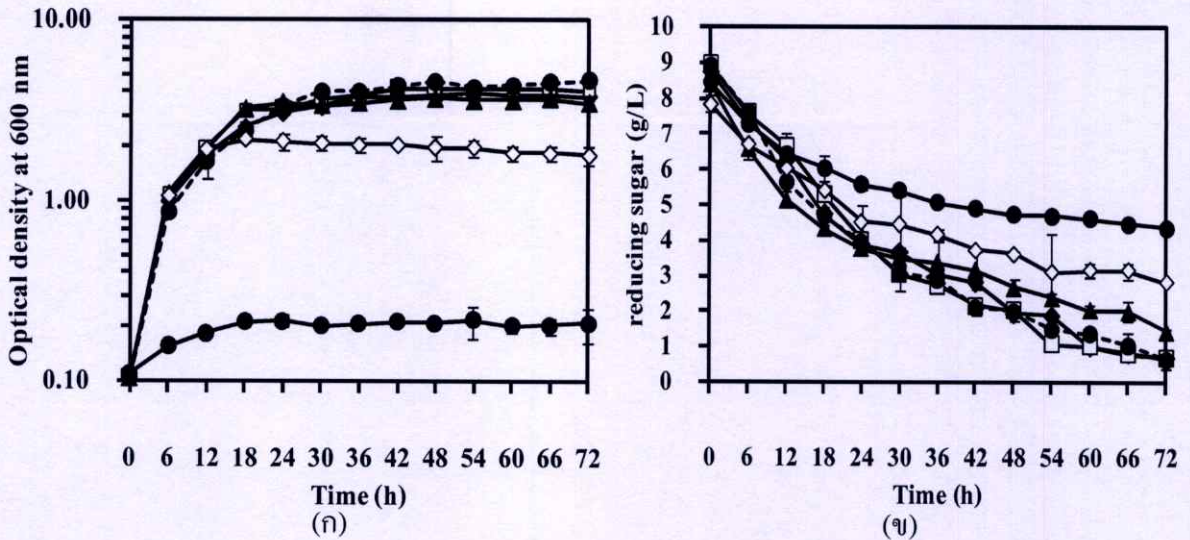
ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของจุลินทรีย์ได้มีการรายงานไว้ทั้งในการศึกษาแบคทีเรีย *Rhodococcus opacus* (Voss and Steinbüchel, 2001) ยีสต์ (Zhu, Zang and Wu, 2008; Evans and Ratledge, 1983) รา *Monascus purpureus* (Rasheva, Kujumdzieva and Hallet, 1997) และสาหร่าย (รัตนภรณ์และงามนิจ, 2553) โดยในงานวิจัยของ Wu *et al.* (2011) ได้ศึกษาผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้งในรูปสารอินทรีย์ในโตรเจนและอนินทรีย์ในโตรเจน ต่อการผลิตลิพิดของเชื้อยีสต์ *Trichosporon capitatum* พบว่าเซลล์ของดังกล่าวจะมีปริมาณลิพิดสูงสุดเท่ากับ 21.50 เปอร์เซ็นต์ (w/w) เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่นเดียวกับในงานวิจัยของอภิเชษฐ์และรัตนภรณ์ (2010) ที่พบว่ายีสต์ไอโซเลท U5/2 ซึ่งคัดแยกได้จากดินตัวอย่าง มีปริมาณลิพิด (23.26 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง) สูงที่สุดเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน รองลงไปคือ ยูเรีย โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในโซเดียมไนเตรทมีปริมาณลิพิดต่ำสุด

#### 4.7 ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย

##### *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

###### 4.7.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน ทำได้โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นดังนี้คือ 0, 0.1, 1, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 0, 200, 20, 10, 3.75 และ 2 กำหนดให้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมทั้งการเจริญและการผลิตลิพิดของเซลล์ (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 4.6) พร้อมกับติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการวัดค่าค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) จนครบ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.15 )

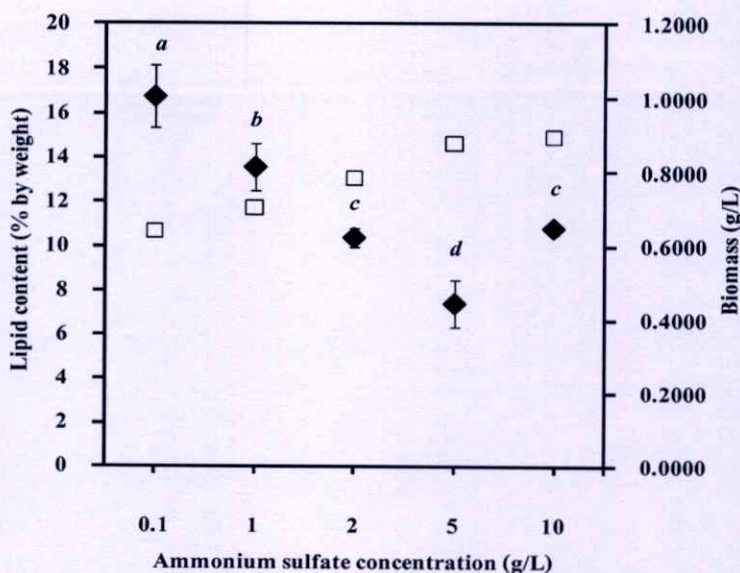


รูปที่ 4.15 ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $OD_{600}$ , ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่แตกต่างกัน เมื่อ (●) = 0 g/L, (◇) = 0.1 g/L, (●) = 1 g/L, (▲) = 2 g/L, (□) = 5 g/L และ (◆) = 10 g/L

จากรูปที่ 4.15ก และ 4.15ข พบว่า  $OD_{600}$  มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น ในทุกระดับของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำการทดสอบ สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นได้น้อยกว่าในน้ำเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในระดับที่ต่ำกว่า โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีค่าลดลงจาก 8.433 กรัมต่อลิตร เหลือ 4.341 กรัมต่อลิตร ในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน (ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.1 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงจาก 7.848 กรัมต่อลิตร เหลือ 2.804 กรัมต่อลิตร

#### 4.7.2 การผลิตลิพิดของแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์

จากการนำเซลล์ของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่เพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมง ในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตแตกต่างกัน มาสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipid) ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายและการชั่งน้ำหนักตามวิธีการของ Bligh and Dryer (1959) ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย

*Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่เติบโตเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน และมีการใช้กลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.16 พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนมีผลต่อการเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่ทำการศึกษา การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 0.1 กรัมต่อลิตร เป็น 10 กรัมต่อลิตร ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.6385 เป็น 0.8918 กรัมต่อลิตร ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของไนโตรเจนต่อการสร้างเซลล์ของแบคทีเรีย ไนโตรเจนจัดเป็นองค์ประกอบสำคัญของสารชีวโมเลกุลที่สำคัญหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และโคเอนไซม์ ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทและหน้าที่สำคัญในเซลล์ของจุลินทรีย์ (Todar, n.d.) ดังนั้นการขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร จะทำให้การสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดได้ช้าลงหรือหยุดไป จนส่งผลต่อการเติบโตและน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียในทางกลับกันพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 0.1 เป็น 5 กรัมต่อลิตร ทำให้การผลิตลิพิดมีแนวโน้มลดลงจากร้อยละ  $16.74 \pm 1.43$  โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นร้อยละ  $7.40 \pm 1.06$  ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ต่ำกว่า จะทำให้การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน ซึ่งเป็นกระบวนการใช้ NADPH ช้าลงหรือหยุดไป ทำให้เกิดการสะสม NADPH ในเซลล์และ NADPH นี้จึงถูกนำไปสร้างกรดไขมัน ทำให้มีการสะสมลิพิดหรือไขมันเพิ่มขึ้น (มณฑุเทพ, 2533)

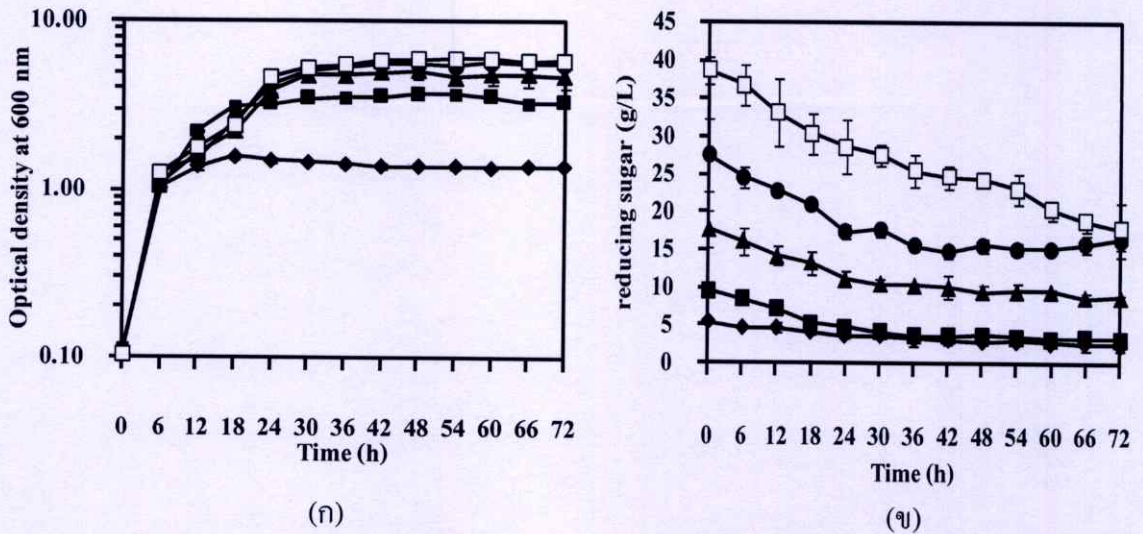
ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนต่อปริมาณเซลล์และการสะสมลิพิด มีรายงานทั้งจากการศึกษาแบคทีเรียสกุล *Rhodococcus* sp. และจากจุลินทรีย์สะสมน้ำมันอื่นๆ เช่น ยีสต์ (มณฑุเทพ, 2533; อภิเชษฐ และรัตนภรณ์, 2553; Saxena *et al.*, 1998) รา (Rasheva, Kojumdzieva and Hallet, 1997) และสาหร่าย (รัตนภรณ์ และงามนิจ, 2553) งานวิจัยของ Alvarez, Kalscheuer and

Steinbüchel (2000) ได้ศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียต่อการผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerols, TAGs) ของ *Rhodococcus opacus* PD630 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลง หรืออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงขึ้นในการเลี้ยงแบบ batch แบบที่เรียจะสะสมลิพิดได้มากขึ้นกว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำกว่า โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ให้ปริมาณลิพิดสูงสุดจากการศึกษาคือ 0.05 กรัมต่อลิตร จะให้ TAGs 75 เปอร์เซ็นต์ (กรัมของไขมันต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ อภิเชษฐ์ และรัตนภรณ์ (2553) ซึ่งศึกษาการผลิตลิพิดของยีสต์ไอโซเลท U5/2 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินพบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มขึ้นจาก 0.1 กรัมต่อลิตร เป็น 0.3 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้น แต่ในยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์มากขึ้น จะมีการผลิตลิพิดที่ต่ำลงจาก 21.78 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เป็น 11.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ดังนั้นในการศึกษาการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งให้ปริมาณลิพิด (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) สูงที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

#### 4.8 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

##### 4.8.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) แตกต่างกัน ทำได้โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสดังนี้คือ 4.5, 9, 18, 28 และ 35 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตคงที่เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 100, 200, 400, 600 และ 800 พร้อมกับติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการวัดค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) จนครบ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.17

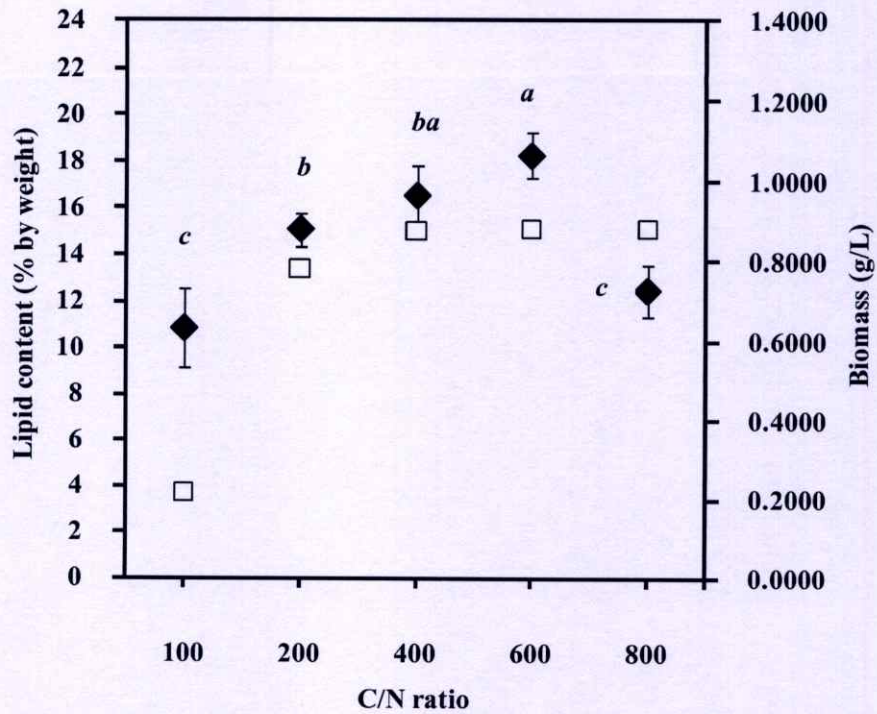


รูปที่ 4.17 ความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ( $OD_{600}$ , ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ข) ของแบคทีเรีย *Aeromonas sp. KMITL-R4.4* ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี C/N ratio ต่างกัน เมื่อ (◆) = 100, (■) = 200, (▲) = 400, (●) = 600 และ (□) = 800 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.17ก พบว่าการเพิ่มปริมาณของกลูโคสหรือค่า C/N สูงขึ้น จะทำให้เซลล์เติบโตได้ดีขึ้น โดยความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มจาก 4.5 กรัมต่อลิตร เป็น 9 กรัมต่อลิตร หรือ C/N จาก 100 เป็น 200 จะทำให้ค่า  $OD_{600}$  มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.491 เป็น 1.178 เมื่อใช้เวลาเพาะเลี้ยงเซลล์นานเท่ากันคือ 36 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสจาก 18 กรัมต่อลิตร เป็น 35 กรัมต่อลิตร หรือค่า C/N เพิ่มขึ้นจาก 400 เป็น 800 พบว่า ค่า  $OD_{600}$  ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกันแต่จะมีค่าสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มี C/N เท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของค่า  $OD_{600}$  ที่เป็นผลจากการเพิ่มค่า C/N มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N สูงกว่า จะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงได้มากกว่า (รูปที่ 4.17ข) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีการใช้กลูโคสเป็นสารอาหารเพื่อการเติบโตของเซลล์

#### 4.8.2 การผลิตลิพิดของแบคทีเรียในน้ำเสียสังเคราะห์

จากการนำเซลล์ของแบคทีเรีย *Aeromonas sp. KMITL-R4.4* ที่เพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้น หรือค่า C/N ratio สูงขึ้น มาสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ (crude lipid) ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายและการขังน้ำหนักรวมตามวิธีการของ Bligh and Dryer (1959) ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 น้ำหนักของเซลล์แห้ง (□) และปริมาณลิพิด (Lipid content, ◆) ของแบคทีเรีย

*Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ที่เติบโตเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสหรือค่า C/N ratio โดยมีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

จากรูปที่ 4.18 พบว่าค่า C/N ratio ที่เพิ่มสูงขึ้นจาก 100 เป็น 400 เนื่องจากการเพิ่มปริมาณกลูโคสและจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนในน้ำเสียสังเคราะห์จะทำให้แบคทีเรียมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่ม C/N ratio จาก 400 เป็น 800 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากที่สภาวะดังกล่าวไนโตรเจนที่มีอยู่อย่างจำกัดในระบบอาจไม่เพียงพอต่อการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ (รัตนภรณ์, 2551) เมื่อพิจารณาผลของค่า C/N ต่อการผลิตลิพิดของเซลล์ พบว่าการเพิ่มค่า C/N จาก 100 เป็น 600 ทำให้แบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 สามารถสะสมลิพิดได้ดีขึ้นจากร้อยละ  $10.81 \pm 1.71$  โดยน้ำหนักแห้ง เป็นร้อยละ  $18.30 \pm 0.94$  โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นค่าปริมาณลิพิดสูงสุดที่ได้จากการศึกษา ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มค่า C/N ด้วยการเพิ่มปริมาณกลูโคสและจำกัดแหล่งไนโตรเจนสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่อย่างจำกัดในน้ำเสียสังเคราะห์ จะทำให้เซลล์ลดการใช้ NADPH ในการสังเคราะห์โปรตีนหรือการเจริญ ส่งผลให้เกิดการสะสมของ NADPH สูงขึ้น และผลักดันให้เซลล์เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ลิพิดมากขึ้น (มณฑุเทพ, 2533; Yamane *et al.*, 1997 และ Johnson and Schroeder, 1996 อ้างถึงในรัตนภรณ์, 2551) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มค่า C/N ด้วยการเพิ่มปริมาณกลูโคสและจำกัดแหล่ง

ไนโตรเจนสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย แต่เมื่อเพิ่มค่า C/N ให้สูงขึ้นจาก 600 เป็น 800 หรือมีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 28 กรัมต่อลิตร เป็น 35 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์จะมีการผลิตลิพิดลดลงเหลือร้อยละ  $12.50 \pm 1.11$  โดยน้ำหนักแห้ง แสดงให้เห็นว่าปริมาณกลูโคสที่สูงจนเกินไป จะทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเซลล์และการผลิตลิพิดของแบคทีเรียได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของยีสต์ไอโซเลท OYS3 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน (รัตนภรณ์, 2551) และยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 (Li *et al.*, 2007) โดยงานวิจัยทั้งสองฉบับพบว่ายีสต์ที่ทำการศึกษา มีการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสสูงกว่า 90 กรัมต่อลิตร และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

## บทที่ 5

### สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็ง พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลิพิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่ได้แบคทีเรียทั้งหมด 12 ไอโซเลท จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่ส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างท่อน โดยแบคทีเรียไอโซเลท R4.4 จัดเป็นแบคทีเรียที่ผลิตลิพิดได้สูงสุด
2. ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Aeromonas* sp. จึงตั้งชื่อว่า *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4
3. ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียในช่วงต้นของระยะพักตัว (early stationary phase) ซึ่งคือ 36 ชั่วโมง สามารถผลิตลิพิดได้ดีที่สุด เมื่อใช้กลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยปริมาณลิพิดมีค่าระหว่างร้อยละ  $11.58 \pm 0.23$  ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
4. ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 พบว่าแบคทีเรียสามารถเติบโตและผลิตลิพิดได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียที่ใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณลิพิดที่ผลิตได้มีค่าระหว่างร้อยละ  $15.01 \pm 0.77$  และ  $12.07 \pm 0.24$  ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อเซลล์เติบโตในน้ำเสียสังเคราะห์มีค่า C/N เท่ากับ 20
5. ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พบว่าเซลล์แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและผลิตลิพิดได้สูงสุด เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปริมาณการผลิตลิพิดมีค่าร้อยละ  $16.74 \pm 1.43$  ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
6. ผลการศึกษาของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญและผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 พบว่าการเพิ่มค่า C/N ratio ด้วยการเพิ่มปริมาณกลูโคสและจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะทำให้เซลล์ผลิตลิพิดได้สูงขึ้น โดยการผลิตลิพิดเกิดขึ้นได้สูงสุดร้อยละ  $18.27 \pm 0.93$  ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปัจจัยของสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เช่น พีเอช, อุณหภูมิ แร่ธาตุ หรือวิตามินชนิดต่างๆ
2. ควรศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในแหล่งคาร์บอนราคาถูกรชนิดอื่นๆ เช่น กากน้ำตาล, กลิเซอรอล, น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อลดต้นทุนการผลิต
3. ควรศึกษาการผลิตลิพิดด้วยระบบแบบป้อน (Fed batch) ที่มีการเติมกลูโคสหรือแหล่งคาร์บอนเป็นช่วงๆ เพื่อหาแนวทางการเพิ่มผลผลิตลิพิด

## เอกสารอ้างอิง

- เกศระวี ปานทับ, ณพร โกไศยกานนท์ และสุทธิมา หล่มหลัก. 2554. การใช้ประโยชน์ของไขมันโค เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ.2554.
- กุสุมา พรหมสีดา. 2552. องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์. ปรินูญานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ.2553.
- จักรพงษ์ ไชยบุรี. 2553. การทดสอบเครื่องย่นต์เกษตรที่ใช้ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ. วารสาร มหาวิทยาลัยทักษิณ. ปีที่ 12 ฉบับที่ 3 ตุลาคม 2552-มกราคม 2553.
- ดาวลัย ฉิมภู. 2538. โมเลกุลชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเคมี. มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ครุณ โกฎินนัสวนิชย์ และทิมมพร กุยกานนท์. 2547. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์ 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา. คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์. มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ธันวา ไวยบท. 2542. เทคนิคอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.
- นิพนธ์ อุดมสันติสุข. 2552. [Online] **แบคทีเรียคืออะไร**. สืบค้นข้อมูลได้ที่ <http://www.micro.md.chula.ac.th> สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม 2552.
- นิสากร ดอนกระสินธ์. 2545. การนำกากไขมันจากปอดักไขมันของสถานที่จำหน่ายอาหารมาผสมกับขี้เลื่อยเพื่อเป็นเชื้อเพลิงแท่ง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหิดล. พ.ศ.2545.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. จุลินทรีย์น้ำรั้ว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : องค์การค้ำของคुरुสภา. พิมพ์ที่โรงพิมพ์คुरुสภาลาดพร้าว.
- ปฎิมา ไพนุพงษ์. 2554. การวิเคราะห์ปริมาณร้อยละ Methyl Ester ในไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันทอดใช้แล้วและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม. สถาบันวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนจากน้ำมันปาล์มและพืชน้ำมัน และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ผกาวิดี แก้วกันเนตร และอรวรรณ ผาจันทร์. 2553. เชลล์เชื้อเพลิงชีวภาพ : พลังงานแห่งอนาคต. ปีที่ 18, ฉบับที่ 1 มกราคม-มีนาคม 2553.
- พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล. 2549. กรดไขมัน. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 21, 4 : 51-56.

- ไพฑูรย์ สุขสถาวรพันธุ์.2537.การสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นที่อยู่ตัวโดยยีสต์และวิธีทางเคมี  
วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี สถาบัน  
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. พ.ศ.2537.
- พวงผกา คำรัตนา และพิมพ์พรณ ดันสกุล. 2549. ผลของช่วงแสงต่อการเติบโตและปริมาณ  
ไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูป  
อาหารทะเล. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. วทท.28(1) : 99-105.
- ภัทร อุณยะวงษ์, นพวรรณ พิพัฒนานุกุล, กนกพร เจริญสุข และปรภาวี ประเสริฐทิพย์ชัย. 2551.  
[Online]. สารชีวโมเลกุล. สืบค้นได้ที่ <http://www.room601.ob.tc/Lipid.html> สืบค้นข้อมูล  
เมื่อกันยายน 2553.
- ภัทรชัย กิรติสิน. 2549. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. คณะแพทยศาสตร์ศิริราช  
พยาบาล. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- มนูเทพ กนกศิลป์. 2533. ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตกรดไขมันของยีสต์ *Rhodotorula*  
*gracilis*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะพลังงานและวัสดุ. พ.ศ.2553.
- ยศวดี สวัสดิ์รักษา. 2547. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงใน  
น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. พ.ศ.2547.
- รังสินี ไสธร. 2550. เคมีและจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ :  
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัตนภรณ์ ลีสิงห์. 2551. การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง. KKU Sci J. 36(2) :  
2008.
- รัตนภรณ์ ลีสิงห์ และงามนิจ นนทโส. 2553. การผลิตน้ำมันจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้  
การเพาะเลี้ยงแบบเฮโทรโทรฟิก. KKU Res J. 15(9) : September 2010.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์.
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2553 [Online]. โปรรารีโอด. สืบค้นได้ที่ [http://th.wikipedia.org/wiki/โพร](http://th.wikipedia.org/wiki/โพรคาร์ริโอด)  
คาร์ริโอด สืบค้นข้อมูลเมื่อ กันยายน 2553.
- ศุภยงค์ วรวิฑูญชัย. 2547. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ. พิมพ์ครั้งที่  
1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สนธิชัย จันทร์เปรม. 2552. พืชพลังงานทดแทน. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร. ปีที่ 1,  
ฉบับที่ 2. เมษายน-มิถุนายน พ.ศ. 2552.

- เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. 2547. **แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์.**  
สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- อภิเชษฐ์ ศรีวิชา และรัตนภรณ์ ลีสิ่งห์. 2553. **การผลิตลิปิดโดยยีสต์ไขมันสูงเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล.** การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา. ครั้งที่ 11. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Anderson, R.A. 1992. Diversity of eukaryotic algae. **Biodiversity Conservation.**, 1, 267-292.
- Alvarez, H.M., Kalscheuer, R., Steinbüchel, A. 2000. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 54, 218-223.
- Alvarez, H.M., Steinbüchel, A. 2003. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 60, 367-376.
- Azeem, A., Neelagund, Y.F. and Rathod, V. 1999. Biotechnological production of oil: Fatty acid composition of microbial oil. **Plant Foods for Human Nutrition.** 53, 381-386.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.** 37, 911-917.
- Canonica, F. P. and Pisano, M. A. 1987. Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae*. **Journal of Clinical Microbiology.** Apr., 681-685.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advance.** 25, 294-306.
- Daron., H.H. 1969. Fatty acid composition of lipid extracts of a thermophilic *Bacillus* species. **Journal of Bacteriology.** Jan., 145-151.
- Dayananda, C., Sarada, R., Bhattacharya, S., Ravishankar, G.A. 2005. Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. **Process Biochemistry.** 40, 3125-3131.
- Demirbus A.. 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. **Applied Energy.** 86, 5108-5117.
- Enweremadu C.C. and Mbarawa M.M. 2009. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil-A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** 13, 2205-2224.
- Escobar, E. L., Gomes-Marcondes, M. C. and Carvalho, H. F. 2009. Dietary fatty acid quality affects AR and PPARgamma levels and prostate growth. **Prostate.** 69, 548-558.

- Fargione, J., Hill, J., Tilman, D., Polasky, S. and Hawthorne, P. 2008. Lipid and clearing and the biofuel carbon debt. **Science**. 319(5867), 1235-1238.
- Food Wiki. 2011. [Online] **Bacteria**. Retrieved on 26 May<sup>th</sup>, 26 2011 Available from <http://www.foodnetworksolution.com/vocab/word/197>.
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R. and Laroche, C. 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**. 114, 443-449.
- Goecke, F., Hernandez, Bittner, M., Gonzalez, M., Becerra, J., Silva, M. 2010. Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. **Revista de Biología Marine y Oceanografía**. 45(2), 325-330.
- Gouda, M.K., Omar, S.H., Aouad, L.M. 2008. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 24, 1703-1711.
- Gottschalk, G. 1985. **Bacterial Metabolism**. New York : Springer-Verlag.
- Hongxiang, X., Min, W., Xiaogu, W., Junyi, Y. and Chunsheng, W. 2008. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean. **Acta Ecologica Sinica**. 28(2), 479-485.
- Kaboosi, H., Behbahani, B. 2012. An overview on effective parameters in production of single cell oil by microorganisms especially the fungus of *Mortierella isabellina*. **Annals of Biological Research**. 3, 3, 1650-1654.
- Kooji, D.V.D, Visser, A., and Hijenen, W.A.M. 1980. Growth of *Aeromonas hydrophila* at Low Concentrations of Substrates Added to Tap Water. **Applied and Environmental Microbiology**. 1198-1204.
- Lee, W., Kang, S., Shin, H. 2003. Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors. **Journal of Membrane Science**. 216, 217-227.
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F. 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme Microb. Technol.** 41, 312-317.
- Li, Q., Du, W., Liu, D. 2008. Perspective of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 80, 749-756.
- Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., Zhou, B.-C. 2007. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**. 99, 4717-4722.

- Lu, X., Vora, H., Khosla, C. 2008. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: Implications for biodiesel production. **Metabolic Engineering**. 10, 333-339.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganism. **Renewable Energy**. 34, 1-5.
- Miao, X., and Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**. 97, 841-846.
- Nigam, P.S., and Singh, A. 2010. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**. 1-17.
- Olukoshi, E.R. and Packter, N.M. 1994. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces* : possible carbon source for antibiotics. **Microbiology**. 140, 931-943.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G. 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 58, 308-312.
- Patnayak S. and Sree A. 2005. Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. **Applied Microbiology**. 40, 358-363.
- Rattedge, C. and Wynn, J.P. 2002. **The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms**. Advance Applied Microbiology. 51,1-51.
- Rasheva T.V., Kujumdzieva A.V. and Hallet J.N. 1997. Lipid production by *Monascus albino* strain. **Journal of Biotechnology**. 56, 217-224.
- Röttig, A., Wenning, L., Bröker, D., and Steinbüchel, A. 2010. Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 85, 1713-1733.
- Saxena, V., Sharma, C.D., Bhagat, S.D., Saini, V.S., Adhikari, D.K. 1998. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhotorula minuta*. **JAOCS**. 75, 4.
- Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J. and Smith, A.G. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects, **Current Opinion in Biotechnology**. 21, 277-286.
- Siangjao, S., Gheewala S.H., Unnanon K., Chidthaisong, A. 2011. Implications of land use change on the life cycle greenhouse gas emissions from palm biodiesel production in Thailand. **Energy for Sustainable Development**. 15, 1-7.

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae, **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 101, 87-96.
- Tutunea, D. 2008. Biodiesel technology. **ANNALS OF THE ORADEA UNIVERSITY**. Fascicle of Management and Technological Engineering. VII, XVII.
- Vicente, G., Bautista, F., Rodriguez, R., Gutierrez, F., J., Sadaba, I., Vazquez, R.M.R., Martovez, S.T. and Garre, V. 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus, **Biochemical Engineering Journal**. 9 July 2009.
- Voss, I. and Steinbüchel, A. 2001. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus* for lipid production at a pilot-plant scale. **Applied Microbiology Biotechnology**. 55, 547-555.
- Wu, H., Li, Y., Chen, L. and Zong, M. 2011. Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum*. **Applied Energy**. 88, 138-142.
- Xue, F., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. 2006. A new method for preparing raw material for biodiesel production. **Process Biochemistry**. 41, 1699-1702.
- Zhu, L.Y., Zong, M.H. and Wu, H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresource Technology**. 99, 7881-7885.
- Zifeng, W., Tian, X. and Shaojun, P. 2008. Isolation and identification of bacteria associated With the surfaces of several algal species. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**. 27, 3, 487-492.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

## ภาคผนวก ก

### ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Lauria Bertani (LB)

#### ส่วนประกอบ

เปปโตน (Peptone)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### ก.2 น้ำเลี้ยงสังเคราะห์

สูตรน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษาคัดแปลงจาก Lee *et al.* (2003) ที่เลือกใช้สูตรอาหารนี้เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารอาหารขั้นพื้นฐานที่แบคทีเรียต้องการครบถ้วน ซึ่งประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลัก (nutrients) ได้แก่ carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur และธาตุอาหารรอง (trace elements) ได้แก่ zinc, cobalt, copper และ molybdenum เป็นต้น สารอาหารต่างๆ ที่กล่าวมานี้แบคทีเรียจำเป็นต้องใช้ในการสร้างโครงสร้างของเซลล์และใช้ในการทำงานของเซลล์ เพื่อการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ และการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรีย

#### ส่วนประกอบ

กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ )	แปรผันค่า	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ )	แปรผันค่า	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	2.50	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2.10	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	5.07	กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.44	กรัมต่อลิตร
เฟอร์ริกคลอไรด์ ( $FeCl_3$ )	1.45	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	0.40	กรัมต่อลิตร
โคบอลตคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )	0.42	กรัมต่อลิตร
โซเดียม โมลิบเดตไดไฮเดรต ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ )	1.26	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	0.37	กรัมต่อลิตร

แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.28	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	30.0	มิลลิกรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณลิพิด

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณลิพิดในเซลล์ของแบคทีเรียอ้างอิงตามวิธีการของ Bligh และ Dyer โดยมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้

1. ชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่ 0.2 กรัม เติมน้ำทำละลายผสมระหว่าง คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1:2 (ปริมาตร 7 มิลลิลิตรและ 14 มิลลิลิตร ตามลำดับ) ทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที
2. เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 7 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที
3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 7 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น 15 นาที
4. ดูดส่วนล่างของคลอโรฟอร์มไปใส่ขวดกั่นกลมที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนัก
5. ทำการสกัดแบบเดิมซ้ำอีกครั้ง ดูดสารที่สกัดได้ลงในขวดกั่นกลมในข้อที่ 4 นำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) สภาพะที่ใช้ในการระเหยคือ ความดัน 200 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ  $70 \pm 2$  องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องทำความเย็น (Cooling)  $20 \pm 2$  องศาเซลเซียส
6. นำขวดกั่นกลมที่ผ่านการระเหยแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นในซิเคเตอร์ (Dessicator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักขวดกั่นกลม จำนวนหาปริมาณในแบคทีเรียโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณลิพิด (\% โดยน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักขวดอบแห้งหลังสกัด} - \text{น้ำหนักขวดอบแห้งก่อนสกัด}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}} \times 100$$

### ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อ้างอิงตามวิธี Somogyi Nelson's method (1952), อ้างถึงใน เกตุมุกฎา (2543) มีรายละเอียดวิธีการทำดังนี้คือ

#### การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย Copper reagent เตรียมโดย

1.1 ละลาย 10 กรัม Copper sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ใน 100 มิลลิลิตรของน้ำกลั่น

1.2 เตรียม Phosphate-tartrate solution โดยละลาย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  70.55 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium potassium tartrate (Tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 นอร์มอล Sodium Hydroxide (NaOH) 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  120 กรัม ทำให้ละลาย จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ถึงขีด 900 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองออกด้วยกระดาษ Whatman no.4

1.3 ผสมสารละลายในข้อ 1.1 และข้อ 1.2 ผสมให้เข้ากัน

2. สารละลาย Arsenomolybdate reagent เตรียมโดย

2.1 ละลาย Ammoniummolybdate ( $\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acid (Conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2 ละลาย Disodium arsenate ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

2.3 ผสมสารละลายในข้อ 2.1 และข้อ 2.2 เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ถึงขีด 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และควรเก็บในขวดสีชา

#### การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1. ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตาราง

ตารางที่ ก.1 ตารางแสดงการปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นสารละลาย กลูโคสมาตรฐาน ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ปริมาตร สารละลาย กลูโคส (mL)	ปริมาตรน้ำกลั่น (mL)	ปริมาตรรวม (mL)
0	0	1.0	1.0
10	0.1	0.9	1.0
20	0.2	0.8	1.0
30	0.3	0.7	1.0
40	0.4	0.6	1.0
50	0.5	0.5	1.0
60	0.6	0.4	1.0
70	0.7	0.3	1.0
80	0.8	0.2	1.0
90	0.9	0.1	1.0
100	1.0	0	1.0

2. ทำเบลนค์ (blank) ทำเช่นเดียวกับสารละลายกลูโคสแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาลกลูโคส

3. เติมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด

4. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที วางลูกแก้วบนปากหลอดทดลองจากนั้นนำมาทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ

5. เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent อีกหลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงิน ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาล

6. เติมน้ำกลั่นอีกหลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

8. นำค่าการดูดกลืนแสงไปพล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (แกน x)

#### การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1. ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที (วางลูกแก้วบนปากหลอดทดลอง) จากนั้นนำมาทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ

4. เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที

5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

7. คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากหัวข้อก่อนหน้า

### ก.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC)

การวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ทั้งหมด (Total Organic Carbon) อ้างอิงตาม SHIMAZZU CORPORATION (2001) มีรายละเอียดวิธีการดังนี้คือ

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Total Carbon (TC)

1. ชั่ง Potassium hydrogen phthalate (KHP) มา 0.1063 กรัม ละลายใน Zero water

2. ถ่ายสารละลายลงขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีด 50 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Inorganic Carbon (IC)

1. ชั่ง Sodium hydrogen carbonate ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ) มา 0.3500 กรัม ละลายใน Zero water

2. ถ่ายสารละลายลงขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีด 50 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

### การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. นำสารละลายตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีด 100 มิลลิลิตร
3. กรองสารละลายตัวอย่างด้วย Syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial

### วิธีการวิเคราะห์

1. ถ่ายสารละลายมาตรฐาน TC หรือ IC ลงในขวดแก้ว (vial)
2. นำขวดแก้ว (vial) ที่มีน้ำตัวอย่าง ใส่ในช่องที่บรรจุตัวอย่าง
3. วิเคราะห์น้ำตัวอย่างด้วยเครื่อง Total Organic Carbon Analyzer ซึ่งใช้ระบบการทำงาน

Combustion-Non-dispersive infrared (NDIR) detector

4. นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน TC และ IC ไปพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบนแกน x
5. วิเคราะห์น้ำตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกัน นำค่าพื้นที่ใต้กราฟไปคำนวณหาความเข้มข้นของ TC และ IC ในน้ำตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานของ TC และ IC ตามลำดับ
6. คำนวณความเข้มข้นของ TOC จากผลต่างระหว่างความเข้มข้นของ TC และ IC

## ภาคผนวก ข

**ตารางที่ ข.1** ค่าความหนาแน่น โดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) ของสารละลายเซลล์ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ใน

LB Broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ลำดับที่	ไอโซเลท													
		Y1.1	W2.1	W2.2	W2.3	C3.1	C3.2	C3.3	R4.1	R4.2	R4.3	R4.4	R4.5		
0	1	0.117	0.109	0.140	0.120	0.122	0.128	0.111	0.103	0.105	0.115	0.120	0.107		
	2	0.117	0.109	0.140	0.120	0.122	0.128	0.111	0.103	0.105	0.115	0.120	0.107		
6	1	0.532	0.497	0.609	0.591	0.563	0.635	0.767	0.627	0.541	0.706	0.718	0.523		
	2	0.522	0.474	0.684	0.604	0.591	0.654	0.616	0.626	0.508	0.794	0.676	0.592		
12	1	1.500	1.514	1.238	1.044	1.348	1.456	1.274	1.528	1.238	1.522	1.266	1.198		
	2	1.466	1.340	1.096	1.089	1.340	1.444	1.306	1.392	1.194	1.508	1.288	1.298		
24	1	4.616	4.824	4.720	4.080	4.506	4.864	5.960	4.464	4.128	3.414	3.894	3.426		
	2	5.856	4.176	4.568	4.074	4.068	5.680	5.760	3.924	4.368	3.450	3.510	4.170		
30	1	4.494	5.536	4.600	4.788	4.376	5.520	5.160	4.512	3.960	3.726	3.806	3.912		
	2	4.710	5.088	4.528	4.566	4.400	5.016	4.956	4.236	4.344	3.276	3.842	4.440		
36	1	3.918	5.312	4.204	4.648	4.224	4.072	4.660	4.362	4.164	3.408	3.952	4.680		
	2	3.952	5.072	4.220	4.788	4.512	4.618	4.528	3.948	4.326	3.282	3.944	4.652		
48	1	3.832	5.088	4.240	4.728	3.702	4.464	4.672	4.192	4.302	3.346	3.924	4.002		
	2	3.776	5.264	4.168	4.326	3.456	4.208	4.784	3.552	4.134	3.342	3.976	4.098		
54	1	3.696	4.976	4.032	4.344	3.402	4.440	4.232	4.040	4.224	3.310	3.940	3.690		
	2	3.856	5.368	3.736	4.050	3.630	4.336	4.212	3.496	3.696	3.380	3.970	4.296		

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ลำดับที่	ไฮโดรเลท														
		Y1.1	W2.1	W2.2	W2.3	C3.1	C3.2	C3.3	R4.1	R4.2	R4.3	R4.4	R4.5			
60	1	3.674	4.856	4.016	3.852	3.126	4.446	4.352	3.648	3.848	3.306	3.802	2.988			
	2	3.536	4.968	3.720	3.474	3.346	4.326	4.128	3.488	3.900	3.334	3.676	3.738			
72	1	3.512	4.536	4.072	3.498	2.712	3.654	4.232	3.504	3.714	3.086	3.018	3.792			
	2	3.680	4.684	3.456	3.312	2.778	3.948	4.184	3.536	3.762	3.046	3.090	4.008			

ตารางที่ ข.2 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิพิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย  
ใน LB Broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

รหัส เชื้อ	ปริมาตร สุทธิของ อาหารที่ ใช้เลี้ยง เชื้อ (mL)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง ที่ได้ (กรัม)	น้ำหนักเซลล์ แห้งทั้งหมดที่ ได้และที่ใช้ ในการสกัด (กรัม)	น้ำหนักขูดอบแห้ง (กรัม)		น้ำหนัก ลิพิดที่สกัด ได้(กรัม)
				ก่อนสกัด	หลังสกัด	
Y1.1	200	0.3001	0.1367	10.4140	10.4223	0.0083
			0.1634	10.3900	10.3900	0.0093
W2.1	200	0.3900	0.2197	10.3219	10.3322	0.0103
			0.1703	10.3709	10.3801	0.0092
W2.2	200	0.1644	0.0822	10.3059	10.3132	0.0074
			0.0822	10.3808	10.3897	0.0089
W2.3	200	0.0917	0.0407	10.4527	10.4580	0.0053
			0.0510	10.3706	10.3761	0.0055
C3.1	200	0.0408	0.0204	10.4326	10.4352	0.0026
			0.0204	10.3115	10.3143	0.0028
C3.2	200	0.2254	0.1134	10.3369	10.3471	0.0102
			0.1120	10.4032	10.4112	0.0080
C3.3	200	0.3147	0.1444	10.3014	10.3058	0.0044
			0.1703	10.3399	10.3456	0.0057
R4.1	200	0.1092	0.0546	10.3896	10.3978	0.0082
			0.0546	10.5255	10.5341	0.0086
R4.2	200	0.0470	0.0235	10.4445	10.4472	0.0027
			0.0235	10.4847	10.4882	0.0035
R4.3	200	0.0894	0.0447	10.3092	10.3168	0.0076
			0.0447	10.4817	10.4900	0.0083
R4.4	200	0.0460	0.0230	10.4119	10.4183	0.0064
			0.0230	10.3242	10.3303	0.0061
R4.5	200	0.1289	0.0694	10.3431	10.3502	0.0071
			0.0595	10.3262	10.3338	0.0076

ตารางที่ ข.3 ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) และ ปริมาณน้ำตาตรีควิวซ์ที่วัดได้ จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL- R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

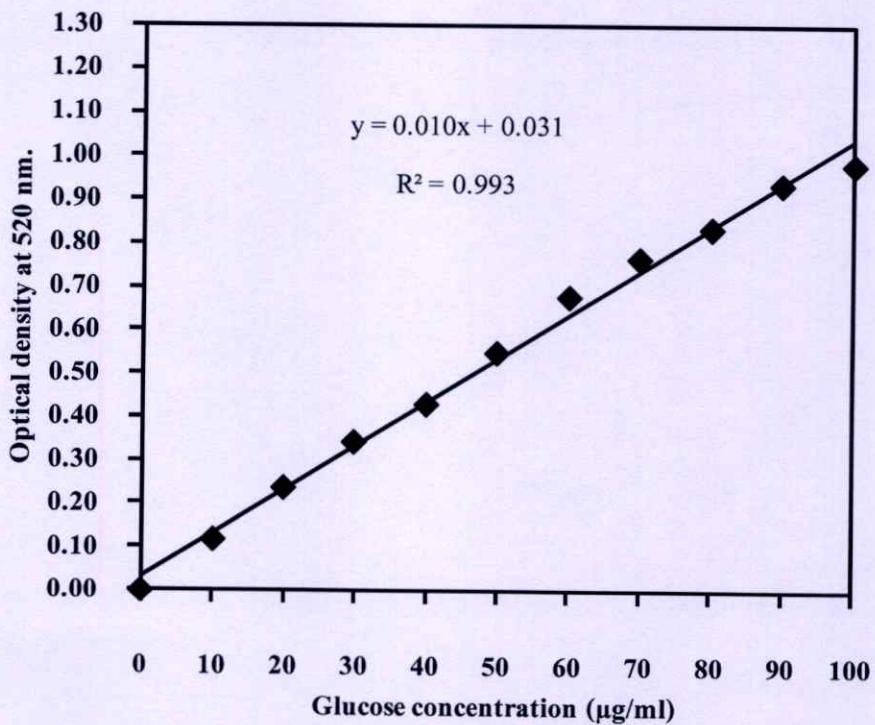
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			ปริมาณน้ำตาตรีควิวซ์ (กรัมต่อลิตร)						
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	dilution	A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
					1	2	3	1	2	3
0	0.100	0.100	0.100	100X	0.710	0.833	0.824	6.790	8.020	8.140
6	0.404	0.390	0.384	100X	0.625	0.722	0.633	5.940	6.910	6.230
12	1.004	1.171	1.076	100X	0.611	0.598	0.601	5.800	5.670	5.910
18	2.364	2.320	2.292	100X	0.536	0.517	0.445	5.050	4.860	4.350
24	2.814	2.862	2.946	100X	0.429	0.423	0.410	3.980	3.920	4.000
30	3.516	3.552	3.456	100X	0.376	0.320	0.315	3.450	2.890	3.050
36	4.248	3.726	3.648	100X	0.310	0.312	0.320	2.790	2.810	3.100
42	4.124	3.632	3.774	100X	0.298	0.285	0.255	2.670	2.540	2.450
48	4.062	3.552	3.888	100X	0.262	0.228	0.248	2.310	1.970	2.380
54	4.104	3.616	3.826	100X	0.170	0.189	0.171	1.390	1.580	1.610
60	3.996	3.822	4.070	100X	0.109	0.103	0.104	0.780	0.720	0.940
66	3.998	3.801	3.902	100X	0.111	0.104	0.102	0.800	0.730	0.920
72	4.116	3.900	4.124	100X	0.128	0.118	0.105	0.970	0.870	0.950

<sup>†</sup> ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

<sup>‡</sup> ฟังก์ชันสมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณดูได้จากรูปที่ ข.1

ตารางที่ ข.4 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	0.000	0.000	0.000
10	0.110	0.128	0.114
20	0.222	0.291	0.194
30	0.310	0.401	0.323
40	0.407	0.426	0.461
50	0.522	0.531	0.598
60	0.681	0.697	0.659
70	0.744	0.788	0.764
80	0.840	0.870	0.796
90	0.924	0.978	0.900
100	0.986	0.988	0.968

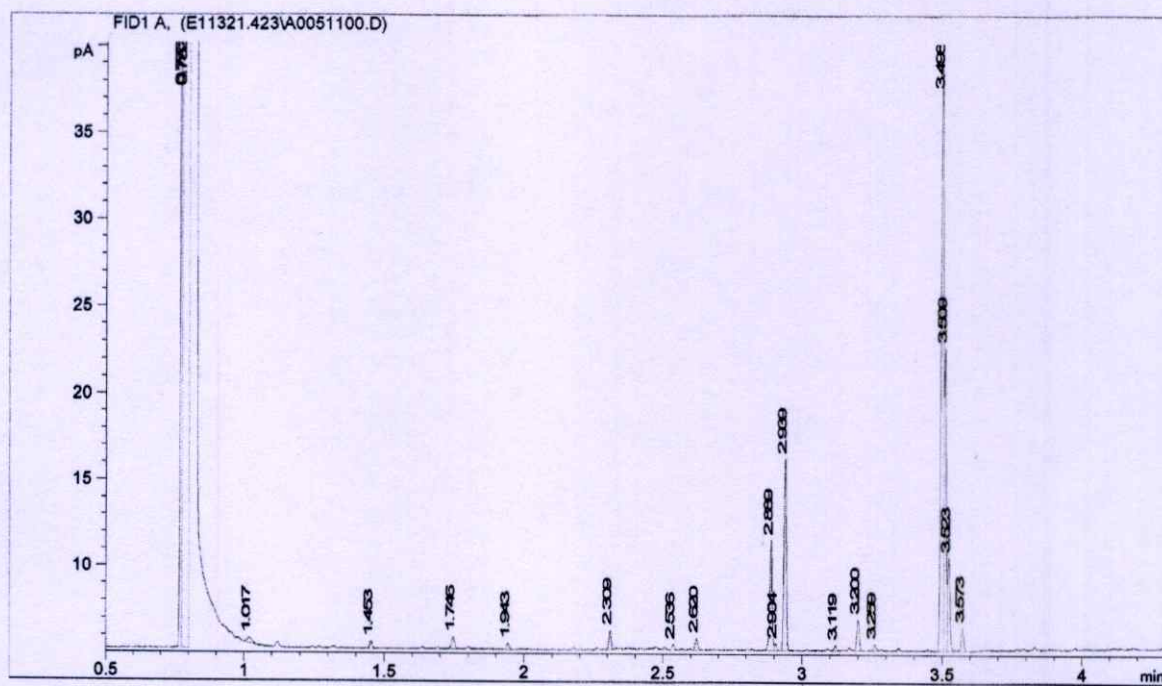


รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

ตารางที่ ข.5 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ 20

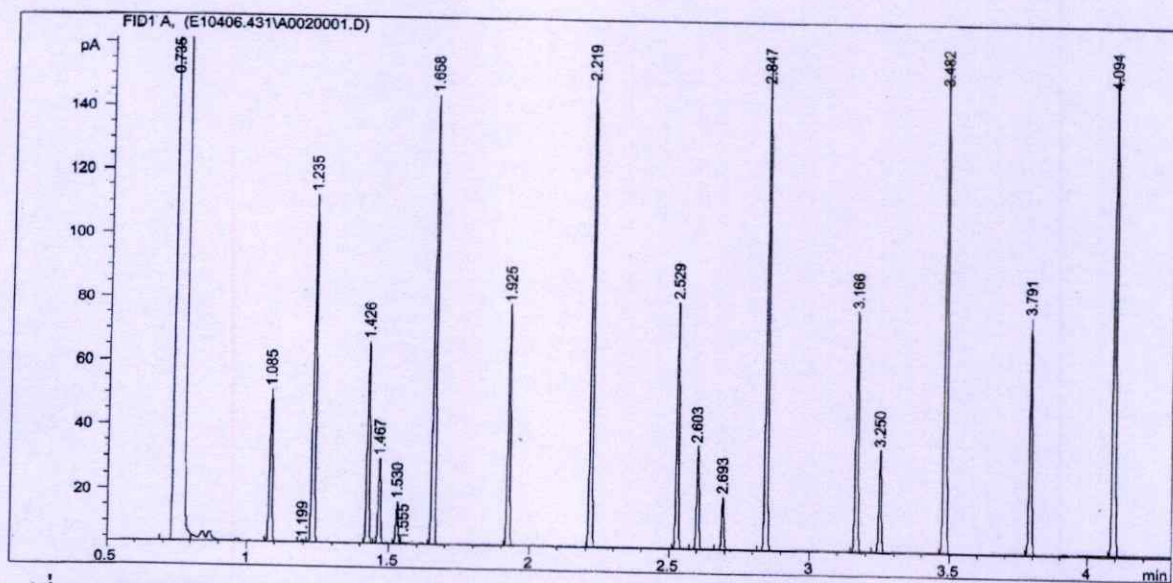
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตร ของน้ำ เสีย (mL)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง ทั้งหมดที่ได้ (กรัม)	น้ำหนักเซลล์ แห้งที่ใช้ใน การสกัด (กรัม)	น้ำหนักขูดก้นกลม อบแห้ง (กรัม)		น้ำหนัก ลิพิดที่ สกัดได้ (กรัม)
				ก่อนสกัด	หลังสกัด	
18	2,000	0.6106	0.2013	92.9374	92.9533	0.0159
			0.2004	93.3184	93.3370	0.0186
			0.2089	102.0970	102.1162	0.0192
36	1,000	1.0961	0.2097	55.8848	55.9089	0.0241
			0.2085	57.9861	58.0108	0.0247
			0.2086	55.6023	55.6261	0.0238
72	1,000	1.1939	0.2275	61.2580	61.2739	0.0159
			0.2230	92.9404	92.9580	0.0176
			0.2085	91.4671	91.4828	0.0157

Peak NO.	Retention time (min.)	Area	Percent	Name
1	1.4534	1.132	0.740	C11:0
2	1.7455	1.063	1.410	C12:0
3	1.9426	1.031	0.600	C13:0
4	2.3094	0.986	1.480	C14:0
5	2.5362	0.966	0.440	C15:0
6	2.8885	0.941	8.180	C16:1
7	3.9387	0.939	13.480	C16:0
8	3.2001	0.926	2.210	C17:1
9	3.5940	0.924	0.460	C17:0
10	3.4975	0.915	43.200	C18:2
11	3.5088	0.915	18.980	C18:1
12	3.5731	0.913	1.740	C18:0



รูปที่ ข.2 โครมาโตแกรมของชนิดของกรดไขมันจากเซลล์แบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

Peak NO.	Retention time (min.)	Area	Percent	Name
1	1.0847	1.271	5.10	C9:0
2	1.2346	1.200	10.11	C10:0
3	1.4257	1.137	5.06	C11:0
4	1.4670	1.126	2.15	C10:0 2OH
5	1.5296	1.111	1.03	C10:0 2OH
6	1.6581	1.082	1.016	C12:0
7	1.9248	1.034	5.10	C13:0
8	2.2186	0.994	10.20	C14:1
9	2.5286	0.962	5.08	C15:0
10	2.6029	0.955	2.16	C14:0 2OH
11	2.8473	0.936	10.16	C16:1
12	3.1661	0.916	5.07	C17:0
13	3.2503	0.912	2.19	C16:0 2OH
14	3.4824	0.903	10.11	C18:0
15	3.7913	0.895	5.08	C19:0
16	4.0936	0.893	10.17	C20:0



รูปที่ ข.3 โครมาโตแกรมของชนิดของกรดไขมันมาตรฐาน (C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>)

ตารางที่ ข.6 ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) และปริมาณน้ำตาสิริวิฑูที่วัดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาสิริวิฑู (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
						1	2	3	1	2	3
Glucose	0	0.137	0.137	0.137	100X	0.871	0.855	0.880	7.158	7.025	7.233
	6	0.357	0.424	0.498	100X	0.679	0.651	0.683	5.558	5.325	5.592
	12	0.771	0.739	0.789	100X	0.547	0.542	0.551	4.458	4.417	4.492
	18	2.156	2.268	2.192	100X	0.447	0.45	0.435	3.625	3.650	3.525
	24	3.128	3.184	3.092	100X	0.332	0.343	0.339	2.667	2.758	2.725
	30	4.140	4.280	4.260	100X	0.303	0.311	0.308	2.425	2.492	2.467
	36	4.242	4.280	4.240	100X	0.24	0.238	0.246	1.900	1.883	1.950
	42	4.260	4.232	4.208	100X	0.159	0.145	0.155	1.225	1.108	1.192
	48	4.336	4.380	4.360	100X	0.133	0.12	0.148	1.008	0.900	1.133
	54	4.284	4.220	4.228	100X	0.116	0.12	0.11	0.867	0.900	0.817
60	4.024	4.096	4.320	100X	0.046	0.055	0.041	0.283	0.358	0.242	
66	4.352	4.240	4.280	100X	0.046	0.039	0.049	0.283	0.225	0.308	
72	4.352	4.256	4.504	100X	0.036	0.021	0.040	0.200	0.075	0.233	

ตารางที่ ข.6 (ต่อ)

แหล่ง คาร์บอน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)								
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>					
						1	2	3	1	2	3			
Fructose	0	0.142	0.142	0.142	100X	0.776	0.810	0.789	6.367	6.650	6.475			
	6	0.405	0.396	0.398	100X	0.649	0.658	0.661	5.308	5.383	5.408			
	12	0.703	0.704	0.647	100X	0.605	0.611	0.618	4.942	4.992	5.050			
	18	3.324	3.252	3.270	100X	0.556	0.549	0.576	4.533	4.475	4.700			
	24	3.762	3.804	3.630	100X	0.424	0.45	0.434	3.433	3.650	3.517			
	30	4.566	3.630	4.284	100X	0.358	0.366	0.372	2.883	2.950	3.000			
	36	4.620	4.692	4.692	100X	0.249	0.238	0.250	1.975	1.883	1.983			
	42	4.524	4.422	4.434	100X	0.209	0.211	0.204	1.642	1.658	1.600			
	48	4.422	4.542	4.674	100X	0.211	0.220	0.205	1.658	1.733	1.608			
	54	4.590	4.494	4.314	100X	0.207	0.201	0.197	1.625	1.575	1.542			
60	4.734	4.776	4.566	100X	0.18	0.177	0.171	1.400	1.375	1.325				
66	4.740	4.728	4.590	100X	0.162	0.155	0.160	1.250	1.192	1.233				
72	4.452	4.296	4.284	100X	0.145	0.138	0.142	1.108	1.050	1.083				



ตารางที่ ข.6 (ต่อ)

แหล่ง คาร์บอน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)								
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>					
						1	2	3	1	2	3			
Lactose	0	0.140	0.140	0.140	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	6	0.191	0.175	0.162	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	12	0.200	0.185	0.179	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	18	0.184	0.175	0.167	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	24	0.176	0.172	0.188	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	30	0.191	0.190	0.185	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	36	0.210	0.175	0.161	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	42	0.168	0.152	0.158	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	48	0.181	0.169	0.170	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	54	0.163	0.150	0.167	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
60	0.202	0.150	0.219	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
66	0.194	0.181	0.195	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
72	0.172	0.186	0.174	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

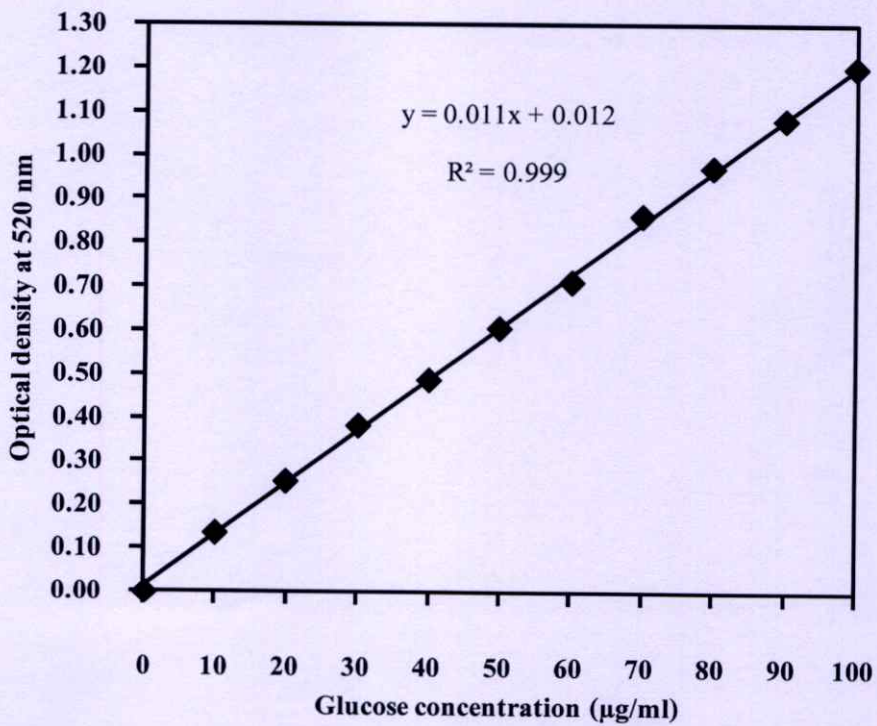
<sup>†</sup> ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

<sup>‡</sup> ฟังก์ชันสมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณดูได้จากรูปที่ ข.4

ND not determined เนื่องจากน้ำตาลทั้งสองชนิดไม่จัดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

ตารางที่ ข.7 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	0.000	0.000	0.000
10	0.1280	0.1340	0.1430
20	0.2470	0.2630	0.2600
30	0.3780	0.3810	0.3950
40	0.4780	0.5030	0.4890
50	0.5850	0.6180	0.6210
60	0.6990	0.7120	0.7210
70	0.8620	0.8740	0.8510
80	0.9590	0.9990	0.9670
90	1.0520	1.1320	1.0650
100	1.2380	1.1940	1.1711



รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

ตารางที่ ข.8 ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) และ ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (Total Organic Carbon, TOC) ที่วัดได้ เมื่อ เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเสีย สังกะหรณ์ที่มีกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน

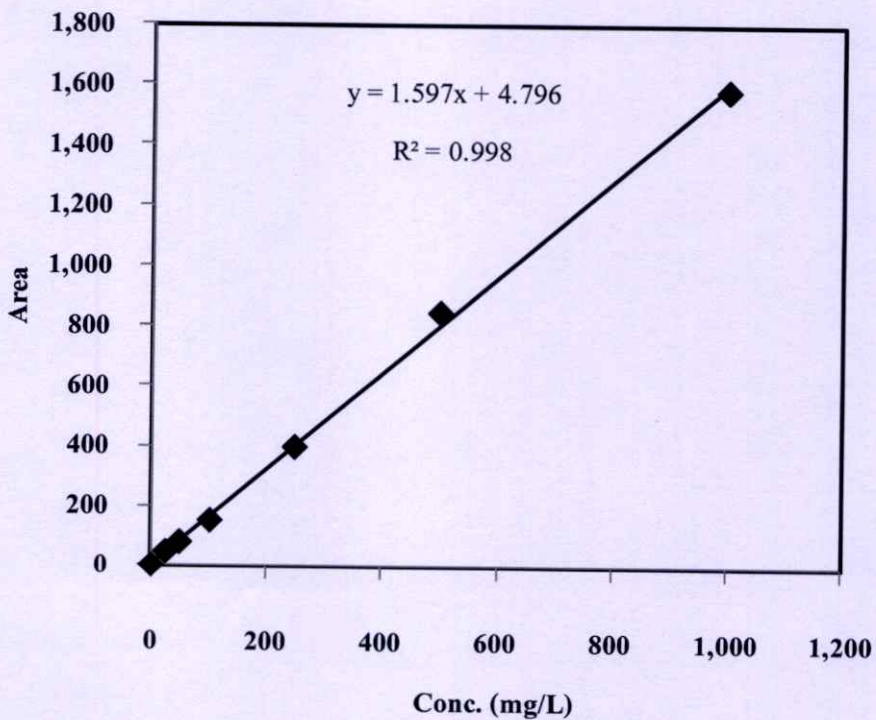
แหล่งคาร์บอน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			TOC (mg C/L)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	dilution	Peak area	ความเข้มข้น †
Sodium acetate	0	0.148	0.148	0.148	10X	5,279.42	3,302.83
	6	0.287	0.272	0.282	ND	ND	ND
	12	0.473	0.465	0.448	ND	ND	ND
	18	0.761	0.767	0.773	10X	5,337.33	3,339.09
	24	1.248	1.194	1.132	10X	5,305.21	3,318.98
	30	2.188	2.164	2.084	ND	ND	ND
	36	3.132	2.904	3.192	10X	5,123.82	3,205.40
	42	3.432	3.078	2.940	ND	ND	ND
	48	3.414	3.114	3.366	ND	ND	ND
	54	3.618	3.804	3.570	ND	ND	ND
	60	4.254	3.900	3.822	ND	ND	ND
	66	4.230	4.362	4.386	ND	ND	ND
	72	4.776	4.464	4.518	10X	3,974.70	2,485.85
	Propionic acid	0	0.120	0.120	0.120	ND	ND
6		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
12		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
18		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
24		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
30		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
36		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
42		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
48		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
54		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
60		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
66		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND
72		0.120	0.120	0.120	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.8 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			TOC (mg C/L)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	dilution	Peak area	ความเข้มข้น <sup>‡</sup>
Butyric acid	0	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	6	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	12	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	18	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	24	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	30	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	36	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	42	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	48	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	54	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	60	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	66	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND
	72	0.150	0.150	0.150	ND	ND	ND

ND not determined เนื่องจากเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต

<sup>‡</sup> ฟังก์ชันสมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณค่าได้จากรูปที่ ข.5



รูปที่ ข.5 กราฟมาตรฐานของ TOC

ตารางที่ ข.9 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

แหล่งคาร์บอน	ปริมาตรของน้ำเสีย (mL)	น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดที่ได้ (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใช้ในการสกัด (กรัม)	น้ำหนักขูดกันกลมอบแห้ง (กรัม)		น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ (กรัม)
				ก่อนสกัด	หลังสกัด	
Glucose	1,000	0.7252	0.2010	55.8803	55.8990	0.0187
			0.2018	55.5975	55.6212	0.0237
			0.2024	61.2872	61.3083	0.0211
Fructose	1,000	0.7215	0.2022	92.9221	92.9455	0.0234
			0.2008	91.4627	91.4855	0.0228
			0.2036	102.0822	102.1086	0.0264
Sucrose	1,000	0.6152	0.2009	61.6653	61.6827	0.0174
			0.2003	57.9876	58.0050	0.0173
			0.2001	55.8869	55.9018	0.0149
Lactose	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			ND	ND	ND	ND
			ND	ND	ND	ND
Sodium acetate	2,000	0.7060	0.2012	61.6650	61.6878	0.0228
			0.2013	55.6023	55.6290	0.0267
			0.2023	93.3147	93.3382	0.0235

**ตารางที่ ข.10** ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KM1TL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน

แหล่ง ไนโตรเจน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	เมื่อใช้กฎโคสเป็นแหล่งคาร์บอน					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)			ความเข้มข้น <sup>†</sup>		
						A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			1	2	3
แอมโมเนียม ซัลเฟต	0	0.106	0.106	0.106	100X	0.841	0.835	0.939	7.591	7.536	8.482
	6	0.356	0.433	0.389	100X	0.661	0.687	0.689	5.955	6.191	6.209
	12	0.834	0.988	0.812	100X	0.531	0.521	0.590	4.773	4.682	5.309
	18	2.154	2.634	2.050	100X	0.408	0.456	0.478	3.655	4.091	4.291
	24	3.150	3.164	3.076	100X	0.309	0.350	0.337	2.755	3.127	3.009
	30	4.560	4.478	4.268	100X	0.309	0.318	0.283	2.755	2.836	2.518
	36	4.223	4.265	4.110	100X	0.239	0.245	0.238	2.118	2.173	2.109
	42	4.538	4.230	4.380	100X	0.210	0.140	0.123	1.855	1.218	1.064
	48	4.328	4.134	4.054	100X	0.144	0.135	0.121	1.255	1.173	1.045
	54	4.320	4.346	4.354	100X	0.117	0.121	0.112	1.009	1.045	0.964
60	4.135	4.040	4.045	100X	0.044	0.055	0.041	0.345	0.445	0.318	
66	4.230	4.155	4.127	100X	0.047	0.051	0.042	0.373	0.409	0.327	
72	4.208	4.198	4.242	100X	0.039	0.028	0.041	0.300	0.200	0.318	

ตารางที่ ข.10 (ต่อ)

แหล่ง ไมโครเจน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		1	2	3	1	2	3
แอมโมเนียม ซัลเฟต	0	0.137	0.137	0.137	100X	0.760	0.778	0.689	6.855	7.018	6.209
	6	0.357	0.424	0.498	100X	0.560	0.459	0.563	5.036	4.118	5.064
	12	0.771	0.759	0.789	100X	0.406	0.523	0.529	3.636	4.700	4.755
	18	2.156	2.668	2.192	100X	0.457	0.445	0.426	4.100	3.991	3.818
	24	3.128	3.184	3.092	100X	0.313	0.454	0.412	2.791	4.073	3.691
	30	4.440	4.680	4.260	100X	0.251	0.238	0.293	2.227	2.109	2.609
	36	4.242	4.380	4.540	100X	0.142	0.122	0.142	1.236	1.055	1.236
	42	4.560	4.632	4.608	100X	0.046	0.036	0.101	0.364	0.273	0.864
	48	4.336	4.080	4.160	100X	0.042	0.067	0.085	0.327	0.555	0.715
	54	4.384	4.320	4.328	100X	0.026	0.029	0.039	0.182	0.209	0.300
60	4.024	4.096	4.320	100X	0.019	0.032	0.024	0.118	0.236	0.164	
66	4.384	4.240	4.280	100X	0.030	0.041	0.037	0.218	0.318	0.282	
72	4.752	4.256	4.504	100X	0.025	0.024	0.054	0.173	0.164	0.436	

ตารางที่ ข.10 (ต่อ)

แหล่ง ไนโตรเจน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
						1	2	3	1	2	3
ยูเรีย	0	0.108	0.108	0.108	100X	0.851	0.849	0.857	7.682	7.664	7.736
	6	0.489	0.478	0.312	100X	0.769	0.765	0.758	6.936	6.900	6.836
	12	1.552	1.510	1.521	100X	0.531	0.597	0.555	4.773	5.373	4.991
	18	2.668	2.657	2.678	100X	0.490	0.487	0.485	4.400	4.373	4.355
	24	3.170	3.158	3.172	100X	0.479	0.465	0.487	4.300	4.173	4.373
	30	3.067	3.176	3.187	100X	0.431	0.426	0.435	3.864	3.818	3.900
	36	3.163	3.155	3.053	100X	0.450	0.454	0.468	4.036	4.073	4.200
	42	3.124	3.112	3.122	100X	0.454	0.458	0.446	4.073	4.109	4.000
	48	3.199	3.160	3.102	100X	0.421	0.427	0.428	3.773	3.827	3.836
	54	3.179	2.875	2.800	100X	0.434	0.431	0.421	3.891	3.864	3.773
60	3.167	2.985	2.976	100X	0.429	0.424	0.454	3.845	3.800	4.073	
66	2.955	2.964	2.976	100X	0.407	0.411	0.421	3.645	3.682	3.773	
72	2.831	3.154	3.051	100X	0.430	0.420	0.469	3.855	3.764	4.209	

ตารางที่ ข.10 (ต่อ)

แหล่ง ในโตรเจน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	เมื่อใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>†</sup>		
						1	2	3	1	2	3
ยูเรีย	0	0.177	0.177	0.177	100X	0.739	0.767	0.710	6.664	6.918	6.400
	6	0.444	0.445	0.450	100X	0.646	0.574	0.552	5.818	5.164	4.964
	12	1.122	0.960	1.018	100X	0.597	0.435	0.470	5.373	3.900	4.218
	18	2.864	2.912	2.924	100X	0.490	0.450	0.511	4.400	4.037	4.591
	24	2.868	3.128	3.048	100X	0.479	0.528	0.459	4.300	4.745	4.118
	30	3.040	3.116	3.156	100X	0.420	0.484	0.466	3.764	4.345	4.182
	36	3.168	3.032	3.072	100X	0.444	0.414	0.448	3.982	3.709	4.018
	42	3.160	3.084	3.080	100X	0.482	0.425	0.466	4.327	3.809	4.182
	48	3.176	3.072	3.116	100X	0.426	0.441	0.423	3.818	3.955	3.791
	54	3.184	2.828	2.844	100X	0.430	0.450	0.480	3.855	4.036	4.309
	60	3.144	3.188	3.136	100X	0.429	0.445	0.406	3.845	3.991	3.636
	66	2.976	2.920	2.980	100X	0.407	0.417	0.426	3.645	3.736	3.818
72	2.888	3.196	3.040	100X	0.437	0.255	0.276	3.918	2.264	2.455	

ตารางที่ ข.10 (ต่อ)

แหล่ง ไนโตรเจน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		1	2	3	1	2	3
แอมโมเนียม คลอไรด์	0	0.103	0.103	0.103	100X	0.857	0.712	0.848	7.736	6.418	7.655
	6	0.338	0.324	0.359	100X	0.572	0.577	0.587	5.145	5.191	5.282
	12	0.767	0.733	0.731	100X	0.539	0.546	0.538	4.845	4.909	4.836
	18	2.715	2.709	2.793	100X	0.456	0.448	0.485	4.091	4.018	4.355
	24	3.314	3.300	3.387	100X	0.372	0.445	0.313	3.327	3.991	2.791
	30	3.424	3.929	3.986	100X	0.317	0.348	0.318	2.827	3.109	2.836
	36	3.739	3.730	3.656	100X	0.318	0.363	0.305	2.836	3.245	2.718
	42	3.341	3.421	3.416	100X	0.336	0.239	0.343	3.000	2.118	3.064
	48	3.752	3.726	3.318	100X	0.275	0.289	0.286	2.445	2.573	2.545
	54	3.247	3.242	3.222	100X	0.323	0.267	0.289	2.882	2.373	2.573
60	3.155	3.265	3.211	100X	0.259	0.248	0.247	2.300	2.200	2.191	
66	3.168	3.177	3.298	100X	0.237	0.244	0.239	2.100	2.164	2.118	
72	3.288	3.222	3.244	100X	0.174	0.173	0.177	1.527	1.518	1.555	

ตารางที่ ข.10 (ต่อ)

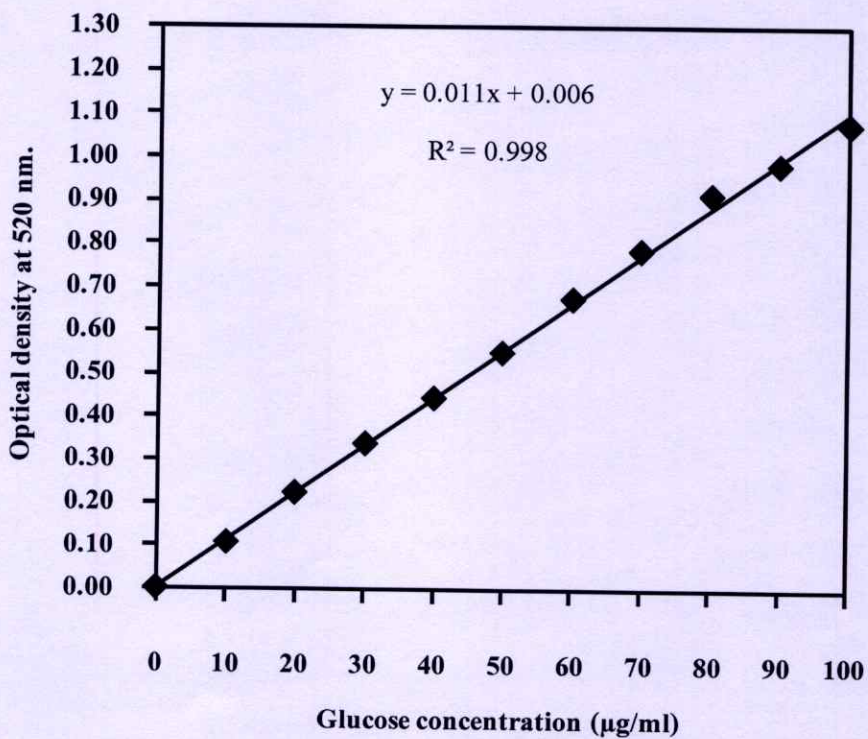
แหล่ง โนโตรเจน	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		1	2	3	1	2	3
แอมโมเนียม คลอไรด์	0	0.157	0.157	0.157	100X	0.736	0.755	0.768	6.636	6.809	6.927
	6	0.340	0.364	0.358	100X	0.572	0.412	0.598	5.145	3.691	5.382
	12	0.729	0.755	0.747	100X	0.545	0.538	0.501	4.900	4.836	4.500
	18	2.676	2.694	2.706	100X	0.456	0.435	0.433	4.091	3.900	3.882
	24	3.372	3.240	3.330	100X	0.330	0.335	0.391	2.945	2.991	3.500
	30	3.528	3.570	3.504	100X	0.317	0.319	0.326	2.827	2.845	2.909
	36	3.780	3.666	3.864	100X	0.256	0.295	0.299	2.273	2.627	2.664
	42	3.368	3.354	3.240	100X	0.236	0.277	0.302	2.091	2.464	2.691
	48	3.320	3.390	3.310	100X	0.275	0.281	0.315	2.445	2.500	2.809
	54	3.276	3.340	3.288	100X	0.353	0.264	0.222	3.155	2.345	1.964
60	3.164	3.256	3.204	100X	0.259	0.251	0.290	2.300	2.227	2.582	
66	3.126	3.204	3.690	100X	0.244	0.237	0.283	2.164	2.100	2.518	
72	3.222	3.220	3.206	100X	0.176	0.166	0.213	1.545	1.455	1.882	

<sup>†</sup> ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

<sup>‡</sup> ฟังก์ชันสมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณดูได้จากรูปที่ ข.6

ตารางที่ ข.11 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	0.000	0.000	0.000
10	0.105	0.115	0.105
20	0.212	0.225	0.237
30	0.327	0.351	0.335
40	0.445	0.437	0.452
50	0.542	0.559	0.549
60	0.670	0.682	0.670
70	0.777	0.792	0.787
80	0.968	0.876	0.896
90	0.956	0.990	1.000
100	1.070	1.076	1.076



รูปที่ ข.6 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)



ตารางที่ ข.13 ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) และปริมาณน้ำตาเล็คทีวซ์ที่วัดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนแตกต่างกัน

ความ เข้มข้น โปรตีน (g/L)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาเล็คทีวซ์ (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>†</sup>		
						1	2	3	1	2	3
0	0	0.109	0.109	0.109	100X	0.710	0.774	0.745	8.067	8.778	8.456
	6	0.156	0.145	0.163	100X	0.651	0.641	0.623	7.411	7.300	7.100
	12	0.179	0.180	0.188	100X	0.581	0.542	0.565	6.633	6.200	6.456
	18	0.219	0.203	0.209	100X	0.497	0.522	0.561	5.700	5.978	6.411
	24	0.231	0.200	0.211	100X	0.494	0.488	0.474	5.667	5.600	5.444
	30	0.200	0.192	0.207	100X	0.468	0.474	0.462	5.378	5.444	5.311
	36	0.206	0.201	0.209	100X	0.443	0.429	0.443	5.100	4.944	5.100
	42	0.216	0.206	0.213	100X	0.433	0.421	0.414	4.989	4.856	4.778
	48	0.212	0.204	0.206	100X	0.418	0.406	0.402	4.822	4.689	4.644
	54	0.265	0.206	0.177	100X	0.406	0.400	0.410	4.690	4.622	4.733
	60	0.220	0.189	0.195	100X	0.398	0.392	0.401	4.600	4.533	4.633
	66	0.224	0.183	0.199	100X	0.385	0.391	0.379	4.459	4.522	4.389
	72	0.154	0.234	0.234	100X	0.371	0.377	0.376	4.300	4.367	4.356

ตารางที่ ข.13 (ต่อ)

ความเข้มข้น ไนโตรเจน (g/L)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
						1	2	3	1	2	3
0.1	0	0.108	0.108	0.108	100X	0.667	0.693	0.711	7.589	7.878	8.078
	6	1.062	0.999	1.095	100X	0.601	0.580	0.578	6.856	6.622	6.600
	12	1.887	1.965	1.923	100X	0.524	0.534	0.522	6.000	6.111	5.978
	18	2.904	2.184	2.196	100X	0.486	0.468	0.457	5.578	5.378	5.256
	24	2.205	1.878	2.258	100X	0.432	0.354	0.388	4.978	4.111	4.489
	30	2.220	1.854	2.133	100X	0.370	0.316	0.466	4.289	3.689	5.356
	36	2.172	1.833	2.133	100X	0.363	0.345	0.367	4.211	4.011	4.256
	42	2.067	2.019	1.983	100X	0.320	0.320	0.320	3.733	3.733	3.733
	48	1.971	1.641	2.241	100X	0.315	0.304	0.308	3.678	3.556	3.600
	54	2.067	1.740	2.046	100X	0.150	0.316	0.321	1.844	3.689	3.744
	60	1.755	2.025	1.740	100X	0.257	0.287	0.255	3.033	3.367	3.011
	66	1.752	1.713	2.022	100X	0.245	0.271	0.284	2.900	3.189	3.333
72	1.647	1.686	2.022	100X	0.237	0.233	0.239	2.811	2.767	2.833	

ตารางที่ ข.13 (ต่อ)

ความ เข้มข้น ไนโตรเจน (g/L)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)								
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>†</sup>					
						1	2	3	1	2	3			
1	0	0.103	0.103	0.103	100X	0.789	0.755	0.810	8.944	8.567	9.178			
	6	0.267	0.294	0.298	100X	0.653	0.687	0.666	7.433	7.811	7.578			
	12	0.535	0.452	0.659	100X	0.489	0.485	0.501	5.611	5.567	5.744			
	18	0.788	0.783	0.883	100X	0.403	0.407	0.401	4.656	4.700	4.633			
	24	1.134	1.110	1.098	100X	0.364	0.340	0.319	4.222	3.956	3.722			
	30	1.298	1.282	1.396	100X	0.216	0.256	0.305	2.578	3.022	3.567			
	36	1.272	1.298	1.406	100X	0.255	0.257	0.221	3.011	3.033	2.633			
	42	1.398	1.378	1.488	100X	0.195	0.153	0.170	2.344	1.878	2.067			
	48	1.472	1.578	1.508	100X	0.180	0.135	0.175	2.178	1.678	2.122			
	54	1.378	1.358	1.482	100X	0.134	0.102	0.118	1.667	1.311	1.489			
	60	1.390	1.387	1.528	100X	0.113	0.101	0.098	1.433	1.300	1.267			
	66	1.456	1.42	1.592	100X	0.070	0.109	0.053	0.956	1.389	0.767			
72	1.478	1.592	1.548	100X	0.021	0.031	0.069	0.411	0.522	0.944				

ตารางที่ ข.13 (ต่อ)

ความเข้มข้น ไนโตรเจน (g/L)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>320</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
						1	2	3	1	2	3
2	0	0.104	0.104	0.104	100X	0.753	0.709	0.754	8.544	8.056	8.556
	6	0.368	0.345	0.378	100X	0.546	0.578	0.599	6.244	6.600	6.833
	12	0.634	0.657	0.630	100X	0.430	0.467	0.444	4.956	5.367	5.111
	18	1.054	1.076	1.110	100X	0.382	0.365	0.371	4.422	4.233	4.300
	24	1.132	1.182	1.142	100X	0.319	0.335	0.314	3.722	3.900	3.667
	30	1.114	1.144	1.116	100X	0.271	0.327	0.294	3.189	3.811	3.444
	36	1.198	1.154	1.118	100X	0.314	0.324	0.224	3.667	3.778	2.667
	42	1.178	1.230	1.210	100X	0.226	0.319	0.255	2.689	3.722	3.011
	48	1.190	1.252	1.238	100X	0.242	0.203	0.226	2.867	2.433	2.689
	54	1.156	1.236	1.186	100X	0.199	0.190	0.207	2.389	2.289	2.478
60	1.165	1.200	1.210	100X	0.150	0.168	0.179	1.844	2.044	2.167	
66	1.176	1.204	1.264	100X	0.133	0.179	0.176	1.656	2.167	2.133	
72	1.186	1.102	1.162	100X	0.119	0.106	0.111	1.500	1.356	1.411	

ตารางที่ ข.13 (ต่อ)

ความเข้มข้น ไนโตรเจน (g/L)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		1	2	3	ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
									1	2	3
5	0	0.106	0.106	0.106	100X	0.814	0.771	0.777	9.222	8.744	8.811
	6	0.325	0.389	0.378	100X	0.665	0.652	0.679	7.567	7.422	7.722
	12	0.657	0.689	0.635	100X	0.610	0.552	0.589	6.956	6.311	6.722
	18	1.008	1.072	1.090	100X	0.495	0.437	0.448	5.678	5.033	5.156
	24	1.066	1.060	1.058	100X	0.337	0.348	0.350	3.922	4.044	4.067
	30	1.234	1.188	1.228	100X	0.259	0.267	0.243	3.056	3.144	2.878
	36	1.270	1.242	1.280	100X	0.243	0.218	0.222	2.878	2.600	2.644
	42	1.344	1.376	1.402	100X	0.180	0.165	0.185	2.178	2.011	2.233
	48	1.358	1.372	1.398	100X	0.166	0.154	0.173	2.022	1.889	2.100
54	1.340	1.386	1.368	100X	0.075	0.081	0.084	1.011	1.078	1.111	
60	1.352	1.367	1.359	100X	0.077	0.068	0.076	1.033	0.933	1.022	
66	1.394	1.412	1.342	100X	0.047	0.057	0.058	0.700	0.811	0.822	
72	1.298	1.366	1.372	100X	0.028	0.045	0.066	0.489	0.678	0.911	

ตารางที่ ข.13 (ต่อ)

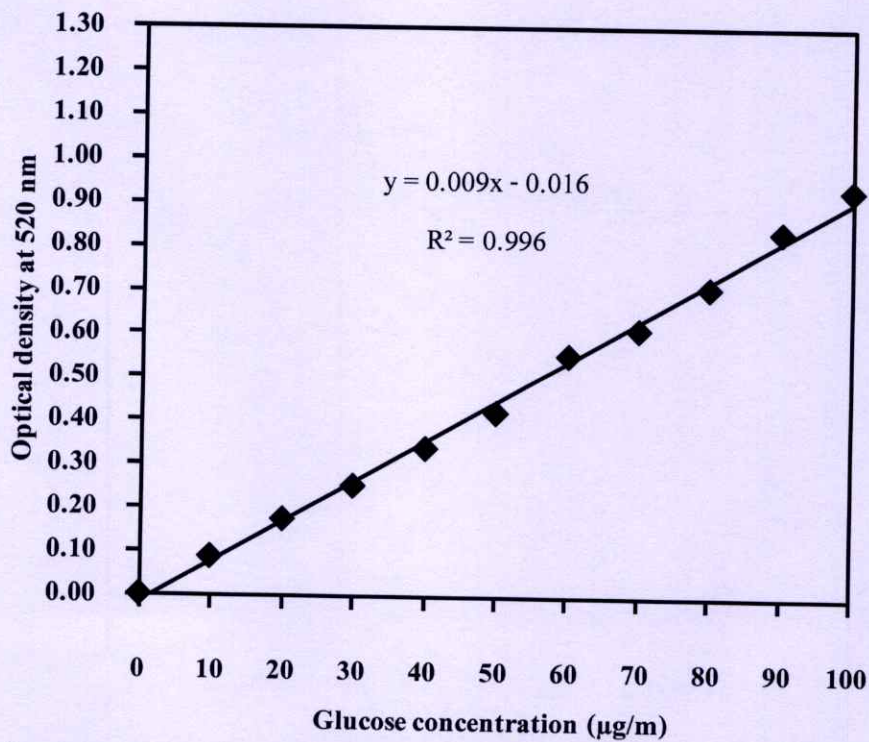
ความ เข้มข้น ใน ไตรเจน (g/L)	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
						1	2	3	1	2	3
10	0	0.109	0.109	0.109	100X	0.841	0.735	0.735	9.522	8.344	8.344
	6	0.305	0.345	0.336	100X	0.623	0.666	0.643	7.100	7.578	7.322
	12	0.651	0.548	0.610	100X	0.530	0.543	0.569	6.067	6.211	6.500
	18	0.862	0.894	0.802	100X	0.378	0.425	0.418	4.378	4.900	4.822
	24	1.028	1.050	1.010	100X	0.304	0.316	0.380	3.556	3.689	4.400
	30	1.108	1.124	1.114	100X	0.287	0.322	0.330	3.367	3.756	3.844
	36	1.260	1.230	1.242	100X	0.246	0.232	0.286	2.911	2.756	3.356
	42	1.292	1.220	1.208	100X	0.230	0.246	0.232	2.733	2.911	2.756
	48	1.310	1.236	1.236	100X	0.168	0.163	0.143	2.044	1.989	1.767
	54	1.316	1.270	1.298	100X	0.135	0.133	0.188	1.678	1.656	2.267
60	1.234	1.353	1.225	100X	0.078	0.081	0.061	1.044	1.078	0.856	
66	1.304	1.270	1.274	100X	0.065	0.048	0.053	0.900	0.711	0.767	
72	1.314	1.194	1.250	100X	0.044	0.048	0.042	0.667	0.711	0.644	

† ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

# ฟังก์ชันสมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณดูได้จากรูปที่ ข.7

ตารางที่ ข.14 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	0.000	0.000	0.000
10	0.086	0.089	0.086
20	0.167	0.184	0.169
30	0.245	0.257	0.253
40	0.329	0.333	0.358
50	0.418	0.419	0.425
60	0.510	0.580	0.567
70	0.610	0.607	0.615
80	0.705	0.711	0.703
90	0.820	0.862	0.819
100	0.943	0.932	0.916



รูปที่ ข.7 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

ตารางที่ ข.15 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างชนิดกัน

ความเข้มข้นของไนโตรเจน (g/L)	ปริมาตรของน้ำเสีย (mL)	น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดที่ได้ (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใช้ในการสกัด (กรัม)	น้ำหนักขูดก้นกลมอบแห้ง (กรัม)		น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ (กรัม)
				ก่อนสกัด	หลังสกัด	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			ND	ND	ND	ND
			ND	ND	ND	ND
0.1	1,000	0.6385	0.2018	55.8798	55.9103	0.0305
			0.2034	55.5878	55.6239	0.0361
			0.2052	104.1383	104.1739	0.0356
1	1,000	0.7027	0.2034	104.1376	104.1628	0.0252
			0.2027	92.9214	92.9493	0.0279
			0.2070	91.4688	91.4989	0.0301
2	1,000	0.7823	0.2004	95.1328	95.1543	0.0215
			0.2071	102.0853	102.1057	0.0204
			0.2087	106.9094	106.9313	0.0219
5	1,000	0.8768	0.2065	61.6581	61.6759	0.0178
			0.2064	55.5985	55.6130	0.0145
			0.2016	93.3058	93.3191	0.0133
10	1,000	0.8918	0.2021	57.9814	58.0038	0.0224
			0.2038	61.2863	61.3080	0.0217
			0.2030	55.8807	55.9023	0.0216

ND = not determine เนื่องจากเชื่อมีการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย

**ตารางที่ ข.16** ค่าความหนาแน่นโดยแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical density, OD<sub>600</sub>) และปริมาณน้ำตาคลอรีนที่วัดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL- R4.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio แตกต่างกัน

C/N ratio	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาคลอรีน (กรัมน้อยต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
						1	2	3	1	2	3
100	0	0.104	0.104	0.104	100X	0.466	0.475	0.487	5.244	5.344	5.478
	6	1.035	0.963	1.065	100X	0.421	0.416	0.402	4.744	4.689	4.533
	12	1.284	1.434	1.392	100X	0.378	0.484	0.385	4.267	5.444	4.344
	18	1.584	1.608	1.500	100X	0.361	0.343	0.396	4.078	3.878	4.467
	24	1.539	1.515	1.440	100X	0.313	0.354	0.312	3.544	4.000	3.533
	30	1.476	1.434	1.452	100X	0.343	0.308	0.318	3.878	3.489	3.600
	36	1.473	1.389	1.401	100X	0.379	0.202	0.283	4.278	2.311	3.211
	42	1.416	1.392	1.320	100X	0.236	0.243	0.334	2.689	2.767	3.778
	48	1.386	1.371	1.359	100X	0.255	0.213	0.300	2.900	2.433	3.400
	54	1.383	1.365	1.338	100X	0.262	0.300	0.221	2.978	3.400	2.522
	60	1.377	1.356	1.341	100X	0.211	0.301	0.221	2.411	3.411	2.522
	66	1.359	1.371	1.353	100X	0.162	0.310	0.201	1.867	3.511	2.300
	72	1.353	1.353	1.377	100X	0.180	0.285	0.191	2.067	3.233	2.189

ตารางที่ ข.16 (ต่อ)

C/N ratio	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>†</sup>		
						1	2	3	1	2	3
200	0	0.108	0.108	0.108	100X	0.879	0.895	0.801	9.833	10.011	8.967
	6	0.954	1.077	0.999	100X	0.765	0.734	0.752	8.567	8.222	8.422
	12	2.244	2.217	2.271	100X	0.662	0.623	0.638	7.422	6.989	7.156
	18	3.165	3.099	3.063	100X	0.522	0.408	0.476	5.867	4.600	5.356
	24	3.198	3.261	3.201	100X	0.402	0.418	0.461	4.533	4.711	5.189
	30	3.360	3.570	3.504	100X	0.353	0.365	0.378	3.989	4.122	4.267
	36	3.582	3.480	3.540	100X	0.330	0.328	0.317	3.733	3.711	3.589
	42	3.576	3.571	3.573	100X	0.320	0.311	0.315	3.622	3.522	3.567
	48	3.594	3.589	3.892	100X	0.323	0.331	0.326	3.656	3.744	3.689
	54	3.897	3.591	3.597	100X	0.310	0.315	0.295	3.511	3.567	3.344
60	3.552	3.567	3.555	100X	0.280	0.287	0.288	3.178	3.256	3.267	
66	3.198	3.291	3.288	100X	0.298	0.294	0.293	3.378	3.333	3.322	
72	3.285	3.288	3.294	100X	0.279	0.287	0.290	3.167	3.256	3.289	

ตารางที่ ข.16 (ต่อ)

C/N ratio	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กริมต่อลิตร)								
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>†</sup>					
						1	2	3	1	2	3			
400	0	0.106	0.106	0.106	1000X	0.145	0.136	0.178	16.778	15.778	20.444			
	6	1.167	1.065	1.026	1000X	0.121	0.144	0.151	14.111	16.667	17.444			
	12	1.662	1.677	1.653	1000X	0.121	0.111	0.134	14.111	13.000	15.556			
	18	2.166	2.310	2.160	1000X	0.100	0.127	0.112	11.778	14.778	13.111			
	24	3.984	4.020	3.603	1000X	0.091	0.087	0.105	10.778	10.333	12.333			
	30	4.524	4.530	5.166	1000X	0.094	0.091	0.080	11.111	10.778	9.556			
	36	4.665	4.617	4.983	1000X	0.085	0.087	0.089	10.111	10.333	10.556			
	42	4.776	4.776	5.286	1000X	0.095	0.069	0.090	11.222	8.333	10.667			
	48	4.842	4.752	5.592	1000X	0.075	0.074	0.089	9.000	8.889	10.556			
	54	4.542	4.734	4.620	1000X	0.090	0.072	0.080	10.667	8.667	9.556			
60	4.134	5.067	5.220	1000X	0.082	0.081	0.077	9.778	9.667	9.222				
66	4.464	5.622	4.350	1000X	0.073	0.078	0.065	8.778	9.333	7.889				
72	4.122	4.5540	5.514	1000X	0.077	0.071	0.073	9.222	8.556	8.778				

ตารางที่ ข.16 (ต่อ)

C/N ratio	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	A <sub>320</sub> <sup>†</sup>			ปริมาณน้ำตาตริคิวท์ (กรัมต่อลิตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		1	2	3	ความเข้มข้น <sup>†</sup>		
									1	2	3
600	0	0.102	0.102	0.102	1000X	0.236	0.287	0.201	26.889	32.556	23.000
	6	1.233	1.263	1.248	1000X	0.211	0.201	0.222	25.333	23.000	25.333
	12	1.530	1.527	1.566	1000X	0.205	0.196	0.201	23.000	22.444	23.000
	18	2.574	2.592	2.586	1000X	0.143	0.181	0.183	21.000	20.778	21.000
	24	3.732	4.650	4.314	1000X	0.143	0.159	0.146	16.889	18.333	16.889
	30	4.860	5.175	5.190	1000X	0.122	0.163	0.148	17.111	18.778	17.111
	36	5.217	5.277	5.331	1000X	0.145	0.132	0.136	15.722	15.333	15.722
	42	5.460	5.670	5.412	1000X	0.127	0.120	0.130	15.111	14.000	15.111
	48	5.418	5.706	5.424	1000X	0.110	0.126	0.140	16.222	14.667	16.222
	54	5.424	5.412	5.406	1000X	0.127	0.138	0.127	14.778	16.000	14.778
60	5.730	5.694	5.643	1000X	0.136	0.132	0.130	15.111	15.333	15.111	
66	5.610	5.628	5.556	1000X	0.127	0.148	0.131	15.222	17.111	15.222	
72	5.538	5.550	5.454	1000X	0.121	0.130	0.148	17.111	15.111	17.111	

ตารางที่ ข.16 (ต่อ)

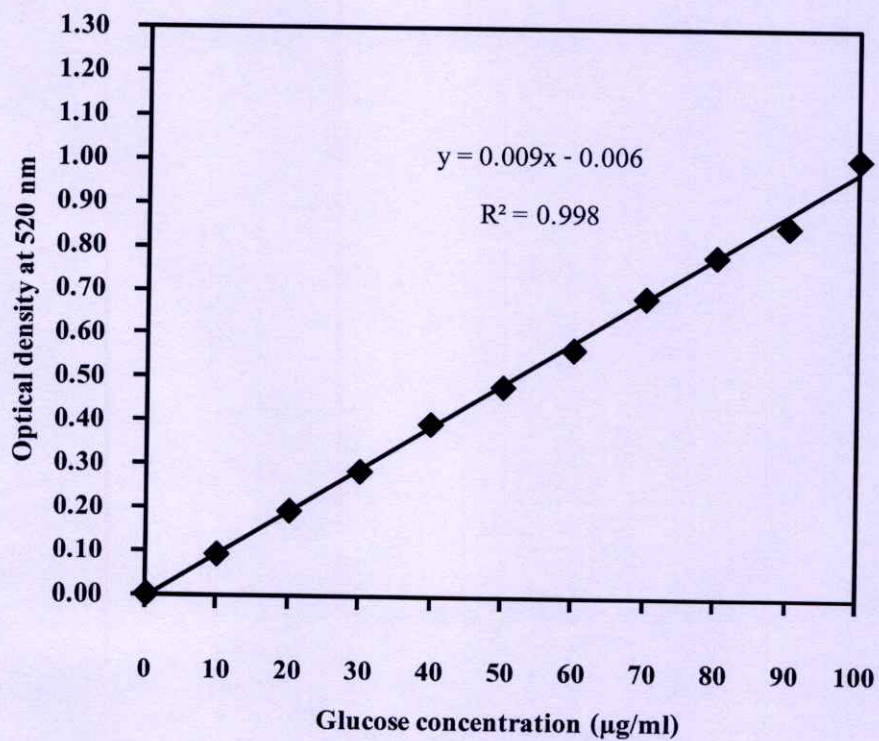
C/N ratio	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600</sub>			dilution	ปริมาณน้ำตาตรีวิตซ์ (กรัมต่อลิตร)					
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		A <sub>520</sub> <sup>†</sup>			ความเข้มข้น <sup>‡</sup>		
						1	2	3	1	2	3
800	0	0.103	0.103	0.103	1000X	0.355	0.323	0.347	40.111	36.556	39.222
	6	1.293	1.275	1.170	1000X	0.322	0.350	0.301	36.444	39.556	34.111
	12	1.533	1.746	2.067	1000X	0.308	0.246	0.321	34.889	28.000	36.333
	18	2.301	2.301	2.604	1000X	0.244	0.267	0.291	27.778	30.333	33.000
	24	4.677	4.635	4.653	1000X	0.220	0.284	0.250	25.111	32.222	28.444
	30	5.157	5.466	5.193	1000X	0.240	0.256	0.230	27.333	29.111	26.222
	36	5.433	5.535	5.367	1000X	0.205	0.243	0.221	23.444	27.667	25.222
	42	5.838	5.862	5.742	1000X	0.207	0.232	0.209	23.667	26.444	23.889
48	5.760	5.928	5.976	1000X	0.223	0.211	0.206	25.444	24.111	23.556	
54	5.970	5.904	5.940	1000X	0.214	0.182	0.210	24.444	20.889	24.000	
60	5.973	5.934	5.958	1000X	0.187	0.165	0.180	21.444	19.000	20.667	
66	5.808	5.484	5.952	1000X	0.153	0.162	0.176	17.667	18.667	20.222	
72	5.982	5.778	5.754	1000X	0.154	0.123	0.187	17.778	14.333	21.444	

† ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

‡ ฟังก์ชันสมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณดูได้จากรูปที่ ข.8

ตารางที่ ข.17 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	0.000	0.000	0.000
10	0.086	0.095	0.094
20	0.186	0.195	0.194
30	0.278	0.297	0.280
40	0.388	0.411	0.384
50	0.472	0.483	0.483
60	0.550	0.567	0.584
70	0.721	0.651	0.681
80	0.787	0.775	0.780
90	0.852	0.839	0.858
100	0.985	1.020	1.010



รูปที่ ข.8 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

ตารางที่ ข.18 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่า C/N ratio แตกต่างกัน

C/N ratio	ปริมาตรของน้ำเสีย (mL)	น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดที่ได้ (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใช้ในการสกัด (กรัม)	น้ำหนักขูดก้นกลมอบแห้ง (กรัม)		น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ (กรัม)
				ก่อนสกัด	หลังสกัด	
100	3,000	0.6120	0.2065	104.1279	104.1542	0.0263
			0.2033	92.9119	92.9326	0.0207
			0.2022	93.2932	93.3124	0.0192
200	1,000	0.7791	0.2047	55.8740	55.9065	0.0325
			0.2019	61.2789	61.3081	0.0292
			0.2038	57.9746	58.0049	0.0303
400	1,000	0.8724	0.2010	61.6528	61.6859	0.0331
			0.2027	55.5924	55.6285	0.0361
			0.2088	91.4507	91.4827	0.0320
600	1,000	0.8787	0.2033	102.0745	102.1108	0.0363
			0.2047	106.8920	106.9316	0.0396
			0.2040	104.1270	104.1629	0.0359
800	1,000	0.8791	0.2026	93.2955	93.3184	0.0229
			0.2002	95.1222	95.1493	0.0271
			0.2005	92.9142	92.9394	0.0252

## ภาคผนวก ก

ตารางที่ ค.1 ผลของช่วงเวลาต่อการผลิตลิวินที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิวินของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

ช่วงเวลา	ปริมาณลิวินทั้งหมด (% dry cell weight)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
18	7.8821	9.2981	9.1750	8.7851	0.7844
36	11.5085	11.8465	11.3934	11.5828	0.2355
72	6.9890	6.8774	7.5140	7.4601	0.4466

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$H_1$  : ช่วงเวลาอย่างน้อย 1 ช่วงมีปริมาณลิวินทั้งหมดเฉลี่ยแตกต่างกัน

ตารางที่ ค.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิวินทั้งหมด

### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26.579	2	13.290	45.813	0.000
Within Groups	1.741	6	0.290		
Total	28.320	8			

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS พบว่า

จากตารางที่ ค.2 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ  $H_0$  สรุปว่าช่วงเวลาอย่างน้อย 1 ช่วงมีปริมาณลิวินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.3 การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีค้นแกนส์

Duncan

Time	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
72.00	3	7.4601		
18.00	3		8.7851	
36.00	3			11.5828
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ค.4 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตลิพิดที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณลิพิดทั้งหมด (% dry cell weight)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
Glucose	9.3201	11.7278	10.4249	10.4909	1.2052
Fluctose	11.5562	11.3712	12.9666	11.9647	0.8726
Sucrose	8.6610	8.6537	7.7296	8.2481	0.7088
Sodium acetate	11.3320	13.2803	11.5999	12.0708	1.0561

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

$H_1$  : แหล่งคาร์บอนอย่างน้อย 1 แหล่งมีปริมาณลิพิดทั้งหมดเฉลี่ยแตกต่างกัน

ตารางที่ ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.601	3	9.534	9.952	0.004
Within Groups	7.663	8	0.958		
Total	36.264	11			

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS พบว่า

จากตารางที่ ค.5 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.004 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ  $H_0$

สรุปว่าแหล่งคาร์บอนอย่างน้อย 1 แหล่งมีปริมาณลิพิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.6 การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีค้นแคนส์

**Duncan**

Carbon source	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Sucrose	3	8.2481	
Glucose	3		10.4909
Fluctose	3		11.9647
Sodium acetate	3		12.0707
Sig.		1.000	.094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ค.7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตลิวคิน เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิวคินของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณลิวคินทั้งหมด (% dry cell weight)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
Ammonium sulfate	14.2461	15.7947	14.9935	15.0114	0.7744
Urea	10.2552	12.0455	12.1801	11.4936	1.0746
Ammonium chloride	8.4434	9.9967	10.9748	9.8050	1.2766
Sodium nitrate	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a = ข้อมูลไม่มีเนื่องจากเซลล์เจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$H_1$  : แหล่งไนโตรเจนอย่างน้อย 1 แหล่งมีปริมาณลิวคินทั้งหมดเฉลี่ยแตกต่างกัน

ตารางที่ ค.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิวคินทั้งหมด

#### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42.334	2	21.167	18.764	0.003
Within Groups	6.768	6	1.128		
Total	49.102	8			

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS พบว่า

จากตารางที่ ค.8 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.003 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ  $H_0$

สรุปว่าแหล่งไนโตรเจนอย่างน้อย 1 แหล่งมีปริมาณลิวคินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.9 การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีค้นแคนส์

Duncan

Nitrogen source	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Ammonium chloride	3	9.8050	
Urea	3	11.4936	
Ammonium sulfate	3		15.0114
Sig.		.099	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ค.10 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตลิพิด เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณลิพิดทั้งหมด (% dry cell weight)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
Ammonium sulfate	14.8058	10.5731	12.0735	12.0735	2.3701
Urea	8.7279	9.1960	8.8326	8.9188	0.2457
Ammonium chloride	6.7421	5.1935	4.2864	5.4074	1.217
Sodium nitrate	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a = ข้อมูลไม่มีเนื่องจากเซลล์เจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$H_1$  : แหล่งไนโตรเจนอย่างน้อย 1 แหล่งมีปริมาณลิพิดทั้งหมดเฉลี่ยแตกต่างกัน

ตารางที่ ค.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	66.720	2	33.360	13.863	.006
Within Groups	14.439	6	2.406		
Total	81.159	8			

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS พบว่า

จากตารางที่ ค.11 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.006 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ  $H_0$

สรุปว่าแหล่งคาร์บอนอย่างน้อย 1 แหล่งมีปริมาณลิพิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.12 การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีต้นแคนส์

Duncan

Nitrogen source	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Ammonium sulfate	3	5.4073		
Urea	3		8.9188	
Ammonium chloride	3			12.0735
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

**ตารางที่ ค.13** ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการผลิตลิกนิน เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิกนินของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

ความเข้มข้นของไนโตรเจน (gN/L)	ปริมาณลิกนินทั้งหมด (% dry cell weight)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
0.1	15.0975	17.7447	17.3652	16.7424	1.4385
1	12.3894	13.7477	14.5250	13.5540	1.0809
2	10.7285	9.8664	10.5095	10.3682	0.4481
5	8.6199	7.0090	6.6138	7.4146	1.0627
10	11.0671	10.6477	10.6568	10.7905	0.2396

n/a = ข้อมูลไม่มีเนื่องจากเซลล์เจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$$

$H_1$  : ความเข้มข้นของไนโตรเจนอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นมีปริมาณลิกนินทั้งหมดเฉลี่ยแตกต่างกัน

**ตารางที่ ค.14** การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิกนินทั้งหมด

#### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	149.416	4	37.354	40.382	0.000
Within Groups	9.250	10	0.925		
Total	158.666	14			

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS พบว่า

จากตารางที่ ค.14 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ  $H_0$

สรุปว่าความเข้มข้นของไนโตรเจน อย่างน้อย 1 ความเข้มข้นมีปริมาณลิกนินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.15 การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีดัชนีแคนส์

**Duncan**

Nitrogen concentration (g/L)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
5	3	7.4142			
2	3		10.3681		
10	3		10.7905		
1	3			13.5540	
0.1	3				16.7425
Sig.		1.000	.602	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ค.16 ผลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตลิพิด ที่ได้จากการทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One way ANOVA ของการสะสมลิพิดของแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. KMITL-R4.4 ในน้ำเสียสังเคราะห์

อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ปริมาณลิพิดทั้งหมด (% dry cell weight)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
100	12.7522	10.1820	9.5120	10.8154	1.7104
200	15.8606	14.4461	14.8675	15.0581	0.7263
400	16.4677	17.8260	15.3416	16.5451	1.2440
600	17.8718	19.3454	17.5980	18.2717	0.9398
800	11.3195	13.5365	12.5520	12.4693	1.1108

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$$

$H_1$  : อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อัตราส่วนมีปริมาณลิพิดทั้งหมดเฉลี่ยแตกต่างกัน

ตารางที่ ค.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณลิพิดทั้งหมด

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	108.998	4	27.250	19.142	0.000
Within Groups	14.236	10	1.424		
Total	123.234	14			

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS พบว่า

จากตารางที่ ค.17 พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ  $H_0$

สรุปว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อัตราส่วนมีปริมาณลิพิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ค.18 การเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดวิธีค้นแคนส์

Duncan

C/N ratio	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
100	3	10.8154		
800	3	12.4693		
200	3		15.0581	
400	3		16.5451	16.5451
600	3			18.2717
Sig.		.120	.158	.107

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

## ภาคผนวก ง

R4_4	----	CTA-CACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	44
Aeromonas sobria strain JY081016-1	----	CTA-CACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	44
Aeromonas sobria strain NQ090701	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas sobria strain LD081008A-1	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas veronii strain YA0900911	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas veronii strain CYJ202	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas culicicola strain 037TRG	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Aeromonas veronii strain JF46112	----	CTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT	45
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1	AGGCCTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT		43
Pseudomonas fluorescens strain KB6	AGGCCTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT		45
Pseudomonas putida isolate Tel	AGGCCTAACACA-TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACT		43
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110	-----ATACAATGCA-GTCGAGCGG---A-GA-GTGAGCTTGC--TC		34
Pseudomonas aeruginosa strain AV2	TGGCTAAAACA-TGCA-GTCGAGCGG---ATGAAGGAGCTTGC--TC		42
	*** **		
R4_4	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	94	
Aeromonas sobria strain JY081016-1	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	94	
Aeromonas sobria strain NQ090701	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95	
Aeromonas sobria strain LD081008A-1	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95	
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95	
Aeromonas veronii strain YA09011	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95	
Aeromonas veronii strain CYJ202	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95	
Aeromonas culicicola strain 03037TRG	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95	
Aeromonas veronii strain JF46112	TTTGCCCGGCGAGCGGCAGCGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGT	95	
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1	TCTGAT--TCAGCGCGGAGCGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT	91	
Pseudomonas fluorescens strain KB6	CTTGA---GAGCGCGGAGCGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT	91	
Pseudomonas putida isolate Tel	CTTGA---TCAGCGCGGAGCGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT	91	
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110	ACGGAT--TCAGCGCGGAGCGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT	82	
Pseudomonas aeruginosa strain AV2	CTGGAT--TCAGCGCGGAGCGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT	90	
	*****		
R4_4	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	144	
Aeromonas sobria strain JY081016-1	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	144	
Aeromonas sobria strain NQ090701	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	145	
Aeromonas sobria strain LD081008A-1	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	145	
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	145	
Aeromonas veronii strain YA0900911	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	145	
Aeromonas veronii strain CYJ202	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	145	
Aeromonas culicicola strain 037TRG	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	145	
Aeromonas veronii strain JF46112	CGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACG	145	
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1	AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACG	141	
Pseudomonas fluorescens strain KB6	AGTGGGGGATAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACG	141	
Pseudomonas putida isolate Tel	AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACG	141	
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110	AGTGGGGGATAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACG	132	
Pseudomonas aeruginosa strain AV2	AGTGGGGGATAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACG	140	
	*****		
R4_4	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	194	
Aeromonas sobria strain JY081016-1	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	194	
Aeromonas sobria strain NQ090701	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	195	
Aeromonas sobria strain LD081008A-1	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	195	
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	195	
Aeromonas veronii strain YA09011	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	195	
Aeromonas veronii strain CYJ202	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	195	
Aeromonas culicicola strain 03037TRG	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	195	
Aeromonas veronii strain JF46112	GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTG	195	
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1	GGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTC	191	
Pseudomonas fluorescens strain KB6	GGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTC	191	
Pseudomonas putida isolate Tel	GGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTC	191	
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110	GGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTC	182	
Pseudomonas aeruginosa strain AV2	GGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTC	190	
	*****		

รูปที่ ง.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท R.4 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่มีการรายงานไว้ใน GenBank

R4\_4  
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 244  
Aeromonas sobria strain NQ090701 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245  
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245  
Aeromonas hydrophila strain NBRC12658 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245  
Aeromonas veronii strain YA0900911 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245  
Aeromonas veronii strain CYJ202 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245  
Aeromonas culicicola strain 037TRG GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245  
Aeromonas veronii strain JF46112 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 245  
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 241  
Pseudomonas fluorescens strain KB6 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 241  
Pseudomonas putida isolate Tel GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 241  
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD10 GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 232  
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGC 240  
\*\*\*\*\* \*\*

R4\_4  
Aeromonas sobria strain JY081016-1 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 294  
Aeromonas sobria strain NQ090701 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 294  
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 295  
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 295  
Aeromonas veronii strain YA0900911 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 295  
Aeromonas veronii strain CYJ202 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 295  
Aeromonas culicicola strain 03037TRG TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 295  
Aeromonas veronii strain JF46112 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 295  
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCCACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 291  
Pseudomonas fluorescens strain KB6 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCCACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 291  
Pseudomonas putida isolate Tel TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCCACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 291  
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD10 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCCACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 282  
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCCACTGGAAGTGGAGACCGTCCAGACT 290  
\*\*\*\*\* \*\*

R4\_4  
Aeromonas sobria strain JY081016-1 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 344  
Aeromonas sobria strain NQ090701 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 345  
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 345  
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 345  
Aeromonas veronii strain YA0900911 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 345  
Aeromonas veronii strain CYJ202 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 345  
Aeromonas culicicola strain 03037TRG CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 345  
Aeromonas veronii strain JF46112 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 345  
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 341  
Pseudomonas fluorescens strain KB6 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 341  
Pseudomonas putida isolate Tel CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 341  
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD10 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 332  
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCCTGAT 340  
\*\*\*\*\* \*\*

R4\_4  
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 394  
Aeromonas sobria strain NQ090701 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 394  
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395  
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395  
Aeromonas veronii strain YA0900911 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395  
Aeromonas veronii strain CYJ202 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395  
Aeromonas culicicola strain 03037TRG GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395  
Aeromonas veronii strain JF46112 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 395  
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 391  
Pseudomonas fluorescens strain KB6 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 391  
Pseudomonas putida isolate Tel GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 391  
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD10 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 382  
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTC 390  
\*\*\*\*\* \*\*

R4\_4  
Aeromonas sobria strain JY081016-1 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 444  
Aeromonas sobria strain NQ090701 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 444  
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445  
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445  
Aeromonas veronii strain YA0900911 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445  
Aeromonas veronii strain CYJ202 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445  
Aeromonas culicicola strain 03037TRG AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445  
Aeromonas veronii strain JF46112 AGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTC 445  
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 441  
Pseudomonas fluorescens strain KB6 AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 441  
Pseudomonas putida isolate Tel AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 441  
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD10 AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCG 432  
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 AGTTGGGAGGAAAGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCA 440  
\*\* \*\*\*\*\* \*\*

รูปที่ ๓.1 (ต่อ)



R4\_4  
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 742  
 Aeromonas sobria strain NQ090701 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 742  
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743  
 Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743  
 Aeromonas veronii strain YA0900911 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743  
 Aeromonas veronii strain CYJ202 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743  
 Aeromonas culicicola strain\_03037TRG TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743  
 Aeromonas veronii strain JF46112 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 743  
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 739  
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 739  
 Pseudomonas putida isolate Tel TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 739  
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 731  
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAACAGGAT 737  
 \*\*\*\*\*

R4\_4  
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 792  
 Aeromonas sobria strain NQ090701 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 792  
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 793  
 Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 793  
 Aeromonas veronii strain YA0900911 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 793  
 Aeromonas veronii strain CYJ202 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 793  
 Aeromonas culicicola strain\_03037TRG TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 793  
 Aeromonas veronii strain JF46112 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 793  
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 793  
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 793  
 Pseudomonas putida isolate Tel TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 789  
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 789  
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTATGTCGATTGGAGGCTGTG 787  
 \*\*\*\*\*

R4\_4  
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 842  
 Aeromonas sobria strain NQ090701 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 842  
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 843  
 Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 843  
 Aeromonas veronii strain YA0900911 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 843  
 Aeromonas veronii strain CYJ202 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 843  
 Aeromonas culicicola strain\_03037TRG TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 843  
 Aeromonas veronii strain JF46112 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 843  
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 TCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCGCTGGGG 843  
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 GCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCCGCTGGGG 839  
 Pseudomonas putida isolate Tel GCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCCGCTGGGG 839  
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TCCTTGAGACTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCCGCTGGGG 839  
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TCCTTGAGACTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCCGCTGGGG 831  
 \*\*\*\*\*

R4\_4  
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 892  
 Aeromonas sobria strain NQ090701 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 892  
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893  
 Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893  
 Aeromonas veronii strain YA0900911 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893  
 Aeromonas veronii strain CYJ202 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893  
 Aeromonas culicicola strain\_03037TRG AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893  
 Aeromonas veronii strain JF46112 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 893  
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 889  
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 889  
 Pseudomonas putida isolate Tel AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 889  
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 881  
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA 887  
 \*\*\*\*\*

R4\_4  
 Aeromonas sobria strain JY081016-1 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 942  
 Aeromonas sobria strain NQ090701 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 942  
 Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943  
 Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943  
 Aeromonas veronii strain YA0900911 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943  
 Aeromonas veronii strain CYJ202 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943  
 Aeromonas culicicola strain\_03037TRG GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943  
 Aeromonas veronii strain JF46112 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943  
 Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 943  
 Pseudomonas fluorescens strain KB6 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 939  
 Pseudomonas putida isolate Tel GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 939  
 Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 931  
 Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG 937  
 \*\*\*\*\*

R4\_4  
Aeromonas sobria strain JY081016-1 CCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 991  
Aeromonas sobria strain NQ090701 CCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992  
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 CCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992  
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 CCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992  
Aeromonas veronii strain YA0900911 CCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992  
Aeromonas veronii strain CYJ202 CCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992  
Aeromonas culicicola strain\_03037TRG CCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992  
Aeromonas veronii strain JF46112 CCTTGACATGTCTGGAATCCTGYAGAGATRCGGGAGTGCCTTCGGG-AAT 992  
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 CCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG-AAC 988  
Aeromonas fluorescens strain KB6 CCTTGACATCCAATGAACTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGG-AAC 988  
Pseudomonas putida isolate Tel CCTTGACATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG-AAC 988  
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 CCTTGACATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG-AAC 980  
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 CCTTGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAAC 987  
\*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\*

R4\_4  
Aeromonas sobria strain JY081016-1 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1041  
Aeromonas sobria strain NQ090701 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1041  
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1042  
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1042  
Aeromonas veronii strain YA0900911 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1042  
Aeromonas veronii strain CYJ202 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1042  
Aeromonas culicicola strain\_03037TRG CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1042  
Aeromonas veronii strain JF46112 CAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1042  
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 ATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1038  
Pseudomonas fluorescens strain KB6 ATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1038  
Pseudomonas putida isolate Tel TCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1038  
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 TCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1030  
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 TCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGCCTTCGGG-AAT 1037  
\* \*\*\*\*\*

R4\_4 GG 1043  
Aeromonas sobria strain JY081016-1 GG 1043  
Aeromonas sobria strain NQ090701 GG 1044  
Aeromonas sobria strain LD081008A-1 GG 1044  
Aeromonas hydrophila strain NBRC 12658 GG 1044  
Aeromonas veronii strain YA0900911 GG 1044  
Aeromonas veronii strain CYJ202 GG 1044  
Aeromonas culicicola strain\_03037TRG GG 1044  
Aeromonas veronii strain JF46112 GG 1044  
Pseudomonas vancouverensis strain MEBHU1 GG 1040  
Pseudomonas fluorescens strain KB6 GG 1040  
Pseudomonas putida isolate Tel GG 1040  
Pseudomonas plecoglossicida strain MSSRFD110 GG 1032  
Pseudomonas aeruginosa strain AV2 GG 1039  
\*\*

รูปที่ ๓.1 (ต่อ)

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวรัตติยา อ่องมะลิ เกิดเมื่อวันที่ 7 ธันวาคม พ.ศ. 2528 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 131/23 ถนนอุ่ทอง ตำบลบ้านเหนือ อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี 71000 ในปี พ.ศ. 2551 สำเร็จการศึกษาวิทยาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำเร็จการศึกษาในปีพ.ศ. 2555