การแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้จากดินบริเวณเขตลาดกระบัง

ISOLATION OF BUTANOL-PRODUCING *CLOSTRIDIUM* SPP.FROM SOIL IN LADKRABANG AREA

กรกนก อาจสุโพธิ์
กรกมล ใบโสภณ
เกื้อกูล จิตร์ชัย

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้จากดินบริเวณเขตลาดกระบัง

ISOLATION OF BUTANOL-PRODUCING *CLOSTRIDIUM* SPP.FROM SOIL IN LADKRABANG AREA

กรกนก อาจสุโพธิ์

กรกมล ใบโสภณ

เกื้อกูล จิตร์ชัย

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF BUTANOL-PRODUCING *CLOSTRIDIUM* SPP. FROM SOIL IN LADKRABANG AREA

KORNKANOK ARTSUPHO

KORNKAMON BAISOPON

KUEKOON JITCHAI

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	การแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ จากดินบริเวณเขตลาดกระบัง Isolation of butanol-producing *Clostridium* spp from soil in Ladkrabang area
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกรกนก อาจสุโพธิ์ รหัสนักศึกษา 55051226 นางสาวกรกมล ใบโสภณ รหัสนักศึกษา 55051227 นางสาวเกื้อกูล จิตร์ชัย รหัสนักศึกษา 55051238
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ลินจง สุขลำภู ประธานกรรมการ	
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากดินบริเวณเขตลาดกระบัง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกรกนก อาจสุโพธิ์ รหัสนักศึกษา 55051226
	นางสาวกรกมล ใบโสภณ รหัสนักศึกษา 55051227
	นางสาวเกื้อกูล จิตร์ชัย รหัสนักศึกษา 55051238
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

บิวทานอลเป็นตัวทำละลายที่ได้รับความสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากให้พลังงานสูง และใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ในการผลิตตัวทำละลายอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone butanol ethanol, ABE) ทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Clostridium* spp. ซึ่งสามารถพบได้ในดิน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 65 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อได้ 96 ไอโซเลท คาดว่าจะเป็นเชื้อ *Clostridium* spp. และสามารถผลิต ABE ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ผลการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC พบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลทคือ J7a H1a C2a H2a และ D3b ที่สามารถผลิต ABE ได้มากที่สุดในปริมาณ 1.77 กรัมต่อลิตร 1.14 กรัมต่อลิตร 0.84 กรัมต่อลิตร 0.82 กรัมต่อลิตรและ 0.57กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้แก่ การหมักน้ำตาล การเคลื่อนที่ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส เพื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะทางชีวเคมีกับเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ซึ่งเป็นเชื้ออ้างอิง พบว่าเชื้อรหัส C2a คาดว่าอาจเป็นเชื้อ *Clostridium* spp. เพราะมีคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงกับเอกสารอ้างอิงของ Prescott, 1993 และเชื้ออ้างอิง

คำสำคัญ : บิวทานอล, ABE, *Clostridium*,การคัดแยกเชื้อ,พลังงานชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of butanol-producing *Clostridium*spp from soil in Ladkrabang area.
Students	Miss Kornkanok Artsupho Student ID 55051226
	Miss Kornkamon Baisopon Student ID 55051227
	Miss Kuekoon Jitchai Student ID 55051238
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Vorapat Sanguancchaipaiwong, Ph.D

ABSTRACT

Butanol has gained a lot of attention, because It provides high energy, and can be utilized as solvent in industries. *Clostridium* spp. can produce acetone butanol ethanol (ABE) by biotechnology method .This genus can be found in many natural sources including soil. In this study, 96 isolates of microorganisms were isolated form 65 soils sample in Ladkrabang area. Among these, 10 Isolates were assumed to be *Clostridium* spp. from their physiology and ability to produce ABE. Results of HPLC from 5 high ABE producing isolates; J7a H1 C2a H2a and D3b, produced ABE concentration of 1.77 1.44 0.84 and 0.57 g/L, respectively. The Biochemical tests, such as carbohydrate fermentation test, motility test and catalase test, were carried on to compare with *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 as a reference microorganism. C2a was expected to be Clostridium spp.,since it has biochemical qualification matched with reference of Prescott, 1993 and microorganism reference.

Keywords : butanol, ABE, *Clostridium*, Isolation, Biofuels

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษเป็นอย่างสูงที่คอยให้ความรู้ ให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอนให้โครงงานพิเศษออกมาสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.ลินจง สุขลำภู ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการโครงงานพิเศษที่ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานออกมาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ ฝ่ายธุรการ รวมถึงแม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งทุกท่านได้ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการจัดทำโครงงานพิเศษ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์สารเคมีต่างๆ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณนางสาวบุษบา บัวเขียว นักศึกษาปริญญาโทและเพื่อนๆร่วมสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาอย่างดียิ่ง

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ ที่ได้อบรมสั่งสอน และให้การสนับสนุนทางการศึกษา ให้กำลังใจ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา หวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากดินบริเวณเขตลาดกระบัง และหากโครงงานพิเศษเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำงานวิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี่

กรกนก อาจสุโพธิ์
กรกมล ใบโสภณ
เกื้อกูล จิตร์ชัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล	3
2.1.1 บิวทานอล	3
2.1.2 ประวัติความเป็นมาของบิวทานอล	3
2.1.3 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิง	5
2.1.4 การใช้บิวทานอลในระดับอุตสาหกรรม	6
2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล	6
2.2.1 ลักษณะทั่วไปของ *Clostridium*	6
2.2.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Clostridium* spp.	8
2.2.3 ปัจจัยในการเจริญ	8
2.2.4 วงจรชีวิตและการเจริญ	9
2.3 การจัดจำแนกเชื้อ *Clostridium* spp.	9
2.4 การทดสอบทางชีวเคมีของ *Clostridium* spp.	10
2.5 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก	11
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	18
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	18
3.1.1 จุลินทรีย์และวิธีการแยกเชื้อ	18
3.1.2 สารเคมี	18
3.1.3 อุปกรณ์	19
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM,Oxoid)	19
3.2.2 อาหาร T6 (ปรับปรุงจาก อาหาร TYA)	19
3.3 การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* ที่ผลิตตัวทำละลาย	20
3.4 ลักษณะทางกายภาพและการสร้างสปอร์	20
3.4.1 การย้อมแกรม	20
3.4.2 การย้อมสปอร์	21
3.5 การผลิตและวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล	21
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	21
3.7 การทดสอบทางชีวเคมี	22
3.7.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส	22
3.7.2 การทดสอบการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส	22
3.7.3 การทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโตส	22
3.7.4 การทดสอบการหมักน้ำตาลไซโลส	22
3.7.5 การทดสอบการเคลื่อนที่	22
3.7.6 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส	23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	24
4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อจากดิน	24
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ	27
4.3 ผลการผลิตและวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล	31
4.4 การทดสอบทางชีวเคมี	33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	36
5.1 สรุปผลการวิจัย	36
5.2 ข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	39
ภาคผนวก ก	40
ภาคผนวก ข	41
ภาคผนวก ค	44
ภาคผนวก ง	46
ภาคผนวก จ	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติของบิวทานอลและแก๊สโซลีน	6
2.2 คุณสมบัติของ Clostridia	12
4.1 ลักษณะของดินจากแหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทที่แยกได้	24
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้	27
4.3 ความเข้มข้นรวมของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และความเข้มข้นรวมตัวทำละลายในหน่วยกรัมต่อลิตร ที่วิเคราะห์ได้จากเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. โดยมี *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เป็นเชื้ออ้างอิง	32
4.4 ผลการทดสอบชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp.	34
ข.1 การติดสีแกรมและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp.	41
ง.1 ข้อมูลทางสถิติของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์	46
ง.2 ข้อมูลทางสถิติของอะซิโตน โดยใช้วิธี Duncan's ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์	47
ง.3 ข้อมูลทางสถิติของบิวทานอล โดยใช้วิธี Duncan's ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์	47
ง.4 ข้อมูลทางสถิติของเอทานอล โดยใช้วิธี Duncan's ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์	48
ง.5 ข้อมูลทางสถิติค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของบิวทานอล	3
2.2 ลักษณะรูปร่าง *Clostridium* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)	7
2.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Clostridium* spp.	8
2.4 ระยะการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium*	9
2.5 วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clodtridium*ในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)	16
4.1 ความเข้มข้นของเอทานอล บิวทานอล อะซิโตน(กรัมต่อลิตร) ในรูปแบบแผนภูมิแท่ง	33
ก.1 ขั้นตอนการสตรีคเพลท	41
ค.1 กราฟมาตรฐานสารละลายบิวทานอล	45
ค.2 กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอล	45
ค.3 กราฟมาตรฐานสารละลายอะซิโตน	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโลกของเรากำลังประสบปัญหาภาวะโลกร้อนและการขาดแคลนพลังงานเนื่องจากประชากรโลกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทำให้พลังงานที่มีอยู่ไม่เพียงพอต่อความต้องการ เช่น น้ำมัน ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติและยังเป็นพลังงานที่มีวันหมดสิ้น จึงมีการแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนที่สามารถผลิตได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ เช่น ไบโอก๊าซ(biogas) ไบโอดีเซล(biodiesel) และไบโอแอลกอฮอลล์ (bioalcohol) ซึ่งบิวทานอลได้รับความสนใจในการพัฒนาเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทดแทนมากกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่น บิวทานอลหรือไบโอบิวทานอล(หากได้จากแหล่งชีวภาพ) มีโครงสร้างเป็นแอลกอฮอลล์สายตรง ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ซึ่งในอดีตได้มีการใช้อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลเป็นตัวทำละลายในการผลิตยางสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมและมีการใช้อะซิโตนที่ได้จากการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นสารสำคัญเพื่อทำระเบิดในการทำสงคราม แม้ว่าปัจจุบันบิวทานอลไม่ได้ใช้กันอย่างแพร่หลายนักเมื่อเทียบกับพลังงานชีวภาพตัวอื่นๆ แต่บิวทานอลก็มีคุณสมบัติที่น่าสนใจเมื่อเปรียบเทียบกับแก๊สโซลีนและเอทานอล เนื่องจากบิวทานอลให้พลังงานมากกว่าแก๊สโซลีนและเอทานอล 25 เปอร์เซ็นต์เพราะมีคาร์บอน 4 อะตอม ส่วนเอทานอลมีคาร์บอนเพียง 2 อะตอม สามารถผลิตได้จากวัสดุทางชีวภาพ เช่น ข้าวโพด หญ้า ใบไม้ และของเสียทางการเกษตร มีคุณสมบัติไม่กัดกร่อนและระเหยยากเมื่อเทียบกับแก๊สโซลีนและเอทานอล ทำให้สามารถขนส่งด้วยระบบท่อส่งน้ำมันและไม่ก่อให้เกิดปัญหากับเครื่องยนต์ มีค่าออกเทนใกล้เคียงกับน้ำมันทำให้ผสมกับน้ำมันได้ดีกว่า รวมถึงมีพลังงานและจุดเดือดสูงกว่า เกิดการสันดาปในเครื่องยนต์อย่างสมบูรณ์จึงไม่เกิดมลพิษและไม่ปลดปล่อยแก๊สพิษ และนอกจากนั้นบิวทานอลยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเช่น อุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก อุตสาหกรรมในการแต่งกลิ่นรส อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น

การผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* spp.เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มีขนาด 0.3-1.5 ไมโครเมตร และยาว 3.0-9.0 ไมโครเมตร เซลล์มักอยู่เดี่ยวๆ บางครั้งอาจพบเซลล์เรียงกันอยู่เป็นสายโซ่ มีเอนโดสปอร์รูปร่างกลมหรือรีอยู่ปลายเซลล์หรือเกือบถึงปลายเซลล์ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่ 35-37 องศาเซลเซียส พบตามดินใต้พื้นดิน น้ำสะอาด อาหารที่เน่าเสียเป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจนอย่างแท้จริง เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว โดย *Clostridium* สามารถผลิตบิวทานอลได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนซึ่งเป็นผลดีในการลดต้นทุนการผลิตโดยไม่ต้องใช้ใบพัดในการให้อากาศ ในการหมักบิวทานอลด้วยเชื้อ *Clostridium* สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งเรียกรวมกันว่า การหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone butanol ethanol, ABE) โดยอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์จะเป็น 3:6:1 ซึ่งบิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก *Clostridium*ที่ผลิต ABE มีข้อดีกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้ออื่นๆคือสามารถใช้น้ำตาลเพนโตสและเฮกโซสได้ซึ่งสามารถพบได้ในวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลสโดยการผลิตตัวทำละลายสามารถแบ่งได้ 2 ระยะคือ ระยะแรกเป็นระยะการสร้างกรด (acidogenesis phase) จะมีการสร้างกรดบิวทิริก และกรดอะซิติก ส่วนระยะที่สอง จุลินทรีย์จะเปลี่ยนกรดไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวทำละลายต่างๆคือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เรียกระยะนี้ว่าระยะการสร้างตัวทำละลาย (soventogenesis phase) อัตราส่วนการผลิตจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชีวมวล อุณหภูมิ เป็นต้น

จากการรายงานการใช้ *Clostridium* เพื่อการผลิต ABE ที่ระดับอุตสาหกรรมถูกจำกัด เนื่องจากความต้องการในสภาวะไร้ออกซิเจน และการมีออกซิเจนในการหมัก ABE มีผลกระทบที่สำคัญ ดังนั้นควรต้องทำการแยกเชื้อ *Clostridium*ซึ่งสามารถพบได้ตามธรรมชาติ เช่น น้ำดินของเสียลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ในโครงการวิจัยนี้จึงสนใจในการแยกเชื้อ *Clostridium* spp. สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณมากโดยจะทำการคัดเลือกเชื้อจากดินในเขตลาดกระบังเพื่อหาสายพันธุ์ของ *Clostridium* ซึ่งสามารถผลิตบิวทานอลได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อแยกเชื้อที่คาดว่าเป็น *Clostridium* spp.จากแหล่งดินบริเวณเขตลาดกระบัง
2) เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตบิวทานอลของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. ที่แยกได้จากดิน
3) เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. ที่แยกได้จากดิน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการแยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp.จากแหล่งดินบริเวณเขตลาดกระบัง โดยใช้อาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM) ในการแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการผลิตบิวทานอลของแต่ละไอโซเลทโดยใช้อาหาร T6 จากนั้นนำไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลสูงมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พบเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. ที่แยกได้จากดินบริเวณเขตลาดกระบัง และสามารถผลิตบิวทานอลได้

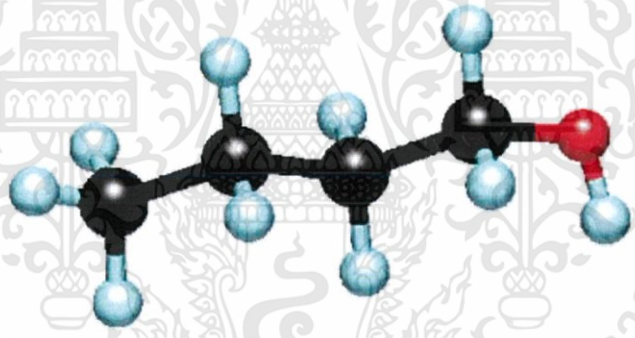
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล

2.1.1 บิวทานอล

บิวทานอล (IUPAC Nomenclature, 1-butanol; CAS no. 71-36-3) มีอีกชื่อคือบิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol) มีองค์ประกอบที่มีคาร์บอน 4 อะตอมต่อเป็นสายตรง (4-carbon Aliphatic Alcohol) มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น C_4H_9OH ดังรูปที่ 2.1 มีน้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมลบิวทานอลไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่ไม่ละลายน้ำ มีกลิ่นคล้ายคลึงกับกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอลล์รุนแรง ระคายเคืองต่อตาและผิวหนัง มีคุณสมบัติสามารถรวมกับตัวทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ แต่สามารถแยกออกจากน้ำและสารเคมีอื่นๆ ที่เป็นแอลกอฮอลล์กลุ่มเดียวกัน คือเมทา-นอล เอทานอล และโพรพานอล (ชนิกาและคณะ, 2555)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของบิวทานอล

ที่มา :http://www.hydrocarbonstechnology.com/projects/hullbioethanol/hullbioethanol3.html (วันที่สืบค้น 23มิถุนายน พ.ศ. 2559)

2.1.2 ประวัติความเป็นมาของบิวทานอล

ในปี 1862 หลุยซ์ ปลาสเตอร์นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสที่มีชื่อเสียงในยุคนั้นได้นำเสนอเกี่ยวกับการผลิตแอลกอฮอลล์โดยใช้การหมักของ "Vibrionbutyriqe" ซึ่งเป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ยังไม่บริสุทธิ์แต่คาดเดาได้ว่าเป็นสกุล Clostridia สายพันธุ์ *Clostridium butylicum* หรือ *Clostridium acetobutylicum* โดยอัลเบิร์ตฟิตซ์ ผู้ที่ตีพิมพ์หนังสือ*Bacillus Butylicus* เป็นผู้ที่สามารถแยกสายพันธุ์ให้บริสุทธิ์ได้ สายพันธุ์นี้ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญสร้างสปอร์แบคทีเรียสามารถหมักกลีเซอรอลแมนนิทอลและซูโครสให้เป็นบิวทานอลบิวทิเรต คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนได้ โดยผลิตอะซิเตทเอทานอลแลคเตทและโพรพานีไดออลได้เพียงเล็กน้อยแบคทีเรียจะตายหากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเข้มข้นสูง จึงได้ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตบิวทานอลใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศตวรรษที่ 20 ซึ่งขณะนั้นเองนักจุลชีววิทยาที่มีชื่อเสียง MartinusBeijinckiiและ Sergei Winogradskyได้ทำการตั้งชื่อจีนัส*Clostridium*ซึ่งได้บอกถึงลักษณะเชิงสัณฐานหมายถึงแกนหมุนขนาดเล็ก ดั้งนั้นจึงไม่เป็นที่น่าแปลกใจเลยว่ามีการเรียกชื่อที่หลากหลายเช่น *Granulobacter saccharobutylicum, Amylobacter butylicum*และ *Bacillus orthobutylicus* ขณะที่ Clostridia เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายมากกว่า โดยมีคุณสมบัติคือไม่ต้องการหรือต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย สร้างสปอร์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก

ตัวทำละลายที่ได้จากจุลินทรีย์ผลิตเพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรมเรียกว่า อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone butanol ethanol, ABE) กระบวนการหมักเป็นอุตสาหกรรมทางชีวภาพที่ใหญ่เป็นอันดับสองถัดจากกระบวนการหมักเอทานอลย้อนกลับไปเมื่อศตวรรษที่ 20 เมื่อนักวิทยาศาสตร์ได้มีความพยายามที่จะผลิตยางสังเคราะห์โดยใช้ไอโซพรีนในการสังเคราะห์ซึ่งสามารถผลิตจากไอโซเอมอลแอลกอฮอลล์ อีกทางเลือกหนึ่งคือบิวทาไดอีนที่ได้จากบิวทานอลFrenbach, Schoenและ Weizmann ได้ทำงานให้กับบริษัทหนึ่งของอังกฤษ ในปี 1911 Frenbach และ Schoen ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับกระบวนการหมักเอมิล บิวทิลและเอททิล แอลกอฮอลล์โดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ผสม Weizmann ได้ออกจากกลุ่มวิจัยในปี 1912 แต่ยังคงทำงานเกี่ยวกับเรื่องนี้อยู่ ในบันทึกของ Weizmannได้กล่าวว่าเขาได้ประสบความสำเร็จในการแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่สามารถผลิตของเหลวจำนวนมากที่มีกลิ่นคล้ายกับเอมิลแอลกอฮอลล์ซึ่งในความจริงแล้วคือสารผสมระหว่างอะซิโตนและบิวทานอล (Cheng, 2009)

เมื่อราคายางธรรมชาติลดลงในขณะที่ผลผลิตจากแถบเอเชียเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์อะซิโตนยังสามารถช่วยให้อุตสาหกรรมการหมัก ABE ยังสามารถดำเนินต่อไปได้ ในเดือนพฤศจิกายนปี1914 หลังเกิดสงครามโลกครั้งที่ 1 ได้ไม่นานอะซิโตนมีความต้องการจำนวนมากและประเทศอังกฤษสามารถใช้วิธีการทางเคมีในการผลิตอะซิโตนในการทำสงคราม Weizmann ได้ทำงานให้กับประเทศสหรัฐอเมริกาทำการผลิตอะซิโตนและแอลกอฮอล์จากวัสดุจำพวกแป้งโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมซึ่งต่อมารู้จักในชื่อว่า *C. acetobutylicum* ข้อได้เปรียบที่ดีกว่าสายพันธุ์ Frenbach คือสามารถผลิตตัวทำละลายได้มากกว่าโดยเฉพาะอะซิโตนและมีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นที่หลากหลาย โดยกระบวนการนี้ได้รับการรับรองความมั่นคงโดยความต้องการอะซิโตนในประเทศอังกฤษประเทศแคนนาดาและประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างช่วงสงคราม ต่อมา Weizmann ได้เป็นผู้นำในประเทศที่ค้นพบใหม่คือประเทศอิสราเอล (Cheng, 2009)

บิวทานอลเกือบทั้งหมดไม่ได้ใช้ในช่วงสงครามแต่มีการเก็บสารไว้จำนวนมากหลังสงครามโลกจบลงโรงงานที่ผลิต ABE ได้ปิดตัวลงเพราะความต้องการของอะซิโตนลดลง ในปี 1920 ได้มีการให้ยุติการซื้อขายแอลกอฮอลล์ในสหรัฐอเมริกาทำให้เกิดการขาดแคลน เอมิล แอลกอฮอลล์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการหมักแอลกอฮอลล์อย่างกะทันหัน ประโยชน์ของเอมิล แอลกอฮอลล์ใช้ในการผลิตเอมิลอะซิเตต ซึ่งเป็นตัวทำละลายในแลคเกอร์จึงจำเป็นต้องใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมจำนวนมาก จึงได้ทำการพัฒนาบิวทานอลมาแทนที่ซึ่งมีการเริ่มใช้ผลิตภัณฑ์ของ บิวทิล อะซิเตตผลต่อมาโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิต ABE ที่ปิดตัวลงจากการสงบสงครามก็กลับมาเปิดอีกครั้ง หลายประเทศใช้กระบวนการหมักในการผลิตบิวทานอลที่จำเป็นในอุตสาหกรรม ในปี 1950 ได้มีการสร้างโรงงานผลิตบิวทานอลขนาดใหญ่ที่สุดตั้งอยู่ในเมือง Peoria รัฐ Illinois ซึ่งมีถังหมักจำนวน 96 ถัง ขนาด 50,000 แกลลอนหรือ 189,000 ลิตร โดยใช้สารตั้งต้นเป็นสารที่ได้จากการย่อยลิกโนเซลลูโลสและจีนซึ่งใช้เทคโนโลยีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักแบบต่อเนื่องและมีขนาดเล็กกว่าแต่อยู่ได้ถึงปี 1980 โรงงานในอเมริกาใต้และโซเวียตและปี2004 โรงงานในประเทศจีนก็ต้องปิดตัวลง สาเหตุการลดลงของกระบวนการหมักเอทานอลเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของราคาสารตั้งต้นกากน้ำตาลและราคาบิวทานอลที่ได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบมีราคาที่ถูกกว่า ได้มีการดำเนินการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์บิวทานอลผ่านกระบวนการทางชีวภาพอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งกลางปี 1990 จนเมื่อไม่นานมานี้ ABE ที่ได้จากน้ำมันดิบมีราคาเพิ่มสูงขึ้นอย่างฉับพลัน (Cheng, 2009)

2.1.3 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิง

ไบโอบิวทานอลเป็นบิวทานอลที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นและกระบวนการผลิตทางชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์ได้ในอนาคตอันใกล้ เนื่องจากคุณสมบัติบิวทานอลจัดเป็นสารที่มีมีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับก๊าซโซลีน (น้ำมันเบนซิน) บิวทานอลมีความเป็นขั้วต่ำกว่าจึงสามารถผสมกับก๊าซโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมเท่าใดก็ได้การใช้บิวทานอลไม่ต้องปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์มีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนก๊าซโซลีนพบว่าเครื่องยนต์เดินได้ตามปกติ โดยที่มีการใช้บิวทานอลสูงกว่าก๊าซโซลีน9 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่ารถยนต์ใช้บิวทานอลในปริมาณที่สูงกว่าก๊าซโซลีน แต่พบว่าการใช้ไบโอบิวทานอลมีการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ไฮโดรคาร์บอน และการปล่อยสารพิษลดลงมากซึ่งเป็นเรื่องสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมของโลก (ชนิกาและคณะ, 2555)

ข้อได้เปรียบของการใช้บิวทานอลมากกว่าเอทานอลคือ

1) การระเหย (Volatility) ต่ำกว่าจึงเป็นพิษน้อยกว่า (มีค่า Reid Vapor Pressure (RVP) ต่ำกว่า 7.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล)
2) บิวทานอลไม่ดูดซับความชื้น (จึงมีค่าHygroscopicityต่ำกว่า)
3) บิวทานอลมีค่าการกัดกร่อนต่ำกว่า
4) การใช้บิวทานอลปลอดภัยกว่าเอทานอลเนื่องจากมีค่าการติดไฟ (Flash Point) สูงกว่า (350องศาเซลเซียสและ 140 องศาเซลเซียสตามลำดับ) และมีค่าแรงดันเป็นไอต่ำกว่า
5) มีค่าออกเทนสูงกว่า
6) บิวทานอลมีค่าพลังงานสูงกว่าเอทานอลโดยบิวทานอลมีค่า 110,000 BTU ต่อแกลลอน ในขณะที่เอทานอลมีค่า 84,000 BTU ต่อแกลลอน
7) สามารถผสมรวมกับทั้งก๊าซโซลีนและดีเซลได้สมบูรณ์

ดังนั้นจึงทำให้การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงมีความปลอดภัยรวมทั้งอุปกรณ์การเก็บและการเติมบิวทานอลยังสามารถใช้อุปกรณ์ที่ใช้ในสถานีเติมน้ำมันและรถยนต์โดยไม่ต้องปรับเปลี่ยนใดๆเลย ในขณะที่การผสมเอทานอลให้อยู่ในระบบต้องจำกัดให้อยู่ในช่วงเวลาสั้นๆจึงเหมาะสมทั้งบิวทานอลยังไม่กระทบต่อระบบการเก็บและการเติมของเชื้อเพลิงเหลวเหล่านี้การที่ค่าแรงดันการเป็นไอ (Vapor Pressure) ของบิวทานอลมีค่าเท่ากับ 4 มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียสซึ่งมีค่าต่ำกว่าเอทานอล 11 เท่าซึ่งมีค่าเป็น 45 มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียสจึงทำให้สามารถเติมโดยตรงกับก๊าซโซลีนโดยไม่มีการสูญเสียจากการระเหยจึงไม่มีผลกระทบอื่นข้างเคียงและจากคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของบิวทานอลทำให้สะดวกต่อการผสมกับก๊าซโซลีนโดยไม่มีการแยกชั้นขึ้นในที่มีน้ำอยู่ด้วยก็ตาม (เนื่องจากมีการปนของน้ำโดยตรงน้อยมาก) แต่มีค่าออกเทนใกล้เคียงกับก๊าซโซลีนซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเติมสารเพิ่มค่าออกเทนได้เมื่อเปรียบเทียบการผสมเชื้อเพลิงชีวภาพอื่นๆกับก๊าซโซลีน ดังตารางที่ 2.1(ชนิกาและคณะ,2555)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของบิวทานอลและแก๊สโซลีน

คุณสมบัติ	บิวทานอล	แก๊สโซลีน
ความหนาแน่นพลังงาน (Energy Density, MJ/L)	29.2	32
อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำ มันและอากาศ (Air-fuel Ratio)	11.2	14.6
ความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอ(HeatofVaporization, MJ/kg)	0.43	0.36
ปริมาณพลังงาน (Energy Content/Value, BTU/gal)	110,000	150,000
ความสามารถในการละลายน้ำ 100 กรัม (Solubility)	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย
ค่าออกเทนโดยวิธีวิจัย (Research Octane Number, RON)	96	91-99
ค่าออกเทนโดยวิธีมอเตอร์ (Motor Octane Number, MON)	78	81-89

ที่มา:ชนิกาและคณะ (2555)

2.1.4 การใช้บิวทานอลในระดับอุตสาหกรรม

บิวทานอลมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีมากมาย บิวทานอลส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ (Ester Derivative) เช่น บิวทิลอะครีเลท (Butyl Acrylate) ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมี เป็นสารเคลือบผิว และเป็นสารผสมในสีนอกจากนี้บิวทานอลยังเป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเป็นตัวทำละลายสำหรับสารเคลือบไม้และวัสดุต่างๆ ในอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ (Acid Curable Lacquers และ Baking Finish) การใช้ประโยชน์จากบิวทานอลและสารประกอบอื่นๆ คือ เป็นทินเนอร์สำหรับผสมสี (Paint Thinner) เป็นตัวทำละลายในสี (Solvent for Dyes) เช่น หมึกพิมพ์ และเป็นสารสกัดในกระบวนการผลิตยาและสารธรรมชาติ เช่น ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ฮอร์โมน (Hormones) และวิตามิน (Vitamins) เป็นต้นนอกจากนี้ยังมีการใช้บิวทานอลในประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น กระจกนิรภัย (Safety Glass) สารทำความสะอาด (Detergents) อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่นสารตกแต่งตา (Eye Makeup) ยาทาเล็บ สารในผลิตภัณฑ์การโกนหนวด ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพ นอกจากนี้เป็นสารสำหรับการสกัด และอุตสาหกรรมอาหารและกลิ่น (Cheng, 2009)

2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของ *Clostridium*

แบคทีเรียคลาส Clostridia ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 อันดับและ 11 วงศ์ สกุล *Clostridium* เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดแบคทีเรียสกุล*Clostridium*เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน สร้างสปอร์รูปร่างป้อมแบบรูปไข่ ทรงกลม ดังรูปที่ 2.2 เคลื่อนที่โดยใช้ peritrichous flagella ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph บางชนิดเป็นพวกย่อยโปรตีน ย่อยแป้ง หรือบางชนิดอาจเป็นทั้งสอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างหรือไม่เป็นเลย สามารถหมักน้ำตาลต่างๆ โพลีแอลกอฮอลล์ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และสารอินทรีย์อื่นๆ ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจนอย่างแท้จริง (ดวงพร, 2537)บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและ ไซโตโครม ออกซิเดส ทำให้ไม่สามารถใช้ออกซิเจนรับอิเล็กตรอนในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน หรือขาดเอนไซม์ ซุปเปอร์ออก-ไซด์ดิสมิวเทสเกิดการสะสมของซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเปอร์ออกไซด์แอนไอออนในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน การเลี้ยงเชื้อจึงจำเป็นต้องทำในสภาวะไม่มีออกซิเจน หรือเพาะเชื้อใน anaerobic incubator หรือ anaerobic jar ซึ่งมีกรรมวิธีในการนำออกซิเจนออก (นันทนา, 2538)

อนุกรมวิธานของเชื้อ*Clostridium* spp.

Kingdom : Bacteria

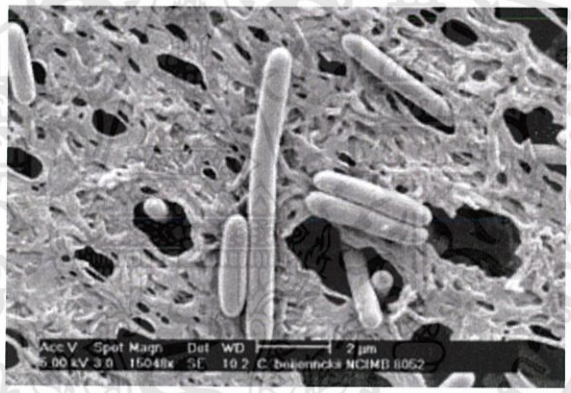
Division : Firmicutes

Class : Clostridia

Order : Clostridiale

Family : Clostridiaceae

Genus : *Clostridium*



รูปที่ 2.2 ลักษณะรูปร่าง *Clostridium* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด
ที่มา : http://genome.jgi.doe.gov/clobe/clobe.home.html (วันที่สืบค้น 9 ธันวาคม 2558)

คลอสทริเดียม (*Clostridium* spp.) เช่น *C. acetobutylicum, C. beijirinckii, C. saccharobutylacetonicum* และ *C. saccharobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลในภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe) ซึ่งส่งผลดีต่อกระบวนการหมักโดยลดต้นทุนในการใช้ใบพัดเพื่อให้อากาศเนื่องจากปกติแล้วราคาใบพัดในถังหมักจะเป็นครึ่งหนึ่งของราคาถังหมัก แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติเช่นดินน้ำของเสียในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลสแป้งและน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอลล์โดยเฉพาะบิวทานอล การคัดเลือกและคัดแยกสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตบิวทานอลจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp. พบว่านอกจากบิวทานอลแล้วแบคทีเรียยังมีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายอื่นคืออะซิโตนและเอทานอลเกิดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมบิวทานอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ ที่มีมูลค่าและนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆกระบวนการหมัก ABE ในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอลและอะซิโตนแต่ถ้าสภาวะที่ไม่เหมาะสมแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตอะซิโตนและเอทานอลเป็นผลผลิตหลัก (Qureshi, 2001; Lee

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ, 2008) สำหรับกระบวนการทางชีวภาพแล้วการหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเหลวเป็นหนึ่งในงานวิจัยที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะทางแถบยุโรปซึ่งมีการทำงานสะสมองค์ความรู้ทางด้านนี้มานานแล้วกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและเชื้อเพลิงเหลวเป็นที่รู้จักกันดีในชื่อของ ABE Fermentation ซึ่งมีมาตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 เนื่องจากความจำเป็นในการใช้ตัวทำละลายเหล่านี้เพื่อผลิตอาวุธส่งผลให้มีการเปิดโรงงานหมักอะซิโตนขึ้น โดยแบคทีเรียสกุลที่นำมาใช้เพื่อผลิต คือ *Clostridium* (ชนิกาและคณะ, 2555)

2.2.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Clostridium* spp.

โคโลนีมีลักษณะกลมนูน มันวาว ขุ่น ผิวไม่เรียบ สีขาวนวลขนาดโคโลนีค่อนข้างใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 2.3 (นันทนาและคณะ, 2538)

รูปที่ 2.3ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Clostridium* spp.

ที่มา : http://www.public-domain-image.com/free-images/science/microscopy-images/botulism-clostridium-botulinum/clostridium-botulinum-type-e-colonies-displaying-an-opaque-zone-grown-on-a-48hr-egg-yolk-agar-plate-mag-19x/attachment/clostridium-botulinum-type-e-colonies-displaying-an-opaque-zone-grown-on-a-48hr-egg-yolk-agar-plate-mag-19x (วันที่สืบค้น 19 ธ.ค. 58)

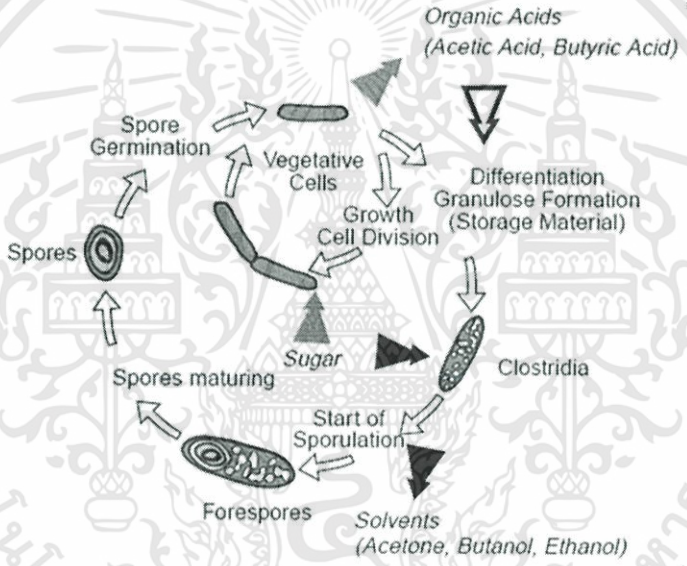
2.2.3 ปัจจัยในการเจริญ

Clostridium เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) เติบโตได้ดีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม mesophile ช่วงอุณหภูมิการเติบโตอยู่ระหว่าง 20-50 องศาเซลเซียส มี generation time ในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 45 องศาเซลเซียส เพียง 7 นาที การทนความร้อนของสปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) ค่อนข้างสูง และแตกต่างกันมากขึ้นกับสภาวะแวดล้อม ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อชนิดนี้อยู่ระหว่าง 5-8.5 วอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity, aw) ที่เหมาะสมกับการเจริญค่อนข้างสูง คือมากกว่า 0.95 ไม่เจริญในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 วงจรชีวิตและการเจริญ

แบคทีเรีย *Clostridium* สามารถแบ่งการเจริญได้ 4 รูปแบบ ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 2.4 ได้แก่รูปแบบที่ 1 การเจริญในสภาวะปกติ (Vegetative cell) จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อน (Rods-shaped) ซึ่งอาจจะพบในลักษณะที่เป็นเซลล์เดียว (Single cell) หรืออยู่กันเป็นคู่ (Pair) ตลอดจนอยู่เรียงกัน เป็นสายโซ่ยาวก็ได้รูปแบบที่ 2 รูปร่างแบบคลอสติเดีย (Clostridia) เซลล์จะมีลักษณะคล้ายกระบอกยาสูบ (Cigar-shape) การเจริญในขั้นนี้เซลล์จะมีการสร้างสารพวก Granulose สะสมภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการพองขึ้นรูปแบบที่ 3 Forespresจะเกิดขึ้นในกรณีที่สภาวะแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตส่งผลให้เซลล์เริ่มมีการสร้างForespresและจะถูกพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไปรูปแบบที่ 4 รูปแบบสปอร์ (Spore) เป็นขั้นที่เซลล์สร้างโครงสร้างที่เรียกว่าสปอร์เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Schuster และคณะ,1998)



รูปที่ 2.4 ระยะการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium*
ที่มา :สุนทร (2555) (วันที่สืบค้น 9 ธันวาคม 2558)

2.3 การจัดจำแนกเชื้อ *Clostridium* spp.

แบคทีเรียสกุล *Clostridium* มีแกรมบวกรูปร่างเป็นแท่ง ประกอบด้วยสมาชิกมากมายหลายชนิดสำหรับแบคทีเรียที่เป็น moderately obligate anaerobes บางชนิดสามารถเจริญได้ที่ที่มีอากาศบ้างสมาชิกของ *Clostridium* จะสร้างสปอร์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ สำหรับกลุ่มที่เป็น aerotolerant ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ catalase สำหรับสปอร์ของ *Clostridium*บางครั้งจะบวมมีหนาม บางครั้งลักษณะเหมือนไม้ตีกลอง ไม้เทนนิส บางชนิดสปอร์อยู่กลางเซลล์ (central) บางชนิดอยู่ปลายเซลล์ (terminal) หรือบางชนิดสปอร์อยู่ค่อนไปทางปลายเซลล์ (subterminal) นอกจากนี้แอนแอโรปส์ (ยกเว้น aerotplerant) ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลสและไซโตโคมออกซิเดสทำให้ไม่สามารถใช้ออกซิเจนในการรับอิเล็กตรอนในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน หรือขาดเอนไซม์ ซุบเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสทำให้มีการสะสมของ ซุปเปอร์ออกไวด์แอนไอออนเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาวะที่มีการหายใจแบบใช้ออกซิเจน การเพาะเชื้อจึงจำเป็นต้องทำในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาพบรรยากาศที่มีค่าศักยภาพการเกิดออกซิเดชัน รีดักชัน (oxidation reduction potential, Eh)ต่ำ เช่น thioglycerate medium, cooked meat medium หรือเพาะเชื้อใน anaerobic incubator หรือ anaerobic jar ที่มีกรรมวิธีในการเอาออกซิเจนออก ถึงแม้ Clostridia จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ Clostridia ที่มักพบจากการย้อมแกรมในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ติดสีแดง เช่น *C. ramosum* และ *C. clostridiiforme* ในบางครั้งการสร้างสปอร์ไม่สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียบางชนิดได้ เช่น *C. perfringens, C. ramosum*และ *C. clostridiiforme* ต้องใช้คุณสมบัติอื่นๆในการจัดจำแนกทั้งสามสกุลนี้ ซึ่งที่จริงแล้วการย้อมสีแกรมและวิธีการย้อมสปอร์ก็เพียงพอในการจำแนกชนิดของ Clostridia ได้ อย่างไรก็ตามการทำ wet mount และดูภายใต้ phase contrast microscope มีประโยชน์ก็ต่อเมื่อสปอร์แก่และแตกออกแล้ว วิธีที่ดีที่สุดในการดูความสามารถในการสร้างสปอร์ทำได้โดยการเพาะเชื้อทดสอบลงใน cooked-meet agar บ่มในบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียมาย้อมสีแกรมหรือทำ wet mount และดูด้วย phase contrast microscope จะทำให้สามารถจำแนกลักษณะรูปร่างของสปอร์และเซลล์ได้ (นันทนา, 2525)

ในการจัดจำแนกเชื้อสกุลนี้จะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยดูจากตำแหน่งของสปอร์และการย่อยเจลาติน บางชนิดใช้คุณสมบัติของสารพิษในการจัดจำแนก และมีอยู่ 5 ชนิดในสกุลนี้ที่ต้องการอาหารหรือสภาพในการเพาะเลี้ยงเฉพาะอย่าง จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกับสกุลอื่น จึงจัดไว้ในกลุ่มที่ 5

หลักในการจัดกลุ่มของสกุล *Clostridium* กลุ่มที่ปลายสปอร์อยู่ค่อนมาทางปลาย (subterminal) ก. ไม่ย่อยเจลาติน จัดเป็นกลุ่ม 1 มีอยู่ 11 ชนิด ข. ย่อยเจลาติน จัดเป็นกลุ่ม 2 มีอยู่ 20 ชนิด กลุ่มที่สปอร์อยู่ที่ปลายเซลล์ ก. ไม่ย่อยเจลาติน จัดเป็นกลุ่ม 3 มีอยู่ 19 ชนิด ข. ย่อยเจลาตินจัดเป็นกลุ่ม 4 มีอยู่ 6 ชนิดกลุ่มที่ต้องการสภาวะเฉพาะในการเจริญได้แก่ กลุ่มที่ 5 มีอยู่ 5 ชนิด (ดวงพร,2537)

2.4 การทดสอบทางชีวเคมีของ*Clostridium* spp.

การจัดจำแนกแบคทีเรียสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี การทดสอบทางพันธุกรรม ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน การใช้การทดสอบทางชีวเคมีเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและมีความแม่นยำมากกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจทำให้เกิดความไม่ถูกต้องเพราะแบคทีเรียมีความหลากหลายทางด้านรูปร่างส่งผลให้เกิดความสับสนและผิดพลาดในการจัดจำแนก โดยการทดสอบพื้นฐานทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* spp. สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้ (ศุภยางค์, 2547)

1.การทดสอบคะตาเลส(Catalase Test) เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้เอนไซม์คะตะเลสถ้าได้จะทำให้เกิดฟองก๊าซออกซิเจน ขึ้น ในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมงเพราะคะตะเลสจะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้นอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ในเชื้อที่มีอายุมาก

2.การทดสอบอินโดล(IndoleTest) เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล แบคทีเรียจะสร้างสารอินโดลจากกรดอะมิโนทริปโตเฟนในอาหารที่มีการเติมทริปโตเฟนถ้าสร้างอินโดลได้จะเกิดเป็นสีแดงที่ผิวชั้นบน ถ้าไม่สร้างจะไม่เกิดสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.การทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatinliquefaction Test) เป็นการทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาตินให้เหลว มีประโยชน์มากในการดูความแตกต่างของแบคทีเรียพวก anaerobe bacteria โดยเฉพาะ *Clostridium* แบคทีเรียที่ย่อยเจลาตินได้จะใช้เอนไซม์เจลลาติเนส ทำให้เจลาตินเสียคุณสมบัติในการเป็นเจล ซึ่งจะเป็นของเหลวถึงแม้อยู่ในอุณหภูมิต่ำ

4.การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction Test) เป็นการทดสอบการรีดิวซ์ไนตัส-ออกไซด์ไปเป็นแอมโมเนียการทดสอบโดยหยด sulfanilic acid และ α-napthylamine ถ้าเกิดตะกอนสีแดงคือให้ผลเป็นบวก

5.การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide Product Test) แบคทีเรียสามารถสร้าง H_2S จากสารอินทรีย์ที่อยู่ในเปปโตนหรือจากสารอินทรีย์ซัลเฟอร์ที่มีอยู่ในอาหาร การสร้าง H_2S แสดงว่าแบคทีเรียสามารถรีดิวซ์ซัลเฟอร์เป็นซัลไฟด์ได้

6. การทดสอบยูรีเอส (Urease) เป็นปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์ ยูเรียไปเป็นแอมโมเนียโดยใช้เอนไซม์ยูรีเอส แอมโมเนียที่เกิดขึ้นทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง จึงตรวจสอบโดยใช้ pH indicator ที่มีการเปลี่ยนแปลงของสีอยู่ในช่วง 6.8-8.1

7.การทดสอบการหมักน้ำตาล (Carbohydrate fermentationTest) เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้หรือไม่ และผลิตกรดอย่างเดียวหรือผลิตกรดและแก๊สหลังกระบวนการหมัก

8. การทดสอบเอนไซม์เลซิติเนส เป็นการทดสอบความสามารถการไฮโดรไลส์เลซิตินได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น diglycerideและphosphorylcholineก่อให้เกิดความขุ่นขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากไม่ละลายน้ำ

นอกจากคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นนี้ยังมีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอีกหลายประการเพื่อระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจน ดังตารางที่ 2.2

2.5 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก

ระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* spp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะได้แก่ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์รวมทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนทั้งนี้น้ำตาลในกลุ่ม Hexose (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกโดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุลพร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุลและ NADH $^{+}$ H^{+}จำนวน 2 โมเลกุลด้วยส่วนน้ำตาล Pentose (C5) จะถูก metabolized ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glycoceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป (สุนทร, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของ Clostridia

	การเจริญในอากาศ	ความไวต่อยาปฏิชีวนะ vibriostatic	ความไวต่อยาปฏิชีวนะ O/129	ความสามารถในการใช้ประโยชน์จากแหล่งไนโตรเจน	ความต้องการกรดอะมิโนหลายชนิด	การสร้างแอมโมเนียในอาหาร PYG	การผลิต isoacids ใน PYG	ความสามารถในการย่อยสลายยูเรีย	ความสามารถในการย่อยสลายเอสคูลิน	การหมักน้ำตาล						ปฏิกิริยาต่อนมลิตมัส	ความสามารถในการสร้างสปอร์	ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมัก PYG
										ไซโลส	แรฟฟิโนส	แป้ง	ซอร์บิทอล	แมนนิทอล	ซูโครส	กลูโคส		
C.bifermentans	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	W	V	-	-	-	-	ND	ND	ABL
C.sordellii	+	+	+	-	+	(+)	(+)	-	+	+	W+	V	-	-	-	-	ND	ND	A (p ib b iv ic l)
C.perfingenes	+	+	+	-	-	+	-	-	ND	-	+	+	+	-	-	+	-	ND	ND	A B L (p s)
C. novyi type A	+	+	+	+	-	+	-	-	ND	-	V	-	-	-	-	-	-	ND	OS	A P B
*C. sporogenes***	+	+	-	+	-	+	(+)	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	OS	A B ib iv (p v l s)
C.cadaveris	+	+	-	-	+	+	-	-	ND	-	-	V	-	-	-	-	-	-	OT	A b
C.septicum	+	+	-	-	-	+	-	-	ND	+	+	+	+	-	-	+	-	V	OS	A B (p)
C. difficile	+	+	-	-	-	+	+	-	ND	-	-	+	+	-	+	-	-	-	OS	A ib B iv ic (v)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) คุณสมบัติของ Clostridia

	การเคลื่อนที่	การสร้างสปอร์	ความไวต่อออกซิเจน	การสร้างอินโดล	การสร้างกรดไขมันระเหยง่ายใน PYG	การสร้างกรดไขมันสายกิ่งใน PYG	การสร้างกรดไขมันสายกิ่งจากไกลซีน	การสร้างกรดไขมันสายกิ่งจากวาลีน	การหมักน้ำตาล							ปฏิกิริยาต่อไนเตรท	ผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส	ผลิตภัณฑ์หมักจาก PYG
									ไซโลส	แมนโนส	แลคโตส	ซูโครส	มอลโตส	กลูโคส	อินนูลิน			
C. putrificum	+	+	-	-	-	+	+	-	ND	-	-	-[w]	-	-	-	-	ND	ND	A ib B iv (p v l s)
C. baratii	-	+	+	-	-	+	-	-	ND	+[w]	+[w]	+	+	-	+	-	V	ND	ND
C. tertium	-	+	-	-	-	+	-	+	ND	+	+	+	+	-	+	+[-]	+[-]	OT	A B L (s)
C. butylicum	-	+	-	-	-	+	-	-	ND	+	+	+	+	+[-]	+	+	-	OS	A B F (l s)
C.innoculum	-	+	-	-	-	+	-	-	ND	-	-	+	+	-	+	-[w]	-	OT	A B L (s)
C.ramosum	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	+	+	-	+	-[w]	-	R/ OT	A L (s)
C.clostridiiforme	-	+	-	-	-[+]	-	-	-	ND	+	+[w]	+	+[-]	V	+	+	+[-]	OS	A (l s)
C.tetani	+	-	-	-	V	+	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	RT	A B (l s)
C.hastiforme	+	-	-[+]	-	-	+	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	+[-]	S	A B iv ib (p ic)

ที่มา : ดวงพร (2537)

ปฏิกิริยา: - =ให้ผลลบ ; + = ให้ผลบวกสำหรับสายพันธุ์หลัก ; ประกอบด้วยการผลิตกรดอ่อนและกรดแก่จากคาร์โบไฮเดรตใน saccharolytic organism ; $+^{-}$ = สายพันธุ์ส่วนมากให้ผลบวกแต่ปฏิกิริยาช่วยให้เป็นผลบวก; $+^{w}$ = สายพันธุ์ให้ผลบวกแต่บางส่วนให้ผลบวกอ่อน; $-^{w}$ = สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลลบแต่มีบางส่วนให้ผลบวก; $-^{+}$ = สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลลบแต่ปฏิกิริยาช่วยให้เป็นผลลบ; W^{+} = สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลบวกอ่อนๆแต่มีบางส่วนให้ผลบวก; W^{-}= สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลบวกอ่อนๆแต่มีบางส่วนให้ผลลบ; V = ปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลง; ND = ยังไม่มีการทดสอบ

PRAS carbohydrates ; + = pH < 5.5 ; W = pH 5.5 - 5.7 ; - = pH > 5.7

รูปร่างสปอร์และตำแหน่ง: O = รี ; R = กลม ; S = ค่อนทางปลาย ; T = ปลาย

กรดไขมัน : A = อะซิติก ; P = โพรดิโนอิค ; IB = ไอโซบิวทิริค ; B = บิวทิริค ; IV = ไอโซวาเลริค ; V = วาเลริค ; IC = ไอโซคาร์โพรอิค,C = คาร์โพอิค, C' = คาร์ไพรลิค ; L = แลคติก ; S = ซัคซินิค ; PA = ฟีนีลอะซิติก

หมายเหตุ : (1)ตัวพิมพ์ใหญ่คือผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิคหลัก(2)ตัวพิมพ์เล็กคือผลิตภัณฑ์รอง (3)วงเล็บคือปฏิกิริยาต่างๆ (4)ไอโซแอซิดคือผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิจากอาหาร carbohydrate-free(เช่น PY) ในกรณีของ saccharolytic organism

**C. butulinum*หลายชนิดใน proteolytic, saccharolytic และปฏิกิริยาไลเปส ส่งไอโซเลที่คาดว่าหรือสงสัยว่าเป็น*C. butulinum*บรรจุในวัสดุส่งไปยังบริษัท

***C. butulinum* ชนิด A,B และ F มีลักษณะทางชีวเคมีคล้ายกับ *C. sporogenes*และเป็นเพียงสายพันธุ์เดียวที่มีสารพิษที่แตกต่างกัน

****C. clostridiiforme*เมื่อย้อมแกรมมักจะติดสีแกรมลบ

กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์และ Reduce feredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase ที่มีโคเอนไซม์เป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของทุกการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมักโดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริกโดยจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วยซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่ย้อนกลับไม่ได้ (Joneและ Woods, 1986) ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้นเพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในความเข้มข้นที่เป็นพิษและช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ด้วยซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD^+แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไปนอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมากสำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกันผ่าน 2 ปฏิกิริยาโดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ $NADH^+$ H^+ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD^+ด้วยดังรูปที่ 2.5 (สุนทร, 2555)

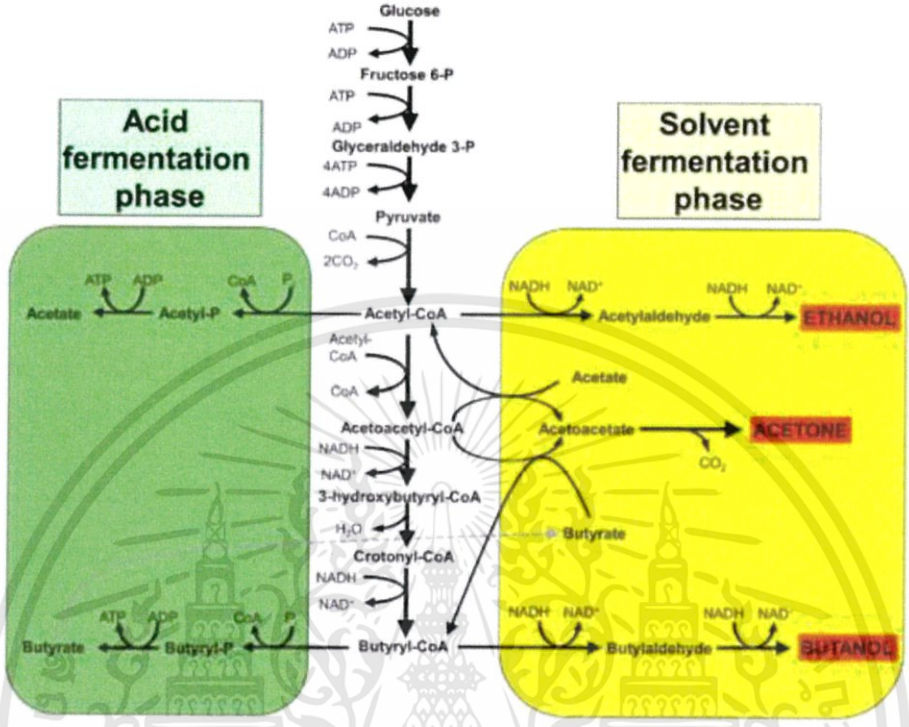
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของ Heaและคณะ (2013) ศึกษา *Clostridium*สายพันธุ์ G117 ที่แยกได้จากทุ่งหญ้าในประเทศสิงคโปร์สามารถผลิตบิวทานอลที่ความเข้มข้น 13.50 กรัมต่อลิตรเมื่อเติมกลูโคสลงในอาหาร 60 กรัมต่อลิตรซึ่งมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันถึง 20% สายพันธุ์ G117 สามารถผลิตเอทานอลได้เพียงเล็กน้อยแต่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ผลิตได้คือตัวทำละลายบิวทานอลและอะซิโตน ยีน butanolhydrogenase (bdh gene)ใช้เป็นตัวระบุสายพันธุ์ G117 ซึ่งพบว่าในการถอดรหัสโดยใช้วิธี Real-time PCR หลังจากทำการเพาะเลี้ยงนาน 10 ชั่วโมง พบว่า bdh gene เพิ่มขึ้น 200 เท่า โดยการถอดรหัสที่สูงขึ้นของ bdh gene อาจเป็นยีนที่เกี่ยวกับการผลิตบิวทานอล ใน *Clostridium* sp. สายพันธุ์ G117 มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลได้ดีในอุตสาหกรรม

Mohamedและคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาผลิตภัณฑ์อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลที่ได้จากผลอินทผาลัมที่ล้นตลาดและด้อยคุณภาพผลิตโดยสายพันธุ์ *Clostridium*ประเทศอียิปต์ โดยพบ *Clostridium*ที่อาศัยอยู่ในอุณหภูมิปานกลางจำนวน 170 ไอโซเลทแยกได้จากดินทางเกษตรกรรมที่ใช้เพาะปลูกพืชชนิดต่างๆในเมือง Assuit Governorate ประเทศอียิปต์มี 80 ไอโซเลทจาก107ไอโซเลทสามารถผลิตอะซิโตนบิวทานอลและเอทานอล(Acetone butanolและ Ethanol ,ABE) ได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร T6 ปริมาณระหว่าง 0.036-31.89 กรัมต่อลิตรไอโซเลทที่สามารถผลิต ABE ได้ในปริมาณสูงแยกได้จากดินที่ปลูกมันฝรั่งประมาณ 27ไอโซเลทตามด้วยดินที่ปลูกข้าวสาลีจำนวน 18ไอโซเลทและดินที่ปลูกหัวหอมจำนวน 10ไอโซเลทในทางตรงกันข้ามมี 3ไอโซเลทที่สามารถผลิต ABE ได้มากกว่าไอโซเลทอ้างอิง โดยอ้างอิงจาก *Clostridium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*acetobutylicum*ATCC 824 (11.543 กรัมต่อลิตร) โดยทั้ง 3ไอโซเลทสามารถทำการจำแนกสายพันธุ์ได้โดยลักษณะทางกายภาพ



รูปที่ 2.5 วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clodtridium*ในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)
ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Acetone%E293butanol%93ethanol_fermentation (วันที่สืบค้น 10 ธันวาคม 2558)

และ gene encoding 16S rRNAคือ*Clostridiumbeijerinkii*ASU10 (KF372577), *Clostridium chauvoei*ASU55 (KF372580) และ *Clostridiumroseum*ASU58 (KF372581) ผลิตภัณฑ์ ABE ปริมาณสูงสุดที่ได้จากผลอินทผาลัมที่ล้นตลาดและด้อยคุณภาพผลิตโดย *C. beijierinckii* ASU10 (24.07 กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วยบิวทานอล 67.15%(16.16กรัมต่อลิตร) อะซิโตน 30.73% (7.4 กรัมต่อลิตร) และเอทานอล2.12%(0.51 กรัมต่อลิตร) ขณะที่ *C.roseum*และ *C. chauvoei* สามารถผลิต ABE ได้ประมาณ 20.20 และ 13.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จาก *Clostridium acetobutylicum*ATCC 824ผลิตได้จำนวน 15.01 กรัมต่อลิตร การศึกษานี้สามารถพิสูจน์ว่าสายพันธุ์ *C. beijierinckii* ASU10 และ *C. roseum*ASU58 มีประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ ABE จากสารตั้งต้นที่มีราคาไม่แพงอย่างผลอินทผาลัมที่ล้นตลาดและด้อยคุณภาพ โดยสารตั้งต้นนี้ไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่นเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ ABE

ในการศึกษาของ Hamidและคณะ (2014) ทำการคัดแยกสายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum* และการหมักโดยใช้ของเสียการเกษตรการผลิตตัวทำละลายด้วย *Clostridium*ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกมาจากดินในนาข้าว เก็บจากพื้นที่ Ban 9 Parit 3 Sekinchan Selangor ในประเทศมาเลเซีย ซึ่งบ่มในอาหาร RCM ชนิดเหลวในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการย้ายเชื้อลงในวุ้น RCM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะรูปร่าง ทำการย้อมแกรม และดูการผลิตแก๊ส ในการศึกษาการผลิตอะซิโตนทำการทดสอบจากการเปลี่ยนสีของโคโลนีจากสีเหลืองไปเป็นสีม่วงโดยการเติมสารละลายโซเดียม ไนโตรเพรอสไซด์และสารละลายแอมโมเนียม และการผลิตไบโอบิวทานอลทดสอบจากการวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟ และจากการวิเคราะห์ 16S rRNA สามารถระบุสายพันธุ์ใกล้เคียงได้คือ *Clostridium acetobutylicum*สายพันธุ์ใหม่นี้คือ *Clostridium acetobutylicum* YM1 ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตสไซโลสอะราบิโนสกลีเซอรอลแลคโตสเซลโลไบโอสแมนนิทอลมอลโตสกาแลคโตส ซูโครส และ แมนโนส สายพันธุ์นี่สามารถใช้นำโพลีแซคคาไรด์ไปใช้ได้ เช่น แป้ง และ คาร์บอกซิเมททิล เซลลูโลส (CMC) สำหรับการผลิตไบโอบิวทานอล ความสามารถของ YM1 ในการผลิตไบโอบิวทานอลจากของเสียอุตสาหกรรมการเกษตรรวมถึง ข้าวเปลือก น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์มและ กากเมล็ดปาล์ม ความเข้มข้นสูงสุดของไบโอบิวทานอล คือ 7.27 กรัมต่อลิตร ได้จากการหมักที่ทำการเติมฟรุกโตส2% โดยปริมาตรและการผลิตABEความเข้มข้นที่ได้คือ10.23กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 จุลินทรีย์และวิธีการแยกเชื้อ

เชื้อ*Clostridium* spp. แยกได้จากดินบริเวณเขตลาดกระบัง โดยทำการขุดดินที่ความลึกประมาณ 30-50 เซนติเมตร โดยเป็นตัวอย่างดินจากบริเวณแปลงเกษตรคณะเกษตรศาสตร์ จำนวน 20 ตัวอย่าง คณะอุตสาหกรรมการเกษตร จำนวน 5 ตัวอย่าง คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ จำนวน 3 ตัวอย่าง คณะวิศวกรรมศาสตร์ จำนวน 5 ตัวอย่าง บริเวณหอพักนักศึกษาสถาบันฯ จำนวน 1 ตัวอย่าง บริเวณริมรางรถไฟ จำนวน 2 ตัวอย่าง บริเวณสนามกีฬา จำนวน 2 ตัวอย่างบริเวณอาคารเรียนรวมสมเด็จพระเทพฯ จำนวน 2 ตัวอย่าง บริเวณคณะเทคโนโลยีสารสนเทศ จำนวน 1 ตัวอย่าง บริเวณทุ่งนาข้างไปรษณีย์ลาดกระบังจำนวน 18 ตัวอย่างและวัดสุทธาโภชน์ จำนวน 6 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมีระยะห่างระหว่างหลุมแต่ละหลุมอย่างน้อย 5 เมตร รวมแล้วจำนวน 65 ตัวอย่างซึ่งจำนวนตัวอย่างในแต่ละพื้นที่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและลักษณะของดิน หรือใช้วิธีการถอนรากอ้อยและข้าวโพดขึ้นมาจากดินและเขย่าให้ดินที่ติดอยู่บริเวณรากเพื่อทำการเก็บตัวอย่างโดยตรงลงในถุงพลาสติก ไล่อากาศออกจากถุงพลาสติกที่บรรจุดินตัวอย่างเพื่อรอการนำไปถ่ายเชื้อ

3.1.2 สารเคมี

Glucose
Reinforced clostridial medium
Peptone
Beef extract
Yeast extract
Dextrose
Sodium chloride
Cystein HCl
Sodium acctate
Nutrient broth
Agar
Ethanol 70%
Ethanol 90%
Safranin
Crystal violet
Gram iodine
Malacyte green
Paraffin oil

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 อุปกรณ์

จอบ	เสียม
บีกเกอร์ ขนาด 500, 1000 มล.	ปิเปต ขนาด 1,5,10 มล.
หลอดทดลองฝาเกลียว	จุกยาง
ขวด Duran®	จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
ตะเกียงออลกอออล์	ถุงพลาสติก
หนังยาง	กระดาษชั่งสาร
เครื่องชั่ง	ลวดเขี่ยเชื้อ
กระบอกตวง	ขวดน้ำกลั่น
กล้องจุลทรรศน์	Anaerobic jar
แผ่นดูดออกซิเจน	โถดูดความชื้น
ตู้ anaerobic chamber	แท่งแก้วคนสาร
ซิลิการ์เจล	เครื่อง HPLC
เครื่องวัด pH	ตู้บ่มเชื้อ
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM,Oxoid®)

เป็นอาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อ*Clostridium* spp.มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	5	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Soluble starch	1	กรัม
Sodium acctate	3	กรัม
Glucose	5	กรัม
L-cystiene hydrochloride	0.5	กรัม
Agar	0.5	กรัม

ชั่งอาหาร Reinforced Clostridial 38 กรัมละลายในน้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตรผสมให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความเข้มข้น 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3.2.2 อาหาร T6 (ปรับปรุงจาก อาหาร TYA)(Ogata และคณะ,1973)

เป็นอาหารที่ใช้เก็บรักษาหัวเชื้อ *Clostridium* spp.มีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	6	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$MgSo_4.7H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัมต่อลิตร
Ammonium acetate	3	กรัมต่อลิตร
Cystein hydrochloride	0.5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	เปอร์เซ็นต์
Glucose	30	กรัมต่อลิตร

ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตรผสมให้เข้ากันปรับ pH เป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความเข้มข้น 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3.3 การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* ที่ผลิตตัวทำละลาย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Reinforced *Clostridia* (RCM,Oxoid) แล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีจากนั้นทำการถ่ายตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียวที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM 10 มิลลิลิตรและเททับด้วย paraffin oil ทำการheat shockใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นทันทีเพื่อทำการกำจัดแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ จากนั้นนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันเพื่อดูการเจริญของเชื้อ

นำตัวอย่างที่ได้ทำการถ่ายตัวอย่างอีกครั้งโดยถ่ายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตรลงไปยังอาหารเหลว RCM จำนวน 9 มิลลิลิตร เททับด้วย paraffin oilแล้วทำการ Heat shock โดยการย้ายหลอดไปยัง water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนานเวลา 10 นาที แล้วนำหลอดไปบ่มในincubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันเพื่อดูการเจริญของเชื้ออีกครั้งทำในขั้นตอนนี้อย่างน้อย 3 ซ้ำนำมาทดสอบการย้อมแกรมและย้อมสปอร์ (รายละเอียดในหัวข้อ3.4) เพื่อดูลักษณะทางสัณฐานของเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. จากนั้นนำไอโซเลทที่คาดว่าจะเป็น*Clostridium* spp. Streak ลงบนอาหารแข็งRCM เพื่อเป็นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารทำการย้อมแกรมและตรวจสอบเอนโดสปอร์เพื่อตรวจสอบหาเชื้อ *Clostridium*เบื้องต้นอีกครั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากนั้นเลือกโคโลนีที่ผ่านการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Clostridium*ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ได้ ทำการ Cross Steak Plate ในอาหารแข็ง RCM เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหาร T6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบการผลิตตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง HPLC ต่อไป

3.4 ลักษณะทางกายภาพและการสร้างสปอร์

3.4.1 การย้อมแกรม

นำตัวอย่างที่ผ่านการบ่มมา 7 วันทำการย้อมแกรมโดยเริ่มจากการล้างสไลด์ให้สะอาด จากนั้นนำเชื้อมาสเมียร์ลงบนสไลด์ รอจนแห้ง นำไสด์ไปผ่านไฟ 2-3 ครั้ง หยดคริสตัลไวโอเลต 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดแกรมไอโอดีน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ชะด้วยแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

95% ประมาณ 20 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น และหยดซาฟานิน1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น เช็ดสไลด์ให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่าเพื่อดูลักษณะของแบคทีเรียโดยตัวเซลล์จะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต

3.4.2 การย้อมสปอร์

ทำการตรวจสอบเอนโดสปอร์โดยล้างสไลด์ให้สะอาด สเมียร์เชื้อลงบนสไลด์ รอจนแห้ง นำไปผ่านไฟ 2-3 ครั้ง จากนั้น นำสไลด์ไปอังไอน้ำเดือด แล้วหยดสีย้อมมาลาไคท์กรีนให้ท่วมรอยสเมียร์ นาน 5 นาที เมื่อครบ 5 นาทีล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นจากนั้นหยดซาฟรานิน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น เช็ดสไลด์ให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อดูลักษณะของสปอร์โดยสปอร์จะติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีน และตัวเซลล์จะติดสีแดงของซาฟรานินเพื่อตรวจสอบหาเชื้อ *Clostridium* เบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยใช้เทคนิค Cross-steak plate ในอาหารแข็ง RCMเพื่อทำการคัดแยก *Clostridium*จากนั้นบ่มใน anaerobic jar หรือ desiccator พร้อมกับแผ่นดูดออกซิเจนเพื่อให้อยู่ในสภาวะไม่มีออกซิเจน บ่มเป็นเวลา7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.5 การผลิตและวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)โดยนำส่วนที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้สารละลายกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 2 สำหรับเป็น Internal standard ทำการกรองสารละลายด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของบิวทานอลอะซิโตน และเอทานอล ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex fermentation monitor ขนาด Particle size 9 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37องศาเซลเซียส ความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยวัดค่า Refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสงใช้ Run time 30 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้า แล้วจึงคำนวณหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าการวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ตรวจได้จากเครื่อง HPLC มาวิเคราะห์เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้วิธีวิเคราะห์ของ Duncan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การทดสอบทางชีวเคมี

3.7.1 การทดสอบการสร้างแก๊ส

นำไอโซเลตที่ผ่านการทดสอบการสร้างสารผลิตภัณฑ์แล้ว มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง T6 agar เป็นเวลา 7-14 วันในสภาวะไร้ออกซิเจน สังเกตการสร้างแก๊สและการดันอาหารวุ้นขึ้นมาของแก๊ส นำไอโซเลตที่สร้างแก๊สในอาหารแข็ง มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวT6(รายละเอียดในภาคผนวก จ)โดยใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนโดยใช้คุณสมบัติการติดไฟ ในขณะที่เปิดฝาหลอดทดลองให้วางใกล้ตะเกียงแอลกอฮอล์ สังเกตการติดไฟและเสียงที่เกิดขึ้น(สุธาทิพย์ และ นฤมล, 2554)

3.7.2 การทดสอบการหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส

นำเชื้อลงในอาหารที่ต้องการทดสอบประกอบด้วย broth base ผสมกับน้ำตาลเซลโลไบโอสและเติมฟีนอลเรดซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ (รายละเอียดในภาคผนวก จ)ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดูการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้ามีกรดจะให้ผลบวกทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าอาหารเป็นสีชมพูแดงจะให้ผลลบ (ศุภยางค์, 2547)

3.7.3 การทดสอบการหมักน้ำตาลไซโลส

นำเชื้อลงในอาหารที่ต้องการทดสอบประกอบด้วย broth base ผสมกับน้ำตาลไซโลสและเติมฟีนอลเรดซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์(รายละเอียดในภาคผนวก จ) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดูการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้ามีกรดจะให้ผลบวกทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าอาหารเป็นสีชมพูแดงจะให้ผลลบ (ศุภยางค์, 2547)

3.7.4 การทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโตส

นำเชื้อลงในอาหารที่ต้องการทดสอบประกอบด้วย broth base ผสมกับน้ำตาลมอลโตสและเติมฟีนอลเรดซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์(รายละเอียดในภาคผนวก จ) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดูการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้ามีกรดจะให้ผลบวกทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าอาหารเป็นสีชมพูแดงจะให้ผลลบ (ศุภยางค์, 2547)

3.7.5 การทดสอบการเคลื่อนที่

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Motility test medium(รายละเอียดในภาคผนวก จ)โดย stab ตรงๆ เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2/3 ของส่วนสูงของอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ผลบวก เห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอย stab หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอย stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิมผลลบ เห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจน ที่บริเวณรอย stab โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน แม้จะบ่มเชื้อต่ออีก 2 สัปดาห์ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (นันทนา, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.6 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยด 3% H_2O_2 สังเกตการเกิดของฟองอากาศ โดยต้องสังเกตผลทันที ถ้ามีการเกิดฟองแก๊สออกซิเจน แสดงว่าแบคทีเรียสร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ผลเป็นบวก ในการทดสอบต้องใช้เชื้อมีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์คะตะเลสจะมีอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น (ดวงพร, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อจากดิน

ทำการแยกและคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. โดยขุดลงไปในดินลึก 30-50 ซม. จากดินบริเวณแปลงเกษตรคณะเกษตรศาสตร์ จำนวน 20 ตัวอย่าง ดินบริเวณคณะอุตสาหกรรมการเกษตร คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ และคณะวิศวกรรมศาสตร์ จำนวน 14ตัวอย่าง ดินบริเวณหอพักนักศึกษา สถาบันฯ ริมรางรถไฟ สนามกีฬา อาคารเรียนรวมสมเด็จพระเทพฯ คณะเทคโนโลยีสารสนเทศ จำนวน 8 ตัวอย่างบริเวณทุ่งนาข้างไปรษณีย์ลาดกระบังและวัดสุทธาโภชน์ จำนวน 23ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมีระยะห่างระหว่างหลุมแต่ละหลุมอย่างน้อย 5 เมตร รวมแล้วจำนวน 65ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.1สามารถคัดแยกเชื้อได้ 96ไอโซเลทคาดว่าจะเป็นเชื้อ*Clostridium* spp. จำนวน 15ไอโซเลทในการศึกษานี้เกี่ยวข้องกับการคัดแยกสายพันธุ์ของ *Clostridium* spp.ที่สามารถผลิตสารละลายได้โดยแยกได้จากดินที่ใช้ในการเพาะปลูกMohamedและคณะ(2014) พบ *Clostridium* 107 ไอโซเลทแยกได้จากดิน 96 ตัวอย่างที่ใช้เพาะปลูกพืชในเมือง Assuit Governorate ประเทศอียิปต์ Najeebและคณะ(2016) ทำการแยกเชื้อ*Clostridium* จำนวน 28 ไอโซเลทจากดินในนาข้าวที่เมือง SelangorประเทศมาเลเซียMontoya และคณะ(2000) ได้บันทึกไว้ว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ 178 ไอโซเลทได้จากตัวอย่างดิน 155 ตัวอย่างในบริเวณเพาะปลูกประเทศโคลอมเบีย

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของดินจากแหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทที่แยกได้

ลำดับที่	รหัสสถานที่	ลักษะของดิน	จำนวนไอโซเลท
1	A1	ดินจากการถอนรากอ้อย	1
2	A2	ดินจากการถอนรากอ้อย	1
3	A3	ดินเหนียว แข็ง สีดำ	1
4	A4	ดินจากการถอนรากหญ้า	1
5	A5	ดินเหนียว แข็ง สีดำ	1
6	A6	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	2
7	A7	ดินร่วนปนทราย	2
8	A8	ดินเหนียวแตกแห้ง สีดำ	1
9	A9	ดินเหนียวแห้ง สีดำ	1
10	A10	ดินจากการถอนรากข้าวโพด	1
11	A11	โคลนสีดำ กลิ่นเหม็น	1
12	A12	โคลนสีดำ กลิ่นเหม็น	2
13	A13	ดินร่วน สีดำ	1
14	A14	ดินทรายแห้ง	1
15	A15	ดินเหนียวแห้ง แข็ง	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1(ต่อ)ลักษณะของดินจากแหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทที่แยกได้

ลำดับที่	รหัสสถานที่	ลักษะของดิน	จำนวนไอโซเลท
16	A16	ดินร่วนซุย สีดำ	1
17	A17	ดินจากการถอนรากข้าวโพด	2
18	A18	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	1
19	A19	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	2
20	A20	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	2
21	B1	ดินทรายแข็ง เม็ดละเอียดสีน้ำตาล	2
22	B2	ดินทรายแข็ง เม็ดละเอียดสีน้ำตาล	2
23	B3	ดินเหนียว สีดำ ชื้น	1
24	B4	ดินเหนียว สีน้ำตาล แข็ง	2
25	B5	โคลนจากบ่อน้ำ สีดำ กลิ่นเหม็น	2
26	C1	ดินเหนียวแข็ง สีน้ำตาล	1
27	C2	ดินทราย แข็ง สีน้ำตาล	1
28	C3	ดินทราย แข็ง สีน้ำตาล	3
29	D1	ดินที่ถอนจากรากอ้อย	1
30	D2	ดินที่ถอนจากรากข้าวโพด	3
31	D3	ดินร่วน สีดำ ชื้น	2
32	D4	ดินเหนียว แข็ง สีดำ	2
33	D5	ดินเหนียว แข็งสีดำ	1
34	E1	ดินร่วน สีดำ ชื้น	1
35	F1	ดินทราย สีน้ำตาล แข็ง	1
36	F2	ดินทราย สีน้ำตาล แข็ง	2
37	G1	โคลนใต้ท่อระบายน้ำ สีดำ กลิ่นเหม็น	1
38	G2	ดินทราย สีน้ำตาล เนื้อแข็ง	2
39	H1	ดินในท่อระบายน้ำ สีดำ กลิ่นเหม็น	2
40	H2	ดินทรายสีน้ำตาล เนื้อแข็ง	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1(ต่อ)ลักษณะของดินจากแหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทที่แยกได้

ลำดับที่	รหัส	ลักษณะของดิน	จำนวนไอโซเลท
41	I1	ดินใต้น้ำในบ่อกก สีดำ	2
42	J1	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	2
44	J3	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	1
45	J4	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	2
46	J5	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	1
47	J6	ดินเหนียวแฉะ เปียกชื้น สีดำ	1
48	J7	โคลนสีดำ เปียกชื้น	1
49	J8	ดินจากรากข้าว	2
50	J9	ดินจากรากข้าว	1
51	J10	ดินจากรากข้าว	1
52	J11	ดินจากรากข้าว	1
53	J12	ดินทรายสีน้ำตาล เนื้อแข็ง	2
54	J13	ดินทรายปนเหนียว แข็ง สีดำ	1
55	J14	ดินทรายปนเหนียว แข็ง สีดำ	2
56	J15	ดินทรายปนเหนียว แข็ง สีดำ	1
57	J16	ดินทรายปนเหนียว แข็ง สีดำ	1
58	J17	โคลนสีดำ เปียกชื้น	1
59	J18	โคลนสีดำ เปียกชื้น	1
60	K1	ดินที่ผ่านการเผากลบ หน้าดิน แห้ง แข็ง	1
61	K2	ดินที่ผ่านการเผากลบ หน้าดิน แห้ง แข็ง	2
62	K3	ดินที่ผ่านการเผากลบ หน้าดิน แห้ง แข็ง	1
63	K4	ดินที่ผ่านการเผากลบ หน้าดิน แห้ง แข็ง	1
64	K5	โคลนตม สีดำ กลิ่นเหม็น	1
65	K6	โคลนตม สีดำ กลิ่นเหม็น	1

หมายเหตุ: A = แปลงเกษตรคณะเกษตรศาสตร์,B =คณะอุตสาหกรรมการเกษตร,C =คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์,D = คณะวิศวกรรมศาสตร์,E = บริเวณหอพักนักศึกษาสถาบันฯ,F = รางรถไฟ, G = สนามกีฬา,H = อาคารเรียนรวมสมเด็จพระเทพฯ,I = คณะเทคโนโลยีสารสนเทศ,J = ทุ่งนาข้างไปรษณีย์ลาดกระบัง ,K = วัดสุทธาโภชน์,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 65ตัวอย่าง ได้ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการดูลักษณะโคโลนี ย้อมแกรม ย้อมสปอร์ศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเทียบคุณลักษณะทางชีวเคมี กับเอกสารอ้างอิงของ Prescott, 1993 ซึ่งกล่าวว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Clostridium* spp. มีลักษณะกลมนูน มันวาว ขุ่น ผิวไม่เรียบ สีขาวนวลขนาดโคโลนีค่อนข้างใหญ่ เมื่อทดสอบการติดสีพบว่าติดสีม่วงเป็นแกรมบวก รูปร่างท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาสามารถระบุได้เบื้องต้นซึ่งคาดว่าจะเป็นแบคทีเรีย*Clostridium* spp. 15ไอโซเลทจากแบคทีเรียทั้งหมด 96ไอโซเลทแสดงในตารางที่4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	การติดสีสปอร์	รูปร่าง
1	A1a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	+	-	coccus
2	A2a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
3	A3a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
4	A4a	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	-	+	rod
5	A5a	แผ่ สีขาวขุ่น ผิวหน้าหยาบ ขอบหยัก	+	-	rod
6	A6a	กลม นูน มันวาว สีชมพู ขอบเรียบ	-	-	coccus
7	A6b	รูปเข็ม สีขาว ขอบเรียบ ขึ้นใต้วุ้น	+	-	coccus
8	A6c	กลม นูน มันวาว สีชมพู ขอบเรียบ	-	-	coccus
9	A7a	แผ่ สีขาวขุ่น ผิวหน้าหยาบ ขอบหยัก	+	-	rod
10	A7b	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	coccus
11	A8a	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	staphylococcus
12	A9a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
13	A10a	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	rod
14	A11a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
15	A11b	กลม นูน สีขาว มันวาว	+	-	rod
16	A12a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2(ต่อ)ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	การติดสีสปอร์	รูปร่าง
17	A12b	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	coccus
18	A13a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
19	A14a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
20	A15a	แผ่ สีขาวขุ่น ผิวหน้าหยาบ ขอบหยัก	+	-	rod
21	A15b	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	-	rod
22	A16a	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	coccus
23	A17a	รูปเข็ม สีขาว ขอบเรียบ ขึ้นใต้วุ้น	+	-	coccus
24	A17b	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	coccus
25	A18a	แผ่ สีขาวขุ่น ผิวหน้าหยาบ ขอบหยัก	+	-	rod
26	A19a	รูปเข็ม สีขาว ขอบเรียบ ขึ้นใต้วุ้น	+	-	coccus
27	A19b	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
28	A20a	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	+	staphylococcus
29	A20b	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
30	B1a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
31	B1b	กลม นูน สีขาว มันวาว ขอบเรียบ	-	+	rod
32	B2a	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	-	+	rod
33	B2b	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	streptococcus
34	B3a	แผ่ สีขาวขุ่น ผิวหน้าหยาบ ขอบหยัก	+	-	rod
35	B4a	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	rod
36	B4b	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
37	B5a	กลม นูน สีขาว มันวาว ขอบเรียบ	-	+	rod
38	B5b	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	-	-	rod

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2(ต่อ)ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	การติดสีสปอร์	รูปร่าง
39	C1a	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	-	-	streptococcus
40	C2a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	+	rod
41	C2b	รูปเข็ม สีขาว ขอบเรียบ ขึ้นใต้วุ้น	+	-	coccus
42	C3a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
43	C3b	กลม นูน สีขาว มันวาว ขอบเรียบ	-	-	rod
44	C3c	แผ่เป็นวงกว้าง สีขาวเหลือง	-	-	rod
45	D1a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
46	D2a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
47	D2b	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	streptococcus
48	D2c	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	streptococcus
49	D3a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบเรียบ	-	-	rod
50	D3b	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
51	D4a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบเรียบ	+	+	rod
52	D4b	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	coccus
53	D5a	กลม สีขาว ขอบเรียบ ขึ้นใต้วุ้น	+	-	coccus
54	E1a	รูปเข็ม สีขาว ขอบเรียบ ขึ้นใต้วุ้น	+	+	coccus
55	F1a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
56	F2a	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	rod
57	F2b	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	rod
58	G1a	แผ่กระจาย สีเหลือง ขอบหยัก	-	-	rod
59	G2a	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	staphyloccus
60	G2b	แผ่เป็นวงกว้าง สีขาวเหลือง	-	-	rod

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2(ต่อ)ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	การติดสีสปอร์	รูปร่าง
61	H1a	แผ่กระจาย สีเหลือง แบน ขอบหยัก	+	+	rod
62	H1b	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	Rod
63	H2a	แผ่กระจาย สีเหลือง แบน ขอบหยัก	+	+	rod
64	I1a	แผ่กระจาย สีเหลือง ขอบหยัก	-	-	rod
65	I1b	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	coccus
66	J1a	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	rod
67	J1b	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	staphylococcus
68	J2a	แผ่ สีขาวขุ่น ผิวหน้าหยาบ ขอบหยัก	+	-	rod
69	J3a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
70	J4a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
71	J4b	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	streptococcus
72	J5a	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	-	-	rod
73	J6a	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	-	-	rod
74	J7a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
75	J8a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
76	J8b	แผ่เป็นวงกว้าง สีขาวเหลือง	-	-	rod
77	J9a	แผ่กระจาย สีเหลือง ขอบหยัก	-	-	rod
78	J10a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
79	J11a	แผ่กระจาย สีเหลือง ขอบหยัก	-	-	rod
80	J12a	รูปเข็ม สีขาว ขอบเรียบ ขึ้นใต้วุ้น	-	-	coccus
81	J12b	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ	-	-	coccus
82	J13a	แผ่เป็นวงกว้าง สีขาวเหลือง	-	-	rod

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2(ต่อ)ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	การติดสีสปอร์	รูปร่าง
83	J14a	กลม นูน สีเหลืองนวล ขอบหยัก	+	+	rod
84	J14b	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
85	J15a	กลม นูน สีขาว มันวาว ขอบเรียบ	-	+	rod
86	J16a	กลม แบน สีขาว ขอบหยัก	-	+	rod
87	J17a	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ	+	-	streptococcus
88	J17b	กลม สีขาวขุ่น ผิวหน้าหยาบ	+	-	rod
89	J18a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	rod
90	K1a	กลม นูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก	+	-	coccus
91	K2a	กลม นูน สีขาว มันวาว ขอบเรียบ	-	+	rod
92	K2b	กลม แบน สีขาว ขอบหยัก	-	+	coccus
93	K3a	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ	+	-	streptococcus
94	K4a	กลม สีขาวขุ่น ผิวหน้าหยาบ ขอบหยัก	+	-	rod
95	K5a	แผ่กระจาย สีเหลือง แบน ขอบหยัก	-	-	rod
96	K6a	แผ่กระจาย สีเหลือง แบน ขอบหยัก	-	+	rod

หมายเหตุ: a = ไอโซเลทที่1, b = ไอโซเลทที่2, c = ไอโซเลทที่3
การติดสีแกรม + = แกรมบวก, - = แกรมลบ
การติดสีสปอร์ + = พบสปอร์, - = ไม่พบสปอร์

4.3 ผลการผลิตและวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

นำไอโซเลทที่คาดว่าเป็น *Clostridium* spp. ที่ได้จากการบ่มในอาหาร T6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมดโดยใช้เครื่องHPLC เมื่อทำการคำนวณหาความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล พบว่าเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostrdium*spp. ที่ทำการคัดแยกทั้งหมด 15 ไอโซเลท สามารถผลิต ABE ได้ 10 ไอโซเลท ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ ABE ทั้งหมดอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วง 0.070 และ 1.770 กรัมต่อลิตรขณะที่อีก 5 ไอโซเลทคือ A2a A3a A11a 12a A14a ที่เลี้ยงในอาหาร T6 ไม่มีความสามารถในการผลิต ABEซึ่งให้ผลที่คล้ายกับการศึกษาของ Mohamed และคณะ (2014) พบว่า*Clostridium* 80 ไอโซเลทจาก 107 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิต ABE ในช่วงระหว่าง 0.036 และ 31.89 กรัมต่อลิตร ขณะที่อีก 27 ไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหาร T6 ไม่มีความสามารถในการผลิต ABE

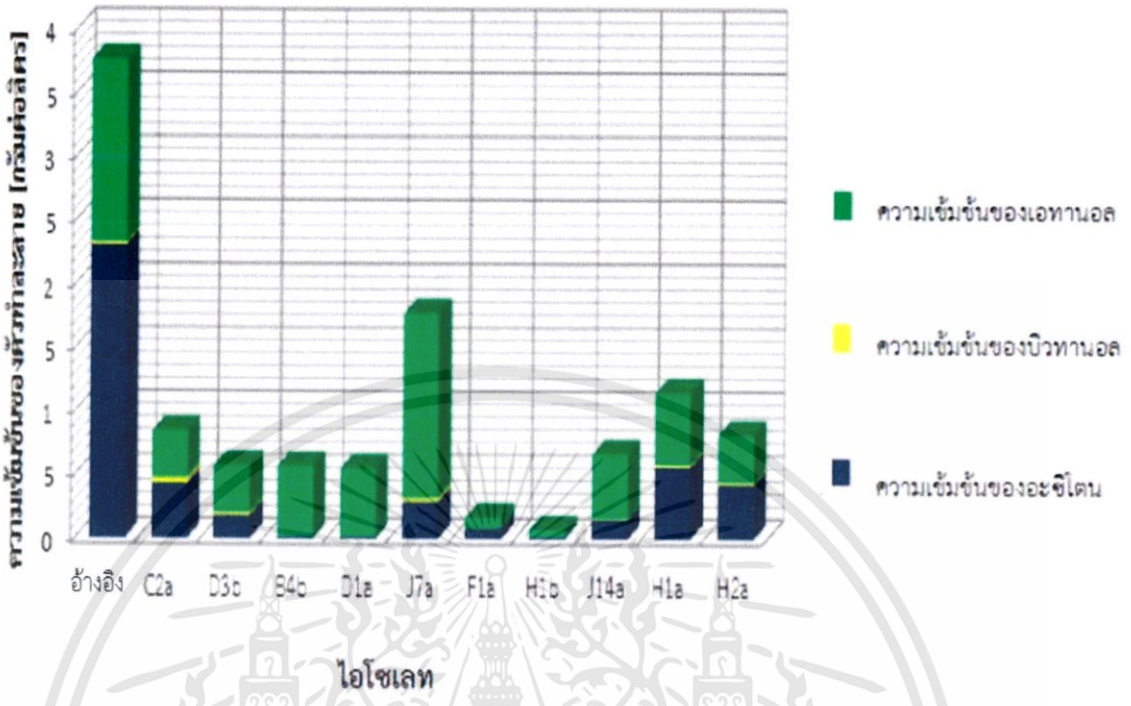
เชื้อรหัส H1a มีความสามารถในการผลิตอะซิโตนได้สูงที่สุดซึ่งเป็นไอโซเลทที่ได้จากตัวอย่างดินบริเวณอาคารเรียนรวมสมเด็จพระเทพฯ เชื้อรหัส C2a มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดซึ่งเป็นไอโซเลทที่ได้จากตัวอย่างดินบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ เชื้อรหัส J7a มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดและยังสมารถผลิต ABE รวมได้สูงที่สุดซึ่งเป็นไอโซเลทที่ได้จากตัวอย่างดินบริเวณทุ่งนาข้างไปรษณีย์ลาดกระบัง ดังแสดงผลในตาราง 4.3

ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธี Duncan เพื่อหาค่าความแปรปรวนของข้อมูล พบว่าเอทานอลและบิวทานอลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอะซิโตนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นรวมของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และความเข้มข้นรวมตัวทำละลายในหน่วยกรัมต่อลิตร ที่วิเคราะห์ได้จากเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostrodium* spp. โดยมี *Clostrodium acetobutylicum* DSM 792 เป็นเชื้ออ้างอิง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของอะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น ABEรวม (กรัมต่อลิตร)
อ้างอิง	2.304^{b} ±0.776	0.021^{a} ±0.002	1.435^{a} ±2.424	3.760^{b} ±3.195
C2a	0.433^{a} ±0.750	0.046^{a} ±0.080	0.363^{a} ±0.516	0.842^{a} ±1.345
D3b	0.182^{a} ±0.247	0.021^{a} ±0.037	0.370^{a} ±0.473	0.573^{a} ±0.756
B4b	0.016^{a} ±0.027	0	0.553^{a} ±0.853	0.569^{a} ±0.880
D1a	0.013^{a} ±0.023	0	0.539^{a} ±0.840	0.551^{a} ±0.829
J7a	0.289^{a} ±0.500	0.036^{a} ±0.062	1.446^{a} ±0.475	1.770^{a} ±0.401
F1a	0.079^{a} ±0.085	0	0.089^{a} ±0.048	0.167^{a} ±0.088
H1b	0.017^{a} ±0.029	0	0.053^{a} ±0.020	0.070^{a} ±0.041
J14a	0.153^{a} ±0.230	0.010^{a} ±0.017	0.503^{a} ±0.412	0.666^{a} ±0.572
H1a	0.564^{a} ±0.236	0.020^{a} ±0.005	0.560^{a} ±0.075	1.144^{a} ±0.288
H2a	0.427^{a} ±0.522	0.017^{a} ±0.003	0.372^{a} ±0.200	0.817^{a} ±0.696

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลพบในอาหารT6จากเชื้อซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินและเชื้ออ้างอิง *Clostridium acetobutylicum* DSM792

4.4 การทดสอบทางชีวเคมี

จากผลการทดสอบการผลิตและวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Clostridium* spp. ที่มีความสามารถในการตัวทำละลายรวมได้สูงสุดมาทั้งหมด 5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 15ตัวอย่างคือ C2aD3b H1aH2aและ J7aนำมาทดสอบกระบวนการทางชีวเคมีได้แก่ การทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโตส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลเซลลูไบโอส ทดสอบการสร้างแก๊ส ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และทดสอบการเคลื่อนที่พบว่าเมื่อเทียบคุณลักษณะทางชีวเคมีกับเชื้ออ้างอิง (Reference)คือ *Clostrodiumacetobutylicum* DSM 792 และงานวิจัยของ Prescott, 1993และ John และคณะ,1994 ซึ่งกล่าวว่าการทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโตส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลเซลลูไบโอส ทดสอบการสร้างแก๊ส และทดสอบการเคลื่อนที่ให้ผลเป็นบวก ส่วนการทดสอบคะตะเลส ให้ผลเป็นลบ พบว่าเชื้อรหัส C2a ให้ผลคล้ายกับเชื้อควบคุมและงานวิจัยมากที่สุด ส่วนในการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสพบว่าเชื้อรหัส D3b และ J7a ให้ผลเป็นบวก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของNajeeb และคณะ (2015)ได้ทำการคัดแยก *Clostridium acetobutylicum* YM1 เป็นสายพันธุ์ที่ทนอากาศ มีคุณสมบัติในการผลิตบิวทานอลภายใต้สภาวะที่มีการใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนให้ผลที่คล้ายกัน โดยมีปริมาณบิวทานอลคือ 12.18 และ 12.30 กรัมต่อลิตรตามลำดับซึ่ง*Clostridium acetobutylicum* YM1มีเอนไซม์คะตะเลสที่สามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ที่เป็นพิษกับเซลล์ได้ ดังแสดงในตารางที่4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. โดยมี *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference)

การทดสอบ / ตัวอย่าง		การทดสอบคะตะเลส	การหมักน้ำตาล			การเคลื่อนที่	แก๊ส
			ไซโลส	มอลโตส	เซลโลไบโอส		
อ้างอิง	1	-	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	+	+	+
C2a	1	-	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	+	-	+
D3b	1	+	-	-	-	+	+
	2	+	-	+	-	-	-
	3	+	-	-	-	+	+
H1a	1	-	-	+	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
H2a	1	-	-	+	-	-	-
	2	-	-	+	-	-	+
	3	-	-	+	-	-	-
J7a	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ

Catalase

+ = แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ Catalase

- = แบคทีเรียไม่สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase

Fermentation

+ = แบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลได้

- = แบคทีเรียไม่สามารถหมักน้ำตาลได้

Motility

+ = แบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้

- = แบคทีเรียไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

Gas

+ = แบคทีเรียสามารถสร้างแก๊สได้

- = แบคทีเรียไม่สามารถสร้างแก๊สได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาครั้งนี้สังเกตได้ว่าปริมาณ ABE รวมที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับงานวิจัยชิ้นอื่น เนื่องจากหลายปัจจัย คือในการศึกษาครั้งนี้มีพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างดินมีจำกัดจำนวน 65 ตัวอย่าง บริเวณรอบสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและพื้นที่ใกล้เคียง เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Mohamed และคณะ (2014) ได้มีการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 96 ตัวอย่าง จากเมือง Assuit Governorate ประเทศอียิปต์

ในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้อาหารเหลว T6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่ม 7 วันเพื่อผลิต ABE เมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าน้ำตาลในอาหารยังเหลืออยู่ ดังนั้นควรมีการลดปริมาตรอาหารลงให้เหมาะสมกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

เชื้อที่คัดแยกได้นั้นสามารถผลิตบิวทานอลได้ปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเชื้ออ้างอิงคือ *Clostridium acetobutylicum*DSM 792 เนื่องจากเชื้อที่แยกได้อาจจะเป็นเชื้อ *Clostridium*สายพันธุ์อื่นที่มีความสามารถในการผลิต ABE ได้ซึ่งเราไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้เพราะในการศึกษาครั้งนี้ทดสอบเพียงทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี โดยในงานวิจัยของ Mohamed และคณะ(2014) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ*Clostridium*ที่มีการผลิต ABE 3 สายพันธุ์คือ *C. beijerinckii, C. chauvoei* และ *C. roseum*มีความสามารถในการผลิต ABE รวมได้ 31.89, 19.24 และ 29.81 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำตาลไซโลส มอลโตสและ เซลโลไบโอสในการทดสอบการหมักน้ำตาล เพราะว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*มีความสามารถในการใช้น้ำตาลทั้งสามตัวนี้ได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่น (Najeebและคณะ, 2015)และพบว่าเชื้อรหัส D3b H1aและH2a ไม่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลบางชนิดเนื่องมาจากเชื้อทั้งสามตัวนี้อาจเป็นเชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *Clostridium acetobutylicum* ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณเขตลาดกระบังทั้งหมด 65 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อได้ 96 ไอโซเลทและคาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. จำนวน 15 ไอโซเลทโดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิต อะซิโตน บิวทานอล เอทา-นอลโดยใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร

ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone butanol ethanol,ABE) ด้วยเครื่อง HPLC จาก 15 ไอโซเลทมีจำนวน 10 ไอโซเลทที่สามารถผลิต ABE ได้ และเชื้อรหัส H1a มีความสามารถในการผลิตอะซิโตนได้สูงที่สุดคือ 0.56 กรัมต่อลิตร เชื้อรหัส C2a มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 0.05 กรัมต่อลิตร เชื้อรหัส J7a มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 1.45 กรัมต่อลิตรและยังสามารถผลิต ABE รวมได้สูงที่สุดคือ 1.77 กรัมต่อลิตรจากการคัดแยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp. จากตัวอย่างดินทั้งหมด 11 แหล่งมีแหล่งที่สามารถพบเชื้อและสามารถผลิต ABE ได้ถึง 3 ไอโซเลท คือบริเวณอาคารเรียนรวมสมเด็จพระเทพฯ

ทำการเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิต ABE รวมมากที่สุดจำนวน 5 ไอโซเลทคือ H1aH2a C2a J7a J14a มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเชื้อรหัส D3b และ J7a ให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นบวกซึ่งคาดว่าเชื้ออาจเป็นเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิต ABE และทนออกซิเจนได้ และเชื้อรหัส C2a มีคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงกับเอกสารอ้างอิงของ Prescott, 1993 และเชื้อที่ใช้ในการอ้างอิง (*Clostridiumacetobutylicum*DSM 792) ซึ่งคาดว่าเชื้อ C2a อาจจะเป็นเชื้อ *Clostridium*spp.โดยการทดสอบนี้เป็นการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น ดังนั้นควรมีการพิสูจน์ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรม 16s rRNA ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต ABE ควรมีอาหารมากกว่า 1 ชนิดในการเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบการผลิตและกำหนดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่าง เช่น 7, 10, 14 วันเป็นต้นเพื่อให้ได้ผลผลิตมากที่สุด

2. ควรมีการทดสอบลักษณะเฉพาะทางด้านชีวเคมีที่หลากหลายเพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าเป็นเชื้อ *Clostridium* spp.

3. ควรมีการทดสอบลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมคือ16s rRNA เพิ่มเติมเพื่อให้ทราบถึงระดับสายพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชนิกา อื้อพานิช ชมพูนุช วิรุณานนท์และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2555 ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงที่กำลังจะมาแทนเอทานอล วารสารพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22(3):703-709

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนโตร์.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2538. การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร: โอเดียโตร์.

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2547. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

สุนทร กาญจนทวี. 2555 "การศึกษาการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล(เอบีอี) จากมันสำปะหลัง" งานวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี

Berezina O.V., A. Brandt, S. Yarotsky, W.H. Schwarz, V.V. Zverlov. 2009. "Isolation of a new butanol-producing Clostridium strain: high level of hemicellulosic activity andstructure of solventogenesis genes of a new Clostridium saccharobutylicumisolate",Syst.Appl.Microbiology.

Jay C. 2009. Biomass to Renewable Energy Processes. CRC Press

Mohamed, H. A., Abdel-Naser , A. Z., Abdel-Wahab, E. E.,Shimaa, M. A. 2014. "Acetone butanol ethanol production from substandard and surplusdates by Egypt native *Clostridium* stain." Department of Chemical and Biomolecular Engineering, National University of Singapore, Singapore

Montoya D., S. Spitia, E. Silva, W.H. Schwarz. 2000. "*Isolation of mesophilic solventproducing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis*" J. Biotechnology.

Najeeb Kaid Nasser Al-Shorgania, c, Mohd Sahaid Kalilb, Wan Mohta Wan Yusoffa, Aidil Abdul Hamida. 2016. "*Biobutanol production by a new aerotolerant strain of Clostridium acetobutylicum YM1 under aerobic conditions*"School of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Sciences and Technology, University Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM, Bangi, Selangor, Malaysia

Najeeb,K. N. A.,Mohd H. M. I., Wan M. W. Y., Mohd S. K., Aidil A. H.2016."*Isolation of a Clostridium acetobutylicum strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes*" Renewable Energy. School of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Sciences and Technology, University Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM, Bangi, Selangor, Malaysia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ogata, S., and M. Hongo. 1973. "Bacterial lysis of Clostridium species. I. Lysis of *Clostridium* species by univalent cation". J.Gen. Appl. Microbiology

Prescott.1993 Microbiology 2nd edition. Wm.c.Brown Communications, Inc.

Teck K. C., Da-Wei L., Chao Q., Kun-Lin Y., Jianzhong H.2013."*Characterization of a butanol–acetone-producing Clostridium strain and identification of its solventogenic genes*" Bioresource Technology.

[Online].Available :http://rj3sp.blogspot.com /2010 /08 / biofuel – from – whisky - byproducts.html (10/12/2015)

[Online].Available : http://genome.jgi.doe.gov/clobe/clobe.home.html (9/12/2558)

[Online].Available:http://www.public-domain-image.com/free-images/Science/microscopy-images/botulism-clostridium-botulinum/clostridium-botulinum-type-e-colonies-displaying-an-opaque-zone-grown-on-a-48hr-egg-yolk-agar-plate-mag-19x/attachment/clostridium-botulinum-type-e-colonies-displaying-an-opaque-zone-grown-on-a-48hr-egg-yolk-agar-plate-mag-19x (19/12/2558)

[Online].Available:https://en.wikipedia.org/wiki/Acetone%E293butanol%E2%80%93ethanol_fermentation (10/12/2558)

[Online].Available:http://themodern.farm/studies/Microbiology-Laboratory-Manual.pdf (16/06/2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

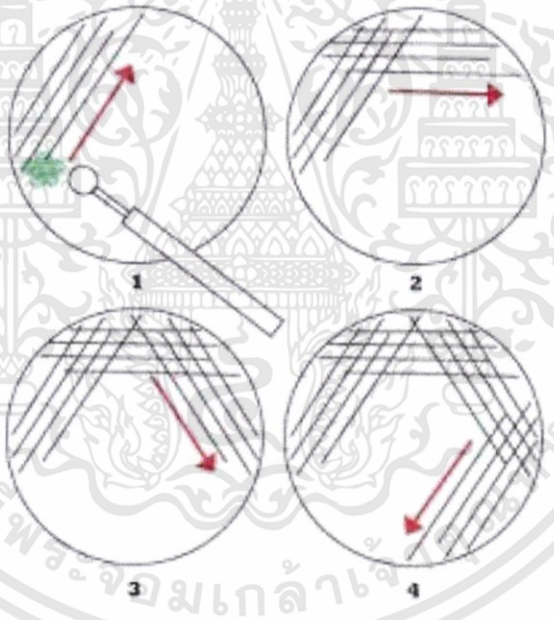
ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธีการสตรีคเพลท

นำลูปเผาไฟจนแดง จากนั้นรอให้เย็นแล้วนำไปจุ่มเชื้อในอาหารเหลวนำไปขีดเบาๆบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยขีดไปมาในแนวขนานกันและไม่ทับรอยกันเฉพาะในรอยขีดที่ 1 บนรอยขีดช่วงแรกๆจะมีแบคทีเรียเจริญอยู่จำนวนมาก อาจทำให้โคโลนีเจริญซ้อนกัน แต่บนรอยขีดสุดท้ายจะมีแบคทีเรียเจือจางลงตามลำดับ จากนั้นหมุนอาหารเลี้ยงเชื้อไป 90 องศาและทำแบบเดิมอีกครั้งในรอยขีดที่ 2 หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปอีก 90 องศาโดยทำแบบเดียวกันอีกครั้งในรอยขีดที่ 3 และ 4 ตามลำดับ โดยนำลูปมาเผาไฟฆ่าเชื้อในแต่ละช่วงที่ทำการขีดยกเว้นก่อนรอยขีดที่ 4 ไม่ต้องทำการเผาลูปดังแสดงในรูปที่ ก.1 (นันทนา,2537)



รูปที่ ก.1 ขั้นตอนการสตรีคเพลท

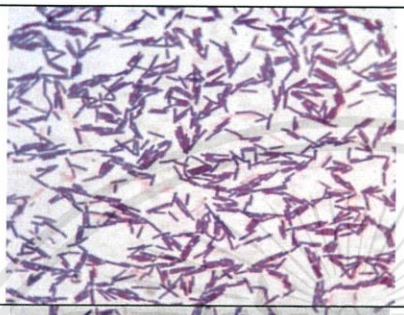
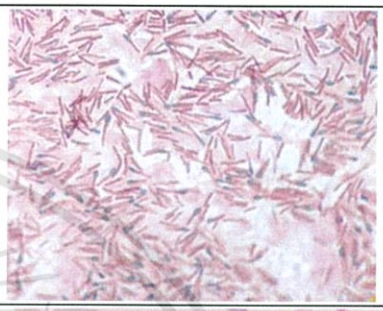
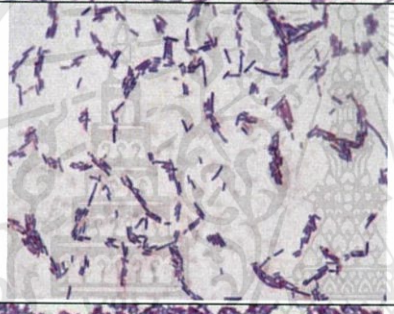
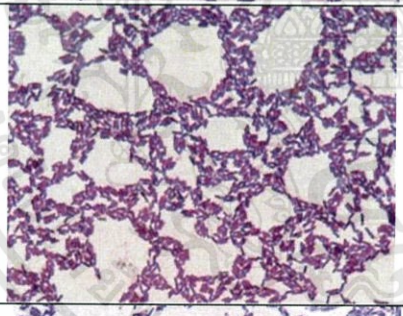
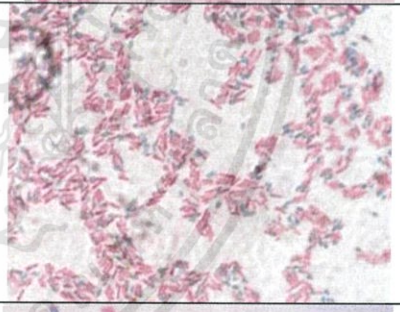
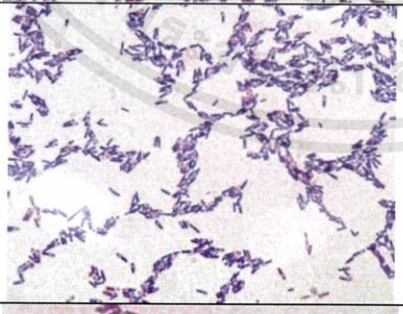
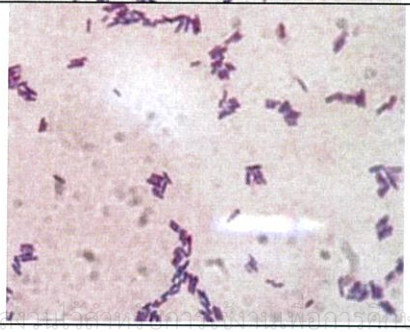
ที่มา : http://themodern.farm/studies/Microbiology-Laboratory-Manual.pdf (วันที่สืบค้น 16/06/2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

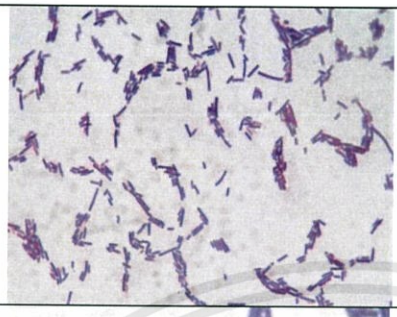
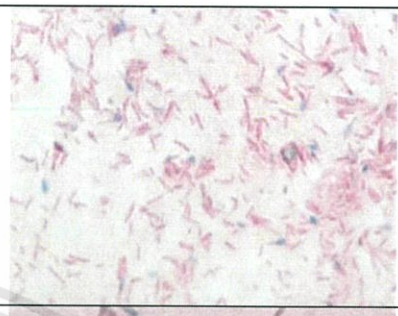
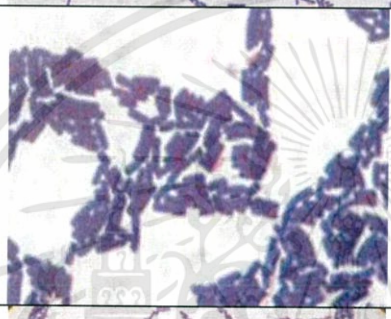
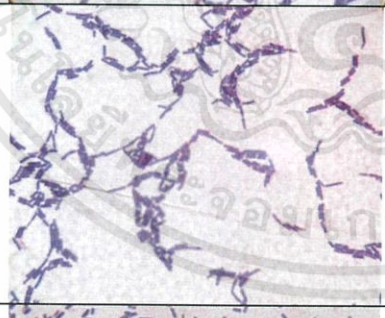
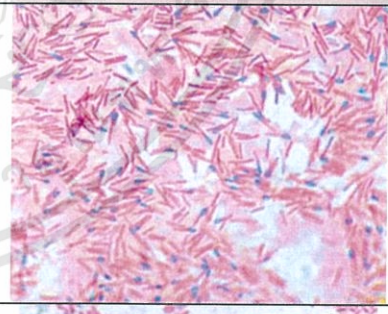
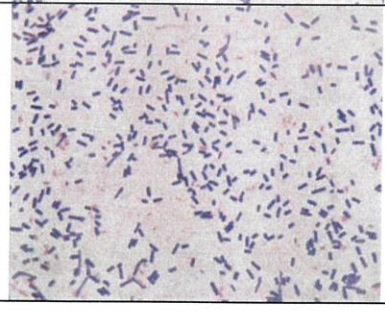
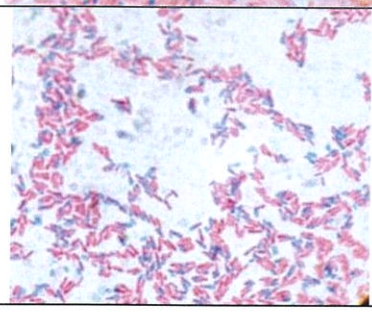
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตารางภาคผนวก ข. การติดสีแกรมและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp.

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	การติดสีสปอร์
A2a		
A3a		
A11a		
A12a		
A14a		

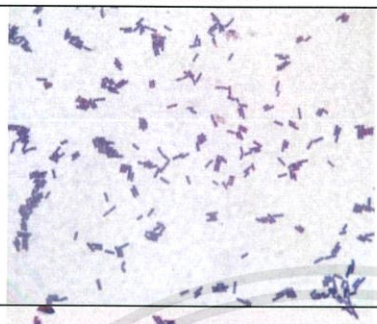
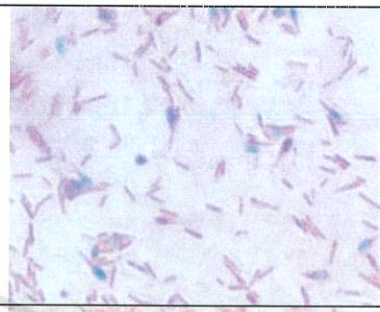
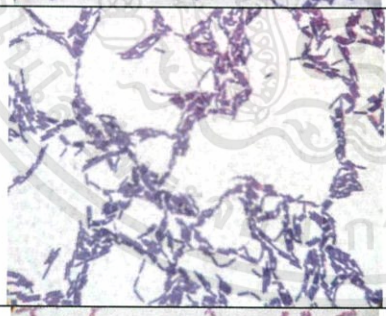
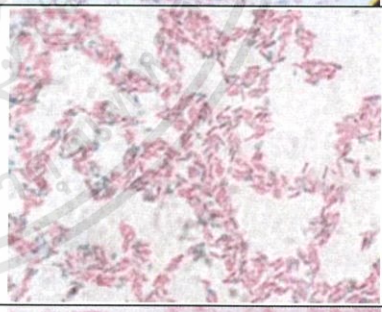
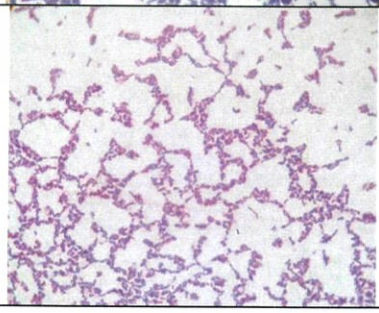
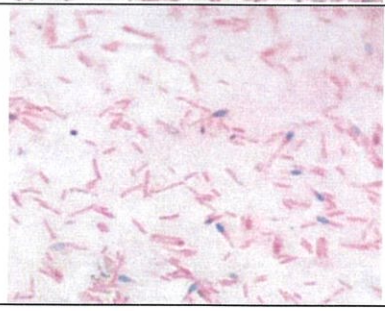
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข.(ต่อ) การติดสีแกรมและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp.

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	การติดสีสปอร์
B4b		
C2a		
D1a		
D3b		
F1a		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข.(ต่อ) การติดสีแกรมและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *Clostridium* spp.

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	การติดสีสปอร์
H1b		
J7a		
J14a		
L1a		
M1a		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการเตรียมสารละลายและกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารอินทรีย์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

เตรียม Stock สารอินทรีย์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

<u>อะซิโตน</u>

เตรียม stock อะซิโตน ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตอะซิโตน 7.34 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

<u>เอทานอล</u>

เตรียม stock เอทานอล ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตเอทานอล5.87 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

<u>บิวทานอล</u>

เตรียม stock บิวทานอล ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตบิวทานอล0.92 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายอินทรีย์ในการวิเคราะห์

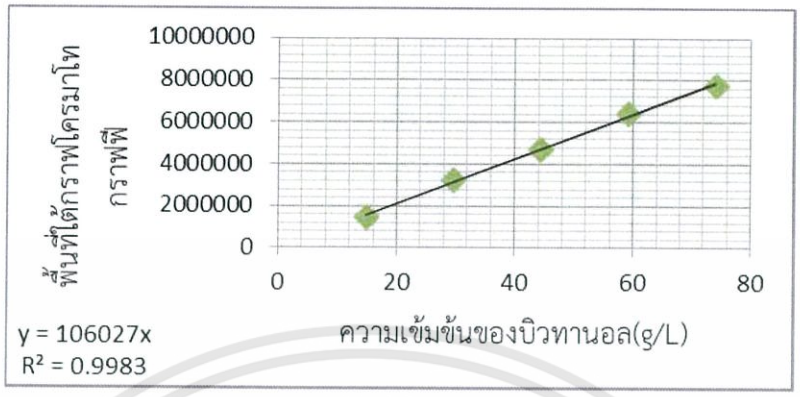
เตรียมสารละลายเอทานอลอะซิโตน และบิวทานอล ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 โมลาร์โดยปิเปตสารละลายจาก Stock ความเข้มข้น 1 โมลาร์0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 0.10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายโมบายเฟส (H_2SO_4 0.005 โมลาร์)

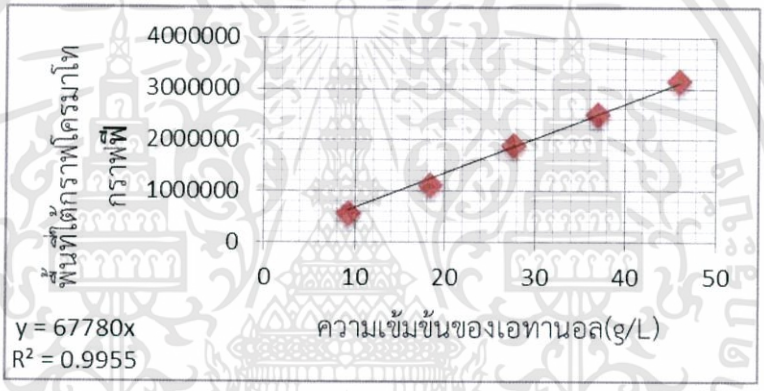
เตรียม stock กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปต H_2SO_4 0.272 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั้นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้งหมดกรองผ่านชุดกรองระบบสุญญากาศ ใช้เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายโมบายเฟสและน้ำ DI ไปโซนิเคทเพื่อกำจัดฟองอากาศเป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC

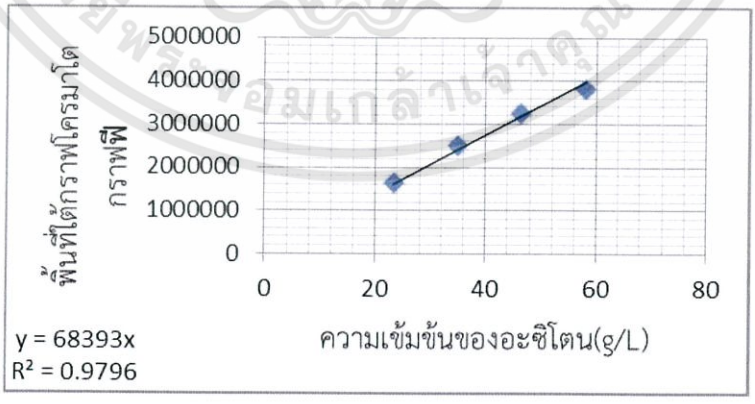
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานสารละลายบิวทานอล



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอล



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานสารละลายอะซิโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง.1 ข้อมูลทางสถิติของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	12.967	10	1.297	7.641	.000
	Within Groups	3.734	22	.170		
	Total	16.700	32			
Butanol	Between Groups	.007	10	.001	.630	.773
	Within Groups	.026	22	.001		
	Total	.033	32			
Ethanol	Between Groups	6.422	10	.642	.857	.583
	Within Groups	16.485	22	.749		
	Total	22.907	32			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 ข้อมูลทางสถิติของอะซิโตนโดยใช้วิธี Duncan'sที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05ด้วยโปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์

Duncan[a]

sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D1a	3	.0131	
B4b	3	.0161	
H1b	3	.0165	
F1a	3	.0786	
J14a	3	.1527	
D3b	3	.1823	
J7a	3	.2887	
H2a	3	.4270	
C2a	3	.4331	
H1a	3	.5645	
reference	3		2.3041
Sig.		.171	1.000

ตารางที่ ง.3 ข้อมูลทางสถิติของบิวทานอลโดยใช้วิธี Duncanที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05ด้วยโปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์

Duncan[a]

sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
B4b	3	.0000
D1a	3	.0000
F1a	3	.0000
H1b	3	.0000
J14a	3	.0096
H2a	3	.0172
H1a	3	.0203
reference	3	.0211
D3b	3	.0211

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.3(ต่อ) ข้อมูลทางสถิติของบิวทานอลโดยใช้วิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์

sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
J7a	3	.0359
C2a	3	.0460
Sig.		.168

ตารางที่ ง.4 ข้อมูลทางสถิติของเอทานอลโดยใช้วิธี Duncanที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05ด้วยโปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์

Duncan[a]

sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
H1b	3	.0533
F1a	3	.0886
C2a	3	.3630
D3b	3	.3698
H2a	3	.3724
J14a	3	.5033
D1a	3	.5386
B4b	3	.5526
H1a	3	.5593
reference	3	1.4346
J7a	3	1.4455
Sig.		.105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.5 ข้อมูลทางสถิติค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Upper Bound
Acetone	reference	3	2.304	.776	.448	.3759	4.2323
	C2a	3	.433	.750	.433	-1.4304	2.2967
	D3b	3	.182	.247	.143	-.4315	.7961
	B4b	3	.016	.027	.016	-.0533	.0856
	D1a	3	.013	.023	.013	-.0433	.0696
	J7a	3	.289	.500	.289	-.9534	1.5308
	F1a	3	.079	.085	.049	-.1313	.2885
	H1b	3	.017	.029	.017	-.0546	.0877
	J14a	3	.153	.230	.133	-.4193	.7247
	H1a	3	.565	.236	.136	-.0207	1.1496
	H2a	3	.427	.522	.302	-.8703	1.7243
	Total	33	.407	.722	.126	.1508	.6631
Ethanol	reference	3	1.435	2.424	1.400	-4.59	7.4570
	C2a	3	.363	.516	.298	-.918	1.6437
	D3b	3	.370	.473	.273	-.804	1.5436
	B4b	3	.553	.853	.492	-1.566	2.6709
	D1a	3	.539	.840	.485	-1.547	2.6245
	J7a	3	1.446	.475	.274	.265	2.6264
	F1a	3	.089	.048	.028	-.032	.2089
	H1b	3	.053	.020	.0116	.003	.1031
	J14a	3	.503	.412	.238	-.520	1.5267
	H1a	3	.560	.0747	.043	.374	.7450
	H2a	3	.372	.200	.115	-.124	.8686
	Total	33	.571	.846	.147	.271	.8710
Butanol	reference	3	.021	.002	.001	.0156	.027
	C2a	3	.046	.080	.046	-.152	.244
	D3b	3	.021	.037	.021	-.070	.112

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.5(ต่อ) ข้อมูลทางสถิติค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Lower Bound
Butanol	B4b	3	.000	.000	.000	.000	.000
	D1a	3	.000	.000	.000	.000	.000
	J7a	3	.036	.062	.035	-.119	.1905
	F1a	3	.000	.000	.000	.000	.000
	H1b	3	.000	.000	.000	.000	.000
	J14a	3	.010	.017	.009	-.032	.050
	H1a	3	.020	.005	.003	.008	.032
	H2a	3	.017	.030	.017	-.057	.091
	Total	33	.016	.032	.006	.004	.027
ABE	reference	3	3.7599	3.19456	1.84438	-4.1758	11.6956
	C2a	3	.8422	1.34519	.77665	-2.4995	4.1838
	D3b	3	.5733	.75576	.43634	-1.3041	2.4507
	B4b	3	.5687	.88069	.50846	-1.6190	2.7565
	D1a	3	.5517	.82868	.47844	-1.5069	2.6103
	J7a	3	1.7701	.40141	.23176	.7730	2.7673
	F1a	3	.1672	.08838	.05103	-.0524	.3868
	H1b	3	.0698	.04135	.02387	-.0329	.1725
	J14a	3	.6656	.57198	.33023	-.7553	2.0865
	H1a	3	1.1441	.28806	.16631	.4285	1.8597
	H2a	3	.8166	.69644	.40209	-.9135	2.5466
	Total	33	.9936	1.38985	.24194	.5007	1.4864

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

สูตรอาหาร หลักการและวิธีการทางชีวเคมี

สูตรอาหารแต่ละชนิดต่อไปนี้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. การทดสอบหมักน้ำตาล (ศุภยางค์, 2547)

เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัมต่อลิตร
yeast extract	1	กรัมต่อลิตร
ฟีนอลเรด	0.018	กรัมต่อลิตร
คาร์โบไฮเดรต (มอลโตส, ไซโลส, เซลโลไบโอส)	10	กรัมต่อลิตร

หลักการ เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลชนิดนั้นๆได้หรือไม่ อาหารที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย broth base ผสมกับน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ เช่น เซลโลไบโอสมอลโตส ไซโลสและเติมอินดิเคเตอร์เพื่อที่จะบอกสภาวะความเป็นกรดด่าง

การทดสอบ ลงเชื้อในอาหาร ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 18-24 ชั่วโมง ดูการเปลี่ยนสีของอาหาร เช่นถ้าใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์เมื่อมีกรดเกิดขึ้นจากการหมักก็จะเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง

ผลบวก มีกรดทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
ผลลบ อาหารเป็นสีชมพูแดง

2. การทดสอบการสร้างแก๊ส (ศุภยางค์, 2547)

อาหารเหลว T6

Tryptone	6	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์	2	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$MgSo_4.7H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมอซิเตต	3	กรัมต่อลิตร
ซิสเทอีน ไฮโดรครอไรด์	0.5	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	เปอร์เซ็นต์
กลูโคส	30	กรัมต่อลิตร

หลักการ เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตแก๊สหลังกระบวนการหมักได้หรือไม่ โดยใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) เพื่อที่จะเก็บแก๊สที่แบคทีเรียสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบ ลงเชื้อในอาหาร ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 18-24 ชั่วโมง สังเกตฟองแก๊สในหลอดดักแก๊ส

ผลบวกเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส
ผลลบ ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส

3. การทดสอบการเคลื่อนที่ (นันทนา, 2537)

ทริปโตส	10	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัมต่อลิตร
เติมวุ้น	5	กรัมต่อลิตร

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ ซึ่งเนื่องมาจากการที่เชื้อมีแฟลกเจลลา (flagella) เชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะสามารถเคลื่อนออกจากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ซึ่งจะเกิดการเจริญ และแบ่งตัวไปยังบริเวณนั้นต่อไป

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Motility test medium โดย stab ตรงๆ เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2/3 ของส่วนสูงของอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผล ถ้ายังให้ผลลบ ให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1-2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ

ผลบวก เห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอย stab หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอย stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม
ผลลบ เห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจน ที่บริเวณรอย stab โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน แม้จะบ่มเชื้อต่ออีก 2 สัปดาห์ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้