การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิต Polyhydroxyalkanoates (PHAs) จากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล

Isolation of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Sea Food Processing Industry Waste Water

นางสาวกุลนัทธี ขุนเหตุ

นายภูริเดช เดชคำ

นางสาวรสสุคนธ์ สุนทรโอวาท

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2557

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิต Polyhydroxyalkanoates(PHAs)จากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล

Isolation of Polyhydroxyalkanoates(PHAs) from Sea Food Processing Industry Waste Water

นางสาวกุลนัทธี ขุนเหตุ

นายภูริเดช เดชค้ำ

นางสาวรสสุคนธ์ สุนทรโอวาท

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิต Polyhydroxyalkanoates(PHAs)จากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล

Isolation of Polyhydroxyalkanoates(PHAs) from Sea Food Processing Industry Waste Water

นางสาวกุลนัทธี ขุนเหตุ

นายภูริเดช เดชค้ำ

นางสาวรสสุคนธ์ สุนทรโอวาท

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation of Polyhydroxyalkanoates(PHAs) from Sea Food Processing Industry Waste Water

Miss Kunnuttee Kunhet

Mister Pooridet Detkum

Miss Rotsukhon Sunthon-owart

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHONOGY LAGKRABANG

ACANDEMIC YEAR 2014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิต Polyhydroxyalkanoates (PHAs) จากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล Isolation of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Sea Food Processing Industry Waste Water		
โดย	นางสาวกุลนัทธี	ขุนเหตุ	รหัส 54051047
	นายภูริเดช	เดชคำ	รหัส 54051105
	นางสาวรสสุคนธ์	สุนทรโอวาท	รหัส 54051111
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ธิปชัย	วัฒนวิจารณ์	

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิต Polyhydroxyalkanoates (PHAs) จากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล			
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกุลนัทธี	ขุนเหตุ	รหัส	54051047
	นายภูริเดช	เดชค่ำ	รหัส	54051105
	นางสาวรสสุคนธ์	สุนทรโอวาท	รหัส	54051111
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต			
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม			
ปีการศึกษา	2557			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์			

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการคัดแยก Polyhydroxyalkanoates(PHAs) จากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล โดยเก็บน้ำเสีย 2 แหล่ง คือ น้ำเสียก่อน และ หลังบำบัด นำมาเลี้ยงเชื้อในอาหาร 2 ประเภท คือ อาหาร LB (Luria-Bertani Medium) และ NA (Nutrient Agar) การคัดแยกทำโดยย้อมสี Sudan Black B และ Nile Blue A ตามลำดับ ผลจากการคัดแยกพบว่า เมื่อย้อมแบคทีเรียที่โตบนอาหาร LB agar ด้วย Sudan Black B พบแบคทีเรียที่ให้ผลบวก 5 โคโลนีจากน้ำเสียก่อนการบำบัดและ 4 โคโลนีจากน้ำเสียหลังการบำบัด ไม่พบโคโลนีจากน้ำเสียก่อนบำบัดที่เลี้ยงบนอาหาร NA Agar แต่พบ 4 โคโลนีจากน้ำเสียหลังบำบัด เมื่อนำมาคัดเลือกโดยการย้อมด้วย Nile Blue A ไม่พบโคโลนีที่ได้จากน้ำเสียก่อนบำบัดแต่พบ2 โคโลนีในน้ำเสียหลังบำบัดที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร LB agar ในส่วนของเชื้อที่โตบนอาหาร NA Agar ไม่พบโคโลนีที่ได้จากน้ำเสียก่อนบำบัด แต่พบ 2 โคโลนีในน้ำเสียหลังบำบัด จากผลที่ได้พบว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิต PHAs จะเจริญได้ดีในอาหารประเภท LB Agar

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต น้ำเสีย อาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Sea Food Processing Industry Wastewater		
Student	Miss Kunnutee	Kunhet	ID 54051047
	Mr. Pooridet	Detkum	ID 54051105
	Miss Rotsukhon	Sunthon-owart	ID 54051111
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Environmental Chemistry		
Academic Year	2014		
Advisor	Dr.Tipachai Vatanavicharn		

Abstract

In this research, Polyhydroxyalkanoates (PHAs) producing bacteria were isolated from sea food processing industry wastewater. Bacteria from pre and post-treatment waste water were cultured on Luria-Bertani(LB) agar and Nutrient Agar(NA). PHAs producing bacteria were screened with Sudan Black B and Nile Blue A. With Sudan black B screening, five and six positive colonies that grown on LB agar were found from pre-and post-treatment water, respectively. On NA agar plates, four positive colonies from post-treatment waste water were found. After screening with Nile Blue A, no positive colony from pre-treatment waste water was remained on LB agar plate but only two colonies from post-treatment waste water were positive. Two positive colonies from post-treatment waste water were found on NA agar plates. From these results, PHA producing bacteria were mostly found in post-treatment waste water and preferred to grow on LB agar media.

Keywords : Polyhydroxyalkanoates Waste water Medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โครงงานพิเศษนี้ประสบผลสำเร็จได้เนื่องจากความอนุเคราะห์ของ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำปรึกษา ความรู้ และตรวจแก้ไข จนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่คอยให้คำปรึกษาชี้แนวทางและให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน รวมทั้งอำนวยความสะดวก ด้านสถานที่การดำเนินงานตลอดระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความสะดวกในการปฏิบัติการทดลองในโครงงานพิเศษครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเคมี เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ฝ่ายธุรการประจำภาควิชาเคมีและเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ รวมถึงแม่บ้านคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวก ตลอดจนความช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์ สารเคมีและสถานที่ตลอดระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ บริษัท เอ็มเอ็มพี อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์น้ำเสียและกากของเสีย ในการนำมาเป็นแหล่งวัตถุดิบในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ ปริญญาโท เพื่อนๆ ภาควิชาเคมี ที่สละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือต่างๆและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบุพการีและผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ได้อบรบสั่งสอนชี้แนะแนวทางเป็นกำลังใจให้ความช่วยเหลือและให้การสนับสนุนทางการศึกษาด้วยดีตลอดมา

นางสาวกุลนัทธี ขุนเหตุ

นายภูริเดช เดชค้ำ

นางสาวรสสุคนธ์ สุนทรโอวาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
คำย่อ และสัญลักษณ์	X
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 พอลีไฮดรอกซิลแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs)	4
2.2 พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)	5
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	13
3.1 แหล่งน้ำ	13
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	13
3.3 สารเคมี	13
3.4 การดำเนินการ	14
3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมน้ำตัวอย่าง	14
3.4.2 ขั้นตอนในการบ่มเชื้อ	14
3.4.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.4.4 การคัดแยก(Screening) เชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs	14
3.4.5 การศึกษาคุณภาพน้ำเสีย	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	16
4.1 ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเสีย	16
4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs	16
4.3 การคัดแยก(Screening) เชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs	29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	35
5.1 สรุปผลการวิจัย	35
5.2 ข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์น้ำ	39
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสีย้อม(dry)	45
ภาคผนวก ค เครื่องมือ	49
ภาคผนวก ง การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของ PP เปรียบเทียบกับ PHB 7

ตารางที่ 2.2 เชื้อจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHAs 9

ตารางที่ 3.1 วิธีวิเคราะห์พารามิเตอร์น้ำเสีย 15

ตารางที่ 4.1 พารามิเตอร์ต่างๆของน้ำเสียก่อนและหลังบำบัด 16

ตารางที่ 4.2 จำนวนโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียจากน้ำเสีย บนอาหาร LB Agar และ NA 17

ตารางที่ 4.3 จำนวนโคโลนีเดี่ยวและเปอร์เซ็นต์การติดสี Sudan Black B ของจำนวนโคโลนีเดี่ยวทั้งหมด 18

ตารางที่ 4.4 ยืนยันการติดสี Sudan Black B ครั้งที่ 1 18

ตารางที่ 4.5 ยืนยันการติดสี Sudan Black B ครั้งที่ 2 25

ตารางที่ 4.6 การคัดเลือกจากการการย้อมสี Nile Blue A และส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 ลักษณะแกรนูลที่สะสมสารไบโอพอลิเมอร์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ 1

รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต 2

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต 4

รูปที่ 2.2 วิถีการสังเคราะห์โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต 8

รูปที่ 4.1ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนีLB-In-1 19

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-1

รูปที่ 4.2 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-13 19

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-13

รูปที่ 4.3 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-29 20

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-29

รูปที่ 4.4 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-34 20

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-34

รูปที่ 4.5 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-47 21

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-47

รูปที่ 4.6 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-2 21

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-2

รูปที่ 4.7 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-3 22

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-3

รูปที่ 4.8 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-4 22

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-4

รูปที่ 4.9 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-16 23

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-16

รูปที่ 4.10 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-16 23

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-16

รูปที่ 4.11 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-19 24

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-19

รูปที่ 4.12 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-23 24

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-23

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.13 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-34 25

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-34

รูปที่ 4.14 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-1 26

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-1

รูปที่ 4.15 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-29 26

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-29

รูปที่ 4.16 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-2 27

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-2

รูปที่ 4.17 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-3 27

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-3

รูปที่ 4.18 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-4 28

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-4

รูปที่ 4.19 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-16 28

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-16

รูปที่ 4.20 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-16 29

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-16

รูปที่ 4.21 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-19 29

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-19

รูปที่ 4.22 ก.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-3 31

ข.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี LB-Ex-3(แสงขาว)

ค.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี LB-Ex-3

รูปที่ 4.23 ก.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-4 32

ข.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี LB-Ex-4(แสงขาว)

ค.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี LB-Ex-4

รูปที่ 4.24 ก.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-16 33

ข.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี NA-Ex-16 (แสงขาว)

ค.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี NA-Ex-16

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น[illegible]องเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.25 ก.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-19 34
ข.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี NA-Ex-19(แสงขาว)
ค.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี NA-Ex-19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ และสัญลักษณ์

BOD	ปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการสลายสารอินทรีย์
CFU	Colony Forming Unit
COD	ปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการใช้เพื่อออกซิไดซ์สารอินทรีย์ในน้ำ
DO	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ
Ex	น้ำเสียหลังบำบัด
In	น้ำก่อนหลังบำบัด
LB	Luria-Bertani Medium
mg/L	มิลลิกรัมต่อลิตร
ml	มิลลิลิตร
NA	Nutrient Agar
ND	Non-Detect
pH	พีเอช
PHAs	พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต
TKN	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด
%	เปอร์เซ็นต์หรือร้อยละ
°C	องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของงานวิจัย

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ความนิยมในการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากพลาสติกเพิ่มสูงขึ้นทำให้ภาคอุตสาหกรรมมีการพัฒนาเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตให้สูงขึ้น ซึ่งกระบวนการผลิตพลาสติกนั้นเป็นกระบวนการทางเคมีที่ใช้วัตถุดิบที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เช่น ปิโตรเลียม ถ่านหิน ซึ่งนับวันยิ่งมีปริมาณที่น้อยลง นอกจากนี้ ยังทำให้เกิดปัญหามลพิษที่เกิดจากกระบวนการผลิตต่างๆ ตามมาอีกด้วย เช่น น้ำเสียที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมพลาสติก ขยะพลาสติกที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นตามความต้องการการใช้ผลิตภัณฑ์พลาสติกของมนุษย์ ซึ่งมีการย่อยสลายยากมากและต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงในการนำกลับมาใช้ใหม่ ทำให้ในปัจจุบันจึงมีนักวิจัยให้ความสนใจในการผลิตพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) และหันมาพัฒนาเพื่อการผลิตพลาสติกชีวภาพมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ เพราะสามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ และได้คาร์บอนไดออกไซด์น้ำและชีวมวลโดยแบคทีเรีย และเชื้อราจะทำการย่อยสลายจนหมดไปจึงไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ,2549) พลาสติกชีวภาพที่งานวิจัยนี้จะกล่าวถึง คือ Polyhydroxyalkanoates(PHAs) เป็นสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ดังรูปที่ 1.1 ในสภาวะที่ไม่สมดุล

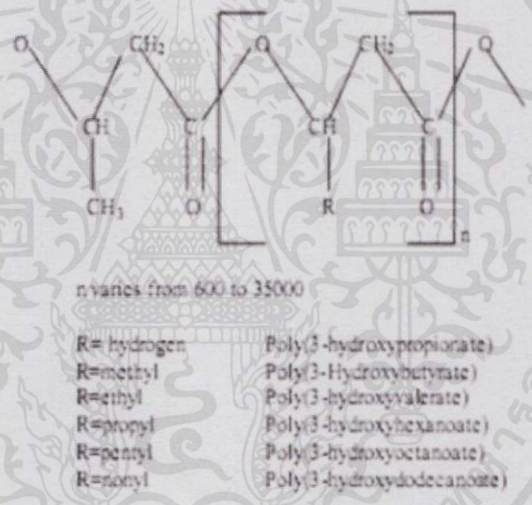
รูปที่ 1.1 ลักษณะแกรนูลที่สะสมสารไบโอพอลิเมอร์ภายในเซลล์จุลินทรีย์
ที่มา: Chien และ คณะ(2550)

โดย PHAs เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่จัดอยู่ในกลุ่มไบโอพอลิเอสเทอร์ (Biopolyester) เป็นพลาสติกชีวภาพที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเลียมชนิดพอลิโพรพิลีน (Polypropylene,PP) (Evan และSikder, 2553) แต่มีความยืดหยุ่นและความเปราะบางมากกว่าพอลิโพรพิลีนซึ่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHAs คือ ข้าวโพดมันสำปะหลังและอ้อย โดยกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตจะเริ่มจากการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งสามารถเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลให้เป็น PHAs โดย PHAs มีคุณสมบัติในการขึ้นรูปเป็นฟิล์มการฉีดและเป่าให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายแบบ (เยาวพา, 2554)

โดยในปีค.ศ 1926 Lemoigne นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศสได้ค้นพบการผลิตและการสะสมสาร PHAs ในรูปของสาร Polyhydroxybutyrate(PHB) ภายในแบคทีเรียสายพันธ์ *Bacillus megaterium* ซึ่งอยู่ในรูปของไบโอพอลิเมอร์ที่สามารถสร้างและสกัดได้ภายในเซลล์จุลินทรีย์โดยตรง (Intracellular product) สารPHAs เป็นพอลิเอสเทอร์แบบกึ่งผลึก ประกอบไปด้วยโมโนเมอร์หลัก คือ กรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิก(Hydroxyalkanoic: HA) จำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความยาวของสายโซ่ของหมู่แทนที่ในหน่วยของโมโนเมอร์ได้แก่ ความยาวของหมู่แทนที่สั้นประกอบด้วยคาร์บอน 3-5 อะตอม เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวไทเรท(Polyhydroxybutyrate:PHB)(วรัญญาและผกาวดี, 2553) มีลักษณะโครงสร้าง ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างไฮดรอกซีบิวทิเรต
ที่มา: Turesin et al (2543)

ความยาวของหมู่แทนที่ปานกลางประกอบด้วยคาร์บอน 6-14 อะตอม และความยาวของหมู่แทนที่ยาวประกอบด้วยคาร์บอนมากกว่า 14 อะตอมขึ้นไป(Madison และHuisman, 2549) ส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติจะเป็นพวกที่มีความยาวของหมู่แทนที่สั้น โดยเฉพาะ Polyhydroxybutyrate(PHB) จัดเป็น aliphatic polyester ชนิดหนึ่งอยู่ในตระกูลของ Polyhydroxyalkanoates(PHA) ซึ่งจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่ใช้กันทั่วไปมากกว่าพวกที่มีความยาวของหมู่แทนที่ปานกลางซึ่งจะมีความใกล้เคียงกับอิลาสโตเมอร์และยาง (Suriyamongkolและคณะ, 2550) ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์และที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำคัญ คือ สามารถย่อยสลายได้ในสภาวะที่เหมาะสมและยังเหมาะสมต่อการขึ้นรูปด้วยความร้อน (thermal forming)

แต่อย่างไรก็ตามการผลิตพลาสติกชีวภาพในปัจจุบันความนิยมในภาคอุตสาหกรรมยังมีไม่มากเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพนั้นมีราคาแพงกว่าพลาสติกสังเคราะห์ทางคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาหาแบคทีเรียที่สามารถผลิต Polyhydroxyalkanoates(PHAs) จากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมโดยนำน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล มาเพาะเลี้ยงเชื้อและนำมาแยกหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตและเก็บสะสม PHAsไว้ภายในเซลล์นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณน้ำเสียลดปัญหามลพิษและเป็นแนวทางในการนำน้ำเสียมาใช้ประโยชน์ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกหาแบคทีเรียที่ผลิต Polyhydroxyalkanoates(PHAs) จากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม
2. เพื่อศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการผลิต Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. น้ำเสียที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำเสียที่เก็บจากบ่อบำบัด ซึ่งได้แก่
-น้ำก่อนบำบัด
-น้ำหลังบำบัด
2. ประเภทที่อาหารที่ทำการศึกษา คือ อาหาร LB Agar และ NA Agar
3. ศึกษาพารามิเตอร์พื้นฐานทางสิ่งแวดล้อม คือ วิเคราะห์น้ำเสีย
4. ระยะเวลาที่ศึกษา 3 เดือน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของงานวิจัย

1. ทราบความต้องการสารอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิต Polyhydroxyalkanoates (PHAs)
2. สามารถนำน้ำเสียมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

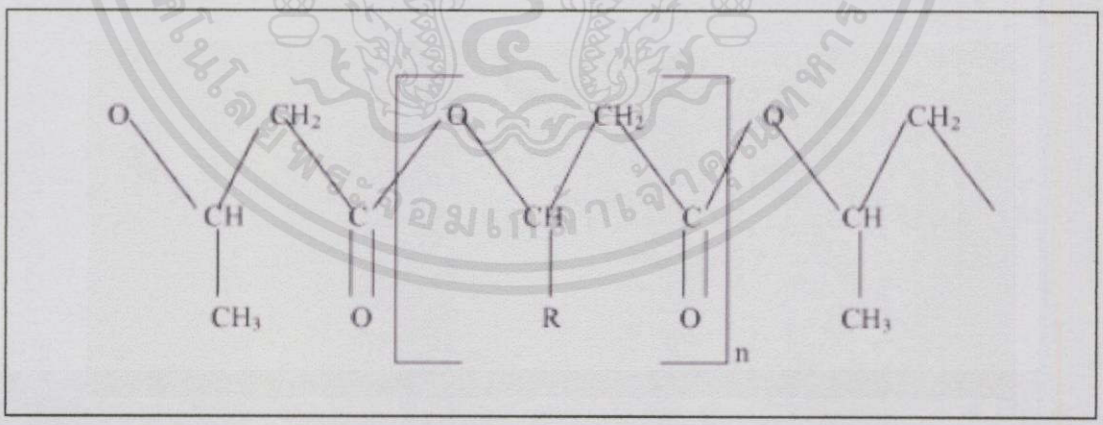
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 พอลีไฮดรอกซิลแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates,PHAs)

Polyhydroxyalkanoates(PHAs) เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูลลักษณะของ PHAs นั้นประกอบไปด้วย โมโนเมอร์ของ3-hydroxy acid (HA) เช่น Poly-3-hydroxybutyric acid(PHB) พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้น เพื่อเป็นพลังงานสำรองสำหรับแบคทีเรียและยังพบว่าสาร Has มากกว่า 80 ชนิดเป็นสารประกอบ PHAs ซึ่งสารเทอร์โมพลาสติกเหล่านี้มีคุณสมบัติเชิงกลต่างๆขึ้นอยู่กับการรวมตัวของหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ (Lee,1996;Doi,1990)

PHAs จัดเป็นเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) ชนิดหนึ่งที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (non-toxic) สามารถนำมาใช้ทางชีวภาพ (biocompatible) และสามารถย่อยสลายได้ (biodegadable) ซึ่งผลิตได้จากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน (renewable resources) มี degree of polymerization สูงกว่ากล่าวคือ สามารถตกผลึกได้ดีโปร่งแสงและไม่สามารถละลายน้ำได้จากลักษณะดังกล่าวทำให้ PHAs มีลักษณะคล้ายกับพอลิโพรพิลีน (polypropylene) ซึ่งเป็นพลาสติกที่สังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการทางปิโตรเคมี



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

ที่มา: Khanna และ Sivastava(2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 การสังเคราะห์ PHAs ภายในเซลล์จุลินทรีย์

การผลิต PHAs จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์มีความเครียด คือ มีการจำกัดสารอาหารจำพวกไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส ในขณะที่ยังคงมีปริมาณคาร์บอนอยู่ในสภาวะนี้เซลล์จะเกิดการสะสม PHAs (PHAs accumulation phase) เซลล์จะไม่มีการเจริญเติบโต หรือแบ่งตัวแต่กระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ยังคงมีต่อไป เพื่อการสร้างไฮดรอกซีแอลคาโนเอต(hydroxylkyl-CoA,HA-CoA) เปรียบเสมือน precursor ในการสร้างมอนอเมอร์และสร้าง PHAs polyester ด้วยเอนไซม์ PHAs polyester PHAs เป็นสารที่ไม่สามารถละลายน้ำได้การสังเคราะห์ PHAs จะเริ่มเป็นจากการเป็นอสัณฐานแล้วค่อยๆก่อตัวเป็นทรงกลมจนเต็มอยู่ภายในแกรนูลของเซลล์และเมื่อมีการสะสม PHAs เป็นจำนวนมากเซลล์จะขยายขนาดเซลล์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ตัวอย่างเช่น Ralstoniaeutropha จะมีปริมาณ PHAsในแกรนูลทั้งหมด 10 แกรนูล(Ballard และคณะ,1987) และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ500 นาโนเมตรเมื่อเซลล์ตาย

2.1.2 การจำแนกประเภทของ PHAs

PHAs สามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อของโมโนเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือ

-โฮโมพอลิเมอร์(Homopolymer)

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน ในกรณีนี้จะยกตัวอย่างของการเชื่อมต่อกันของ R-β-hydroxy fatty acid ชนิด β-hydroxybutyrate ซึ่งมีหมู่เมธิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 มีโมโนเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซิบิวทิเรต โดยมีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์คือพอลิโพรพิลีน

-โคพอลิเมอร์(Copolymer)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อยของโมโนเมอร์หลายชนิดมาต่อกันรวมกันในกรณีของโคพอลิเมอร์ของสารพอลิไฮดรอกซิบิวทีเรตโควารีเรตนอกจากโมโนเมอร์ β-hydroxybutyrate แล้วจะมีการเชื่อมต่อกับโมโนเมอร์ของไฮดรอกซีวารีเรตทำให้เกิดเป็นโคพอลิเมอร์P(3HB-3HV) หรือเรียกว่า poly(3- hydroxybutyrate-copolymer-3-hydroxyvalerate)

2.2 พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต(Polyhydroxybutyrate,PHB)

PHB จัดเป็นสารในกลุ่มของ PHAs ถูกค้นพบโดย Maurice Lemoigne เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1926 ณ สถาบันปาสเตอร์ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส โดย PHB ที่ค้นพบถูกสกัดออกจากเซลล์ของ *Bacillus megaterium* (Luengoและคณะ,2003) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตสายพอลิเมอร์ของกรดไขมันที่มีชื่อว่าบีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต ซึ่งเป็นการสะสมสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์การสะสมพอลิเมอร์ชนิดนี้สามารถเกิดได้ในแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PHB สามารถสังเคราะห์ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมือนกับพอลิโพลีน หรือพอลิเอทิลีน ยังสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถนำมาผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมในจำนวนมากได้ เนื่องจากราคาสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์ (Khanna and Srivastava,2005)

คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ PHB พบว่ามีความเหมือนกับพอลิโพรพิลีนแต่มีความเปราะกว่าโดย PHB สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้ (Jogdand,2004)

1. ใช้เป็นตัวห่อหุ้มยาที่ย่อยสลายได้เพื่อค่อยๆปลดปล่อยยาที่บรรจุอยู่ภายในออกมาอย่างช้าๆ

2. ใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชหรือใช้เป็นปุ๋ย

3. อุปกรณ์ที่ใช้เพียงครั้งเดียว ตัวอย่างเช่น มีดโกน เครื่องใช้ในครัวเรือน ผ้าอ้อม ขวด แชมพูกล่องบรรจุเครื่องสำอาง ถ้วยพลาสติก เป็นต้น

4. ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารพวก chiral compound

5. การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

2.2.1 คุณสมบัติโดยทั่วไปของ PHB สามารถสรุปได้ดังนี้ (Jogdand,2004)

1. ไม่ละลายน้ำและสามารถต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไรซีส ทำให้PHB ต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น

2. สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตราไวโอเลตและออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ

3. สามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ

4. มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต(Biocompatible)

5. มีจุดหลอมเหลว175 องศาเซลเซียสมีอุณหภูมิทรานซิสชัน15 องศาเซลเซียสและมีความทนแรงดึง15 MPa

6. PHB จมน้ำ ในขณะที่พอลิโพพิลีนลอยตัวแต่การจมตัวของPHB ก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศในการตกตะกอนและไม่มีความเป็นพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของPP เปรียบเทียบกับPHB

ที่มา: Jogdand (2004)

พารามิเตอร์	PP(Polypropylene)	PHB
Melting point Tm (องศาเซลเซียส)	171-186	171-182
Glass Transition Temperature Tg (องศาเซลเซียส)	-15	5-10
Crystallinity(%)	65-70	65-80
Density (g cm-3)	0.905-0.94	1.23-1.25
Molecular weight Mw(x10-5)	2.2-7	1-8
Molecular weight distribution	5-12	2.2-3
Flexural modulus (GPa)	1.7	3.5-4
Extension to break (%)	400	6-8
UV resistance	Pour	Good
Solvent resistance	Good	Pour
Oxygen permeability (cm-3 m-2 atm-1 d-1)	1700	45
Biodegradability	-	good
US Annual production (M.tones)	1.8	not determind
Tensile modulus (MPa)	39	40
Other	Due to low density floats in aquatic system	Due to more density goes to the sediment in aquatic system.

2.2.2 ความสำคัญของ PHB ต่อเชื้อจุลินทรีย์

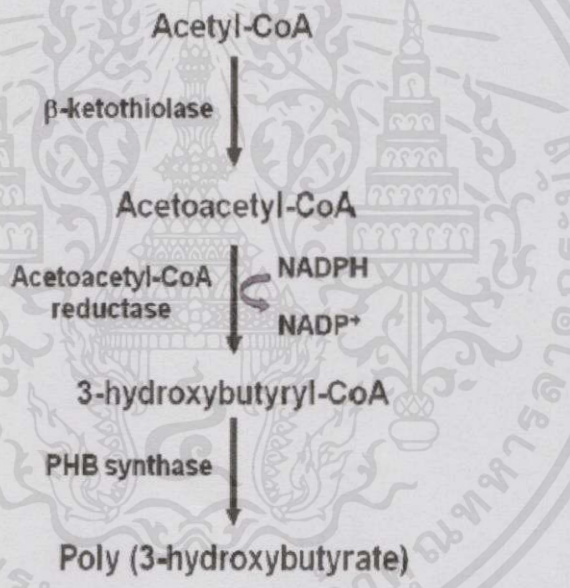
การสะสม PHB เกิดขึ้นภายในแกรนูลของเซลล์เสมือนเป็นแหล่งพลังงานสำรอง โดยการสะสมนี้จะเกิดขึ้นเมื่อเกิดสภาวะการจำกัดสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือ ออกซิเจน เป็นต้นในขณะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ

2.2.3 กลไกการสังเคราะห์PHB

โดยทั่วไปแล้ว พบว่ากระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นในอัตราสูงเมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตสูงสุด(Poirier และคณะ,1995) และภายใต้สภาวะที่อาหารไม่สมดุล คือ มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีปัจจัยบางชนิดจำกัด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ เป็นต้น(Anderson และDawes,1990;Poirier และคณะ ,1995;Wu และคณะ,2001;Reddy และคณะ,2003)โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ฟรุกโตส หรือกากน้ำตาล เป็นต้น ให้เป็นอะซิติลโคเอ(acetyl-CoA) ถ้าจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่อาหารสมดุลกัน อะซิติลโคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานและชีวมวลแต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่อาหารไม่สมดุลกันและปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ อะซิติลโคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นPHB ซึ่งการสังเคราะห์ PHB ต้องอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์เบต้า-คีโตไทโอเลส ทำหน้าที่เปลี่ยนอะซิติลโคเอ 2 โมเลกุล ให้กลายเป็นอะเซโตอะซิติลโคเอ จากนั้นเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสจะเปลี่ยนอะซิโตอะซิติลโคเอไปเป็นไฮดรอกซิลโคเอโดยมี NADPH เป็นโคเฟกเตอร์(cofector) และขั้นสุดท้ายเอนไซม์ซินเทส(syntase) เร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะระหว่างหมู่ไฮดรอกซี(hydroxyl group) ของไฮดรอกซิลโคเอโมเลกุลหนึ่งกับปลายด้านคาร์บอกซิลของไฮดรอกซีโคเออีกโมเลกุลหนึ่งทำให้สายพอลิเมอร์ยาวขึ้นเรื่อยๆ(Aldor,2003)(รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.2 วิธีการสังเคราะห์โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต
ที่มา: (Jo *et al.*,2006)

2.2.4 การผลิต PHB โดยเชื้อจุลินทรีย์

แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อการผลิต PHB ได้แก่ กลูโคสซูโครส และฟรุกโตส เป็นต้น ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอนเหล่านี้มีต้นทุนการผลิตสูง เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมี ทำให้ปัจจุบันยังไม่มีการนำพลาสติกชนิดนี้มาใช้กันอย่างแพร่หลาย แนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว คือ การใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูกลง เช่น by product ได้แก่ หางนม(Whey) กากน้ำตาล(Molasses) กลีเซอรอล(Glycerol) น้ำแป้ง(Starch) หรือคาร์บอนไดออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(CO_2) เป็นต้น (Reddy et al.,2003) การผลิต PHB ให้ได้ปริมาณมากขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ชนิดของจุลินทรีย์สารตั้งต้น (แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น โดยปัจจัยต่างๆเหล่านี้มีผลต่อชนิดของ PHAs ที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้นอีกด้วย ตัวอย่างของการผลิต PHB จากจุลินทรีย์ต่างๆรวมถึงแหล่งคาร์บอนและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

2.2.5 แหล่งอาหาร

- แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการผลิต PHAs กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHAs จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดและภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือ เมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีการจำกัดปัจจัยบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาถึงชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงจะทำให้การผลิตเกิดขึ้นได้ดี นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถผลิต PHAs ได้จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1.1

ตารางที่ 2.2 เชื้อจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHAs
ที่มา: ดัดแปลงจาก Khanna และ Srivastava (2004)

เชื้อจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน
Alcaligenes eutrophus	glucose, fructose, acetic acid, propionic acid
Alcaligenes latus	glucose, sucrose, molass, sugar syrup
Anabaena cylindrica 10 c	glucose, acetic acid, propionic acid
Azotobacter chroococcum	starch
Bacillus megaterium	glucose
Methylobacterium sp.	methanol
Protomonas extorquens	methanol, n-amyl alcohol
Pseudomonas cepacia	lactose, xylose
Pseudomonas oleovorans	medium-chain-length (MCL)-alkane, alkanols, alkanoate
Recombinant *Escherichai coli*	whey
Rhizobium meliloti	sucrose
Rhodococcus ruber	glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนเคซีนเปบโตน ยีสต์สกัด และ Corn-steep liquor รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ การเติมเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) ต่างๆ สำหรับการผลิตสาร PHB พบว่าจะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัด คือ อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับไนโตรเจนมีค่าสูง

- อาหารเสริมเกลือแร่

การสะสม PHB จะเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ภายในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล โดยมีปัจจัยบางชนิดจำกัด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือ ซัลเฟอร์ ซึ่งพบว่า ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และ ซัลเฟอร์ นั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลัก(major element)จุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเหล่านี้ในปริมาณมากพอสมควร โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมซึ่งจำเป็นมาก เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ ดังนั้นในการสังเคราะห์พอลิเมอร์จะมีการจำกัดปริมาณแร่ธาตุหลักเหล่านี้ ซึ่งมีผลให้เกิดการสะสมแหล่งคาร์บอน และพลังงานอยู่ในเซลล์ในรูปพอลิเมอร์

- ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB เนื่องจากในสภาวะออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทส และไอโซซีเตรทดีไฮโดรจีเนส จะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิทิลเอนไซม์เอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอเพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส จึงมีการสะสม PHB จะทำหน้าที่เป็นแอ่งเก็บสารที่มีอนุภาครีดิวซิ่ง (Reducing power) หรือเป็นหน่วยควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox regular) ภายในเซลล์ (Luengo*et al.*,2003)

- พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHB พบว่าเมื่อต้องการผลิต PHB ควรทำการควบคุมพีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไปเมื่อสิ้นสุดการเจริญ

- อุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHB ในช่วง 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ และการผลิต PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Narain (2013) ได้ทำการศึกษาโดยมีจุดมุ่งหมายที่จะใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษแข็งในการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิต PHAs และการตรวจคัดกรองของแบคทีเรียที่สะสมและผลิต PHB ผลจากการศึกษาพบว่าน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและกระดาษแข็งสามารถแยกได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลต จากการทดลองย้อมด้วย Sudan black B แสดงให้เห็นสีฟ้าเข้ม หลังจากนั้นได้นำไปคัดกรองด้วยการย้อมสีของ Nile Blue A อีกครั้งซึ่งมีคุณสมบัติย้อม PHAs ที่สามารถละลายในไขมัน พบว่า มีแบคทีเรียที่แสดงผลบวกและติดสีของ Nile Blue A รวมเป็น 15 สายพันธุ์ เมื่อทำการแยกจะได้แบคทีเรียสายพันธ์ NAP11 และ NACl แสดงให้เห็นการผลิต PHA สูงสุด 79.27% และ 77.63% ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นของโพลิเมอร์ 5.236 กรัม/ลิตร และ 4.042 กรัม/ลิตร จากการศึกษาน้ำเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมดสองไอโซเลทที่มีการผลิต PHA ได้มากที่สุด คือ NAP11 และ NAC1

PoZo*et al.*,(2002) ได้ทำการศึกษาสภาวะของอาหารที่ส่งผลต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Azotobacterchroococcum* H23 ที่สามารถผลิต PHAs ได้ เนื่องมาจากจำนวนส่วนใหญ่ของ Homopolymer จะบรรจุ PHA และ Copolymers จะบรรจุ (P(HB-co-HV)) ถูกสร้างโดย *Azotobacterchroococcum* H23 การเพาะเลี้ยงจะใช้ตัวกลางที่ถูกปรับปรุงให้ดีขึ้นกับ alpechin เป็นบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก Copolymer ถูกสร้างขึ้น เมื่อ valerate(pentonoate) ถูกเติมให้อาหาร alpechin เป็นอันดับแรกแต่ไม่ได้ถูกสร้างมาเพื่อมาเติมให้กับ pentonoate โดย 80% จากการศึกษาครั้งนี้ที่ได้เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อทำการเพิ่ม NH_4^+ ลงไปในอาหารทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 60% โดยน้ำหนักจากการศึกษาครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่าเมื่อใช้ alpechin เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเพาะเชื้อสายพันธ์ *Azotobacterchroococcum* H23 ทำให้มีการผลิต PHAs มีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่ถ้าจะใช้จุลินทรีย์เหล่านี้เป็นวัสดุในการผลิตพลาสติกจากไบโอพลาสติกใช้ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูงกว่าวัตถุดิบอื่นๆ

Anderson และDawes (1990) พบว่า PHB ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะเกิดการย่อยสลายอย่างช้าๆ ของส่วนประกอบภายในเซลล์ เช่น RNA และโปรตีน ในระหว่างที่เกิดสภาวะอดอาหารอย่างเสมอๆ แต่ข้อเท็จจริงดังกล่าวยังไม่เป็นที่แพร่หลาย โดยทั่วไป PHB ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีอัตราการรอดเพิ่มขึ้นได้แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธ์นอกจากนี้ PHB ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการสร้างสปอร์ใน *Bacillus sp.* ได้อีกด้วย

Steinbuchel(1991) PHAs ถูกสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งการสะสม PHB นี้ทำให้เกิดผลดีในการเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเซลล์จุลินทรีย์และยังส่งผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Byrom(1992)การผลิต PHAs ในระดับอุตสาหกรรมเลือกใช้ *Ralstonia spp.* เนื่องจากการสกัด PHAs ออกจากเซลล์จุลินทรีย์นี้ทำได้ง่ายและ PHAs ที่ได้ยังมีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงอีกด้วย นอกจาก *Azotobacter* และ*Methyltrophs* ยังสามารถนำมาใช้ผลิตPHAsได้ แต่เชื้อจุลินทรีย์จำพวก *Methyltrophs* ผลิต PHAs ได้ปริมาณน้อยน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสกัด PHAs ออกจากเซลล์ได้ยาก ส่วน *Azotobactor* ไม่เป็นที่สนใจมากนัก เพราะแบคทีเรียนี้จะเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนให้เป็นสารประเภทพอลิแซคคาร์ไรด์ มากกว่า นำไปผลิต PHAs จากการศึกษาพบว่า *R.eutropha* สามารถผลิต PHAsได้ 70-80 % ภายใต้สภาวะที่มีขีดจำกัดฟอสเฟต การผลิต PHAsให้ได้ดีจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงที่เอื้อต่อการสร้าง PHAs ของแบคทีเรียให้ได้ตามความเข้มข้นสูง ในขณะที่สารตั้งต้นนั้นราคาไม่แพง

Lee (1996)กล่าวว่า อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์และอัตราผลิตพอลิเมอร์นั้นมีปัจจัยหลายประการที่เป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นผลิต PHAs ได้

RawteและMavinkurvew(1998)ได้ทดลองคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHB จากต้นโกงกางแถบ Mandovi estuarine ecosystem เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Tributyrin agar เพื่อการผลิต PHB ที่มีส่วนผสมของการเรืองแสง Nile blue A พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 65 สายพันธ์เจริญเติบโตบนอาหารนี้ได้และมี 60 สายพันธุ์ที่มีการเรืองแสง

Hezayenและคณะ(2000)ได้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินแถบชายฝั่งในประเทศอียิปต์พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถผลิต PHB ได้มากถึง 53% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะจำกัดไนโตรเจนเพื่อการผลิต PHB พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เหมือนกับ *Azotobacter* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ PHB เฉลี่ยอยู่ในช่วง 25-47% ของน้ำหนักเซลล์แห้งจากการทดลองดังกล่าว พบว่า *Azotobacterchroococcum* มีประสิทธิภาพในการสะสม PHB ถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียนี้ในสภาวะที่เหมาะสม

Lee และ Yu (1997)ได้ศึกษาการผลิต PHA จากตะกอนสลัดจ์ชุมชนในระบบสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรก เป็นการย่อยสลายตะกอนสลัดจ์แบบไร้อากาศ และนำส่วนของเหลวที่ผ่านจากขั้นตอนแรกมาเลี้ยงเชื้อ *A.eutrophus* เพื่อผลิต PHA ในถังหมักที่มีการกวน 50 rpm และให้อากาศ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการควบคุม pH และมีการควบคุมปริมาณไนโตรเจน ผลการทดลอง พบว่า หลังจากการเลี้ยง *A.eutrophus* สามารถลดปริมาณกรดส่วนของเหลวที่ผ่านจากขั้นตอนแรกและเป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนที่สองได้ดังนี้ คือ กรดอะซิติกลดลงร้อยละ 87.6 กรดโพรพิโอนิกลดลงร้อยละ 62.6 กรดบิวทิริกลดลงร้อยละ 56.8 และกรดวาเลอริกลดลงร้อยละ 32 สามารถผลิต PHA ได้ 0.61 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 34 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 แหล่งน้ำ

น้ำตัวอย่างจากบ่อน้ำเสียโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปคโตรมิเตอร์(Atomic Absorption Spectromrter) ยี่ห้อ Shimudzu รุ่น AA-680 บริษัท Shimudzu ประเทศ ญี่ปุ่น
2. ชุดย่อยสลายเจดาห์ล
3. ชุดย่อยสลาย (High Performance microwave digestion unit)
4. ชุดกลั่นเจดาห์ลยี่ห้อ Buchi รุ่น B-232
5. ชุดกรองสุญญากาศ
6. เครื่องวัดออกซิเจนละลายในน้ำยี่ห้อ YSI
7. เครื่องวัดความขุ่น
8. เครื่องวัดpH ยี่ห้อ Metromh รุ่น 713
9. เครื่องกวนแม่เหล็ก
10. เครื่อง Auto clave
11. กรวยแยก (Separator Funnel)
12. ขวดบีโอดีพร้อมจุกปิดสนิท
13. จานเพาะเชื้อ
14. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Olympus BX51 บริษัท BIOIMAGER ประเทศ แคนาดา

3.3 สารเคมี

1. อาหารสำเร็จรูปLB Both
2. Glucose
3. Beef extract
4. Peptone
5. Sodium Chloride
6. Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การดำเนินการ

3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมน้ำตัวอย่าง

ปิเปตน้ำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 900 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 วินาที ปิเปตน้ำตัวอย่างจากหลอดที่ 1 มา 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวหลอดที่ 2 ที่มีน้ำเกลือเขย่าด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ทำเช่นนี้จนได้ค่าการเจือจางที่10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8}

3.4.2 ขั้นตอนในการบ่มเชื้อ

นำตัวอย่างน้ำมา 1 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนจานอาหารที่เตรียมไว้ในอาหารทั้ง 2 ประเภท หลังจากนั้นให้นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตPHAs

นำเชื้อที่ผ่านการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาย้อมด้วย Sudan Black B (เตรียมมาจาก0.02 g ละลายในเอทิลแอลกอฮอร์100 เปอร์เซ็น) (RavinNarain,2013) เทราดลงบนจานเพาะเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอร์ 100 เปอร์เซ็นต์ ช้าๆ โคโลนีที่ผลิต PHAs จะแสดงให้เห็นสีดำของ Sudan Black B

3.4.4 การคัดแยก(Screening) เชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกมาเกลี่ยลงบนอาหารนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการบ่มเรียบร้อยแล้วนำมาย้อมด้วย Nile Blue A (เตรียมมาจาก Nile Blue A 2.5 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 5 มิลลิลิตร) (Ravin Narain,2013) เทราดลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำมาส่องกับฟลูออเรสเซนต์โคโลนีที่ผลิต PHAs จะเห็นเป็นสีส้มสว่างเพิ่มตามความเข้มของแสง

3.4.5 การศึกษาคุณภาพน้ำเสีย

น้ำตัวอย่างที่ใช้ในการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHB จะมีการวิเคราะห์หาค่าพีเอช ปริมาณน้ำมันและไขมัน ค่าบีโอดี (BOD) ค่าซีโอดี(COD) ค่าออกซิเจนที่สามารถละลายน้ำได้(DO) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด(TKN) ปริมาณซัลเฟตทั้งหมด ปริมาณฟอสเฟตทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 วิธีวิเคราะห์พารามิเตอร์น้ำเสีย

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
ค่าพีเอช	pH meter
ปริมาณน้ำมันและไขมัน	Partition Gravimeter method
ค่าบีโอดี	Electrode method
ค่าซีโอดี	Closed Reflux, Tritratemetric method
ค่าออกซิเจนที่สามารถละลายน้ำได้หมด	Azids Modification Of the iodometric
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	Kjedahl method
ปริมาณซัลเฟตทั้งหมด	Turbidity meter
ปริมาณฟอสเฟตทั้งหมด	Vanado-molybdic acid method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเสีย

ในการทดลอง ทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆของน้ำซึ่งจากการวิเคราะห์ พบว่าน้ำเสียได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 พารามิเตอร์ต่างๆของน้ำเสียก่อนและหลังบำบัด

พารามิเตอร์	น้ำเสียก่อนบำบัด	น้ำเสียหลังบำบัด
pH	8-9	7-8
อุณหภูมิ (°C)	30-31	34-35
COD (mg/L)	995-1,105	85-92
BOD (mg/L)		
- เจือจาง 2%	1.2-1.5	1.9-2.3
- เจือจาง 5%	2.2-2.6	0.9-1.2
- เจือจาง 10%	1.0-1.3	0.4-0.6
ไนโตรเจน(TKN) (mg/L)	387.8-389.4	42.8-43.0
น้ำมันและไขมัน (mg/L)	0.0479-0.0588	0.0206-0.0386
ฟอสฟอรัสและฟอสเฟต (mg/L)	25.635-25.723	5.314-5.425

4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs

จากการศึกษาลักษณะการเจริญ และการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย โดยการนำน้ำเสียก่อนและหลังบำบัด มาเจือจางให้ได้ 10^{-1} ถึง10^{-8} เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar (Luria-Bertani Medium)และ NA (Nutrient Agar)ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีเดี่ยว(CFU/ml) ในแต่ละเพลท ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2 โดยจากการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแบคทีเรียจากน้ำเสียก่อนบำบัดที่ความเจือจาง10^{-1} ถึง10^{-4} มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด หนาแน่นมาก จนไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีเดี่ยวได้ แต่เมื่อความเจือจางของน้ำเสียมากขึ้น เชื้อมีการเจริญที่กระจายตัวจึงสามารถนับจำนวนโคโลนีได้ดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 จำนวนโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียจากน้ำเสียบนอาหาร LB Agar และ NA

อาหารเลี้ยงเชื้อ/ แหล่งน้ำเสีย	จำนวนโคโลนีเดี่ยว(CFU/ml)							
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
อาหาร LB Agar 1. ก่อนบำบัด	not count	not count	not count	not count	$1.9x10^{7}$	$2.1x10^{8}$	$2.9x10^{9}$	$3.5x10^{10}$
2. หลังบำบัด	$2.7x10^{3}$	$1.8x10^{4}$	$1.0x10^{4}$	$4.0x10^{5}$	0	0	0	0
อาหารNA 1. ก่อนบำบัด	not count	not count	not count	not count	$8.0x10^{6}$	$7.0x10^{7}$	$8.0x10^{8}$	0
2. หลังบำบัด	$3.7x10^{3}$	$1.9x10^{4}$	$4.0x10^{4}$	0	0	0	0	0

การนับจำนวนแบคทีเรียในหน่วย Colony/ml (CFU/ml)

ตัวอย่าง จำนวนโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar จากน้ำเสียก่อนบำบัด

จำนวนโคโลนีเดี่ยว X Dilution Factor

19×10^{5} = 1.9×10^{6}

ดังนั้น 0.1 ml ได้แบคทีเรีย = 1.9×10^{6} โคโลนี

ถ้า 1 ml ได้แบคทีเรีย = $1.9 \times 10^{6} / 0.1$ CFU/ml

= 1.9×10^{7} CFU/ml

และเมื่อทำการย้อมสี Sudan Black B กับเพลทที่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยการเลือกนับโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีน้ำเงินเข้มจนถึงสีดำของสี Sudan Black B ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่าในน้ำเสียหลังบำบัดมีแบคทีเรียที่ผลิต PHAs มากกว่าน้ำเสียก่อนบำบัด ดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 จำนวนโคโลนีเดี่ยวและเปอร์เซ็นต์การติดสี Sudan Black B ของจำนวนโคโลนีเดี่ยวทั้งหมด

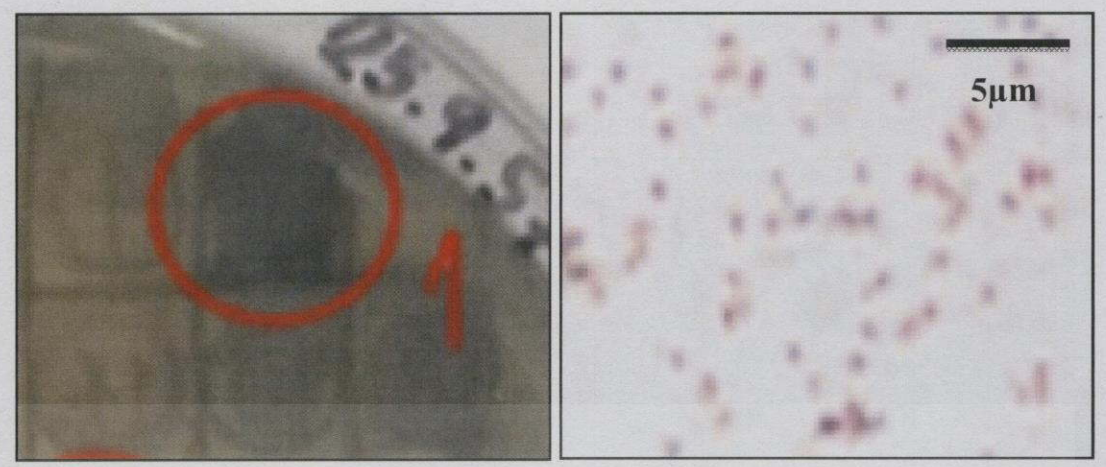
อาหารเลี้ยงเชื้อ/ แหล่งน้ำเสีย	จำนวนโคโลนีเดี่ยวทั้งหมด	จำนวนโคโลนีที่ติดสี Sudan Black B	จำนวนโคโลนีที่ติดสี Sudan Black B (%)
อาหาร LB Agar			
1. น้ำเสียก่อนบำบัด	104	5	4.8
2. น้ำเสียหลังบำบัด	50	5	10.0
อาหาร NA			
1. น้ำเสียก่อนบำบัด	23	0	0.0
2. น้ำเสียหลังบำบัด	60	4	6.7

เมื่อทราบผลการย้อมสี Sudan Black B ครั้งแรก ทำการเขี่ยเชื้อจากเพลท Stock เชื้อที่เขี่ยเก็บไว้ก่อนการย้อม Sudan Black B ครั้งแรก โดยเขี่ยเฉพาะโคโลนีที่ติดสี มา Steak ลงบนอาหารและเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง และทำการย้อม Sudan Black B ยืนยันอีกครั้ง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 เมื่อได้ผลย้อมสี Sudan Black B ยืนยันครั้งที่ 1 แล้วนั้น นำเชื้อโคโลนีที่มีการติดสีเข้มที่สุดจากเพลท stock มาส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1 ถึง รูปที่ 4.13 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ตั้งแต่ 2 เซลล์ขึ้นไป มีกระจายตัวกันอยู่บ้างเล็กน้อย และลักษณะการติดสีของแบคทีเรียจะติดสีน้ำเงินเข้มถึงสีดำของสีย้อม Sudan Black B ในระดับความเข้มแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.4 ยืนยันการติดสีSudan Black B ครั้งที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ / แหล่งน้ำเสีย	หมายเลขโคโลนีที่ติดสี Sudan Black B ระดับเข้มมาก
อาหาร LB	
1. น้ำเสียก่อนบำบัด	LB-In-1 LB-In-13 LB-In-29 LB-In-34 LB-In-47
2. น้ำเสียหลังบำบัด	LB-Ex-2 LB-Ex-3 LB-Ex-4 LB-Ex-16
อาหาร NA	
1. น้ำเสียก่อนบำบัด	0
2. น้ำเสียหลังบำบัด	NA-Ex-16 NA-Ex-19 NA-Ex-23 NA-Ex-34

เอกสารนี้เป็นกรรมสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.1 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-1

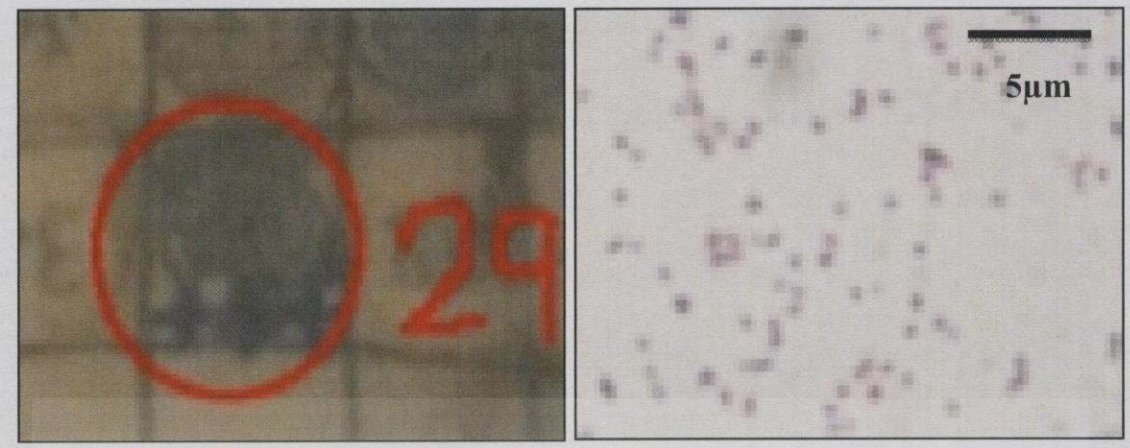
ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-1

ก. ข.

รูปที่ 4.2 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-13

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-13

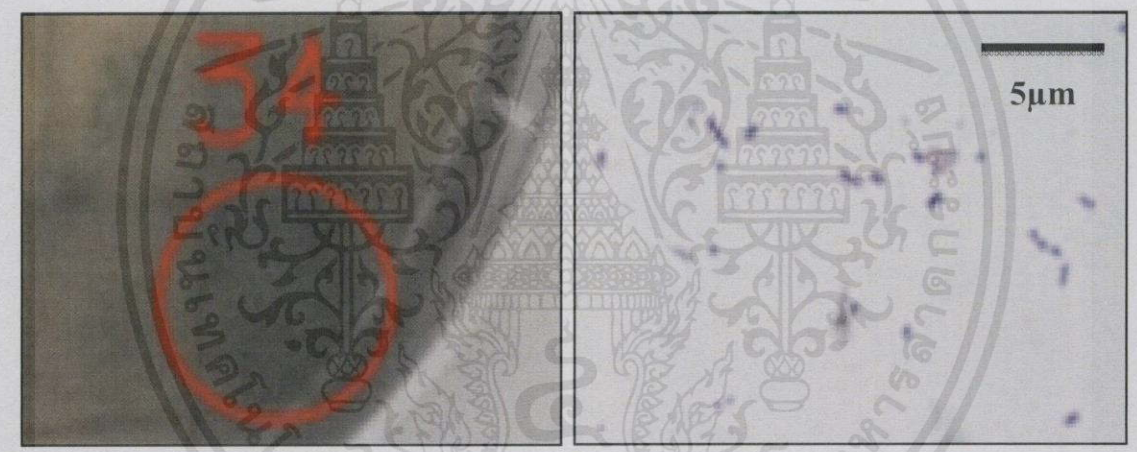
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.3 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-29

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-29

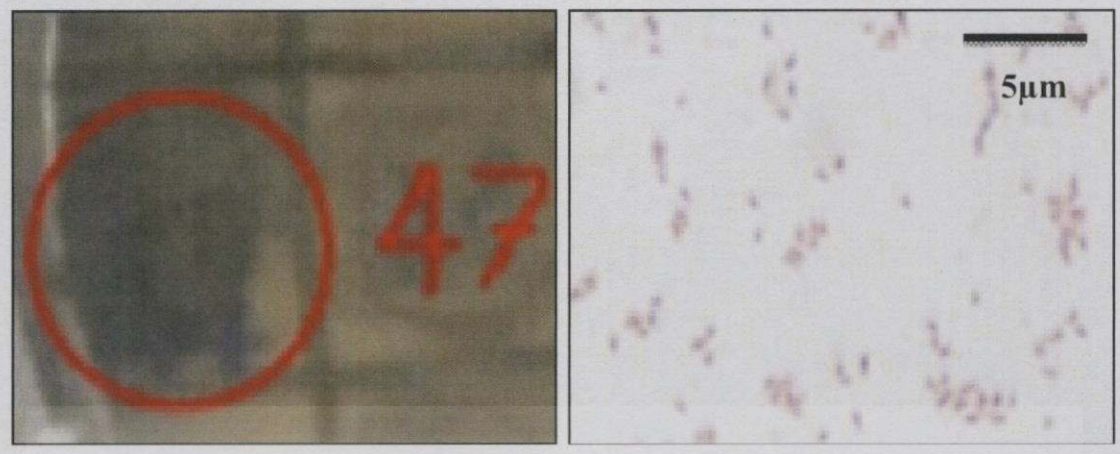


ก. ข.

รูปที่ 4.4 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-34

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-34

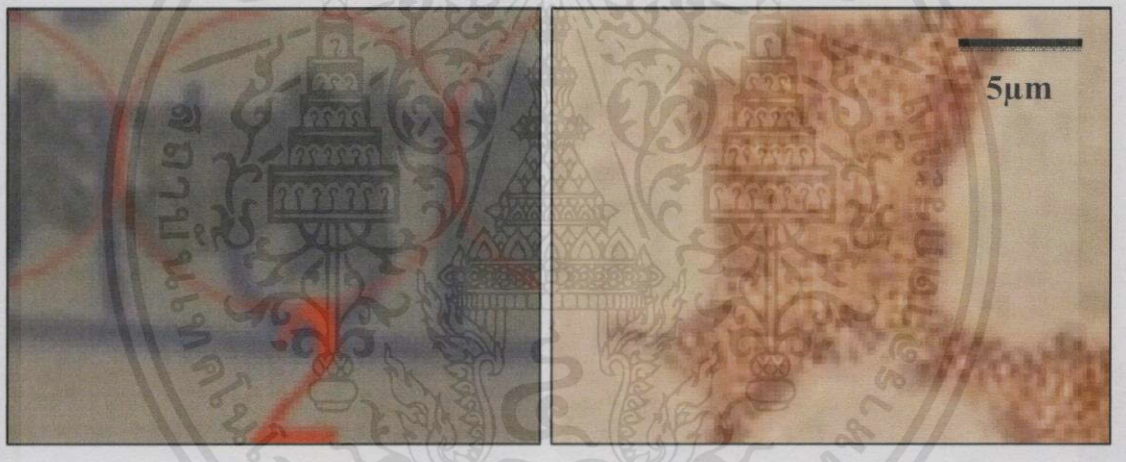
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.5 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-47

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-47



ก. ข.

รูปที่ 4.6 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-2

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ข.

รูปที่ 4.7 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-3

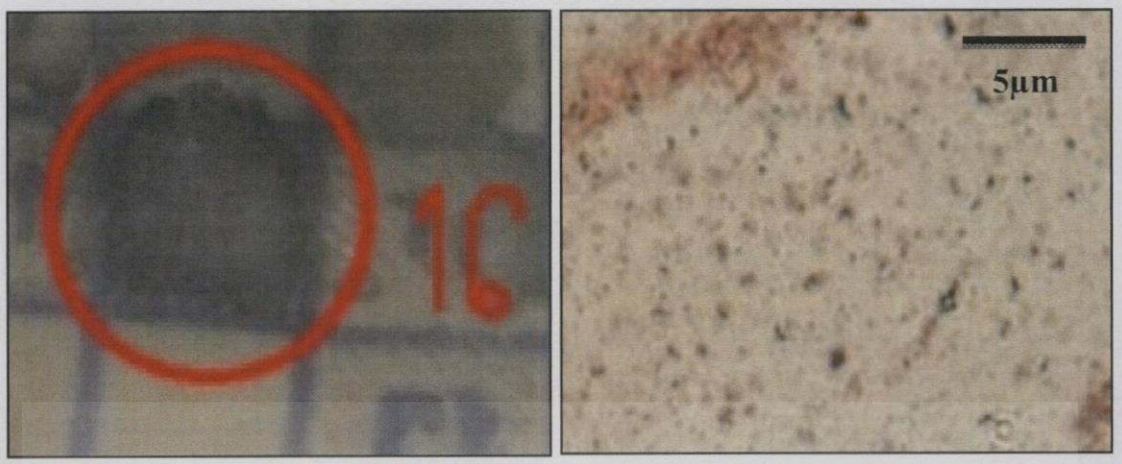
ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-3

ก. ข.

รูปที่ 4.8 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-4

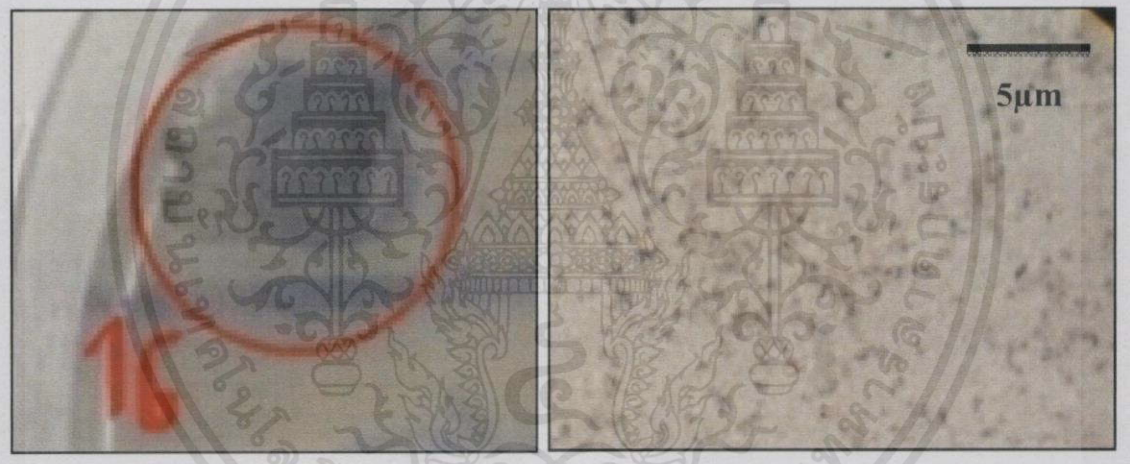
ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

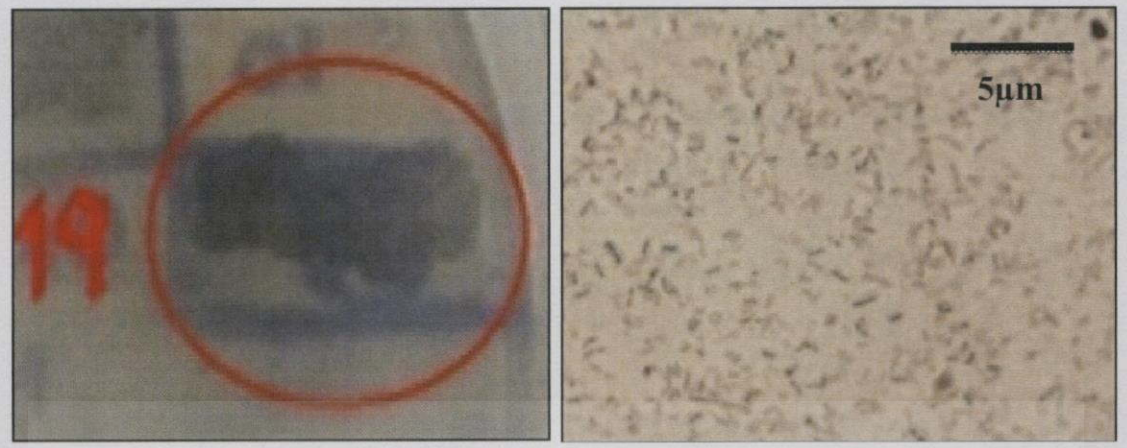
รูปที่ 4.9 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-16
ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-16



ก. ข.

รูปที่ 4.10 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-16
ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.11 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-19

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-19

ก. ข.

รูปที่ 4.12 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-23

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ข.

รูปที่ 4.13 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-34

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-34

เมื่อส่องเชื้อแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นได้ว่าบางโคโลนี เซลล์แบคทีเรียติดสีย้อม Sudan Black B น้อยมาก ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ติดสี Sudan Black B เข้มมากทั้งบนโคโลนีและเซลล์แบคทีเรีย ได้ผลการคัดเลือกดังตารางที่ 4.5 มาย้อมสี Sudan Black B เพื่อยืนยันผลอีกครั้งและทำการส่องเชื้อแบคทีเรียเพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.14 ถึงรูปที่ 4.21ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ลักษณะเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะเช่นเดียวกับการทดลองย้อมสี Sudan Black B ยืนยันในครั้งที่ 1 คือเซลล์ของแบคทีเรียส่วนใหญ่มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก มีทั้งที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และกระจายตัวกันอยู่ ลักษณะการติดสีของเซลล์แบคทีเรียจะติดสีน้ำเงินเข้มถึงสีดำของสีย้อม Sudan Black B เข้มมาก

ตารางที่ 4.5 ยืนยันการติดสี Sudan Black B ครั้งที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ / แหล่งน้ำเสีย	หมายเลขโคโลนีที่ติดสี Sudan Black B ระดับเข้มมาก
อาหาร LB	
1. น้ำเสียก่อนบำบัด	LB-In-1 LB-In-29
2. น้ำเสียหลังบำบัด	LB-Ex-2 LB-Ex-3 LB-Ex-4 LB-Ex-16
อาหาร NA	
1. น้ำเสียก่อนบำบัด	0
2. น้ำเสียหลังบำบัด	NA-Ex-16 LB-Ex-19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ข.

รูปที่ 4.14 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-1

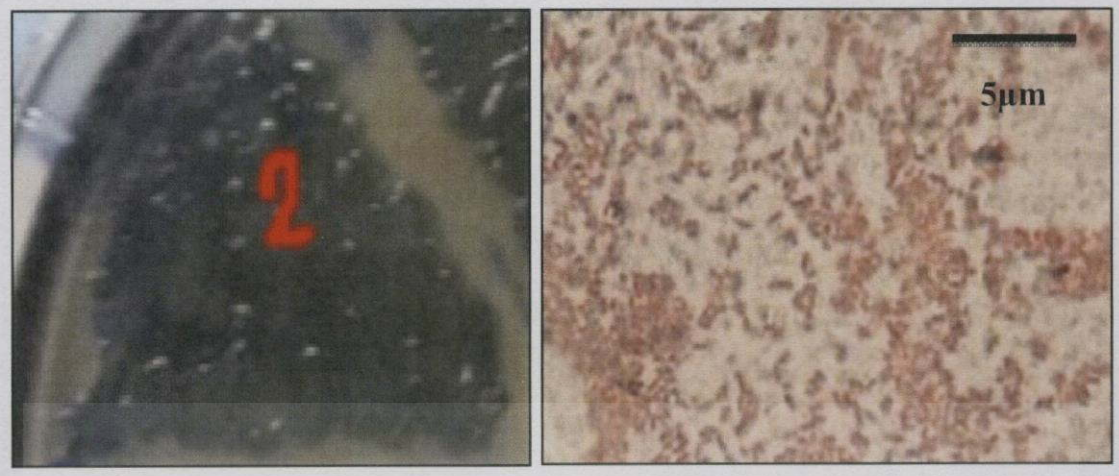
ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-1

ก. ข.

รูปที่ 4.15 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-In-29

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-In-29

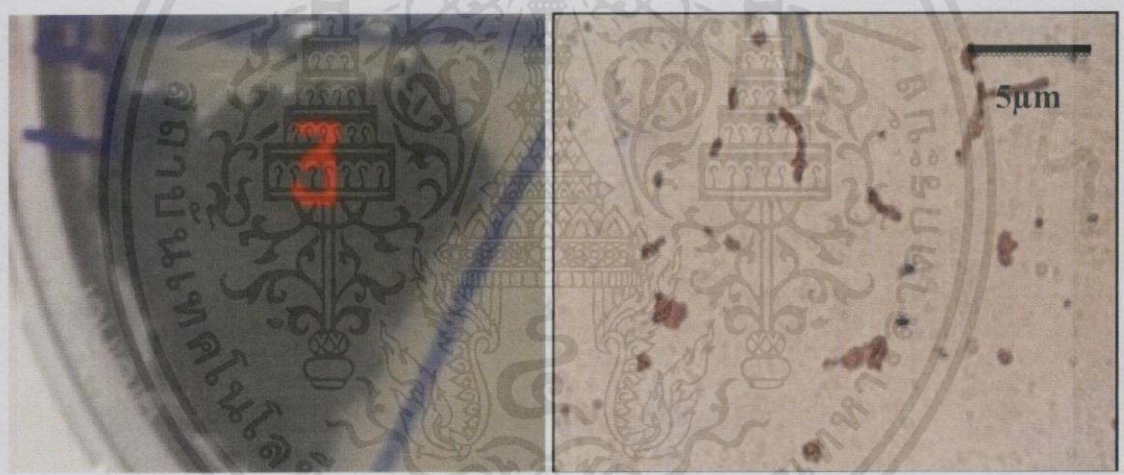
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.16 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-2

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-2

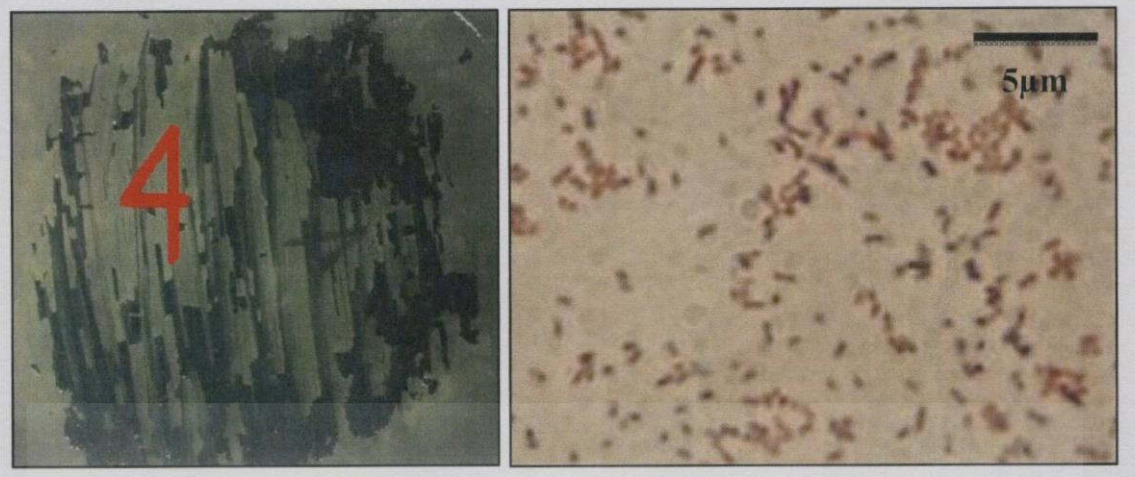


ก. ข.

รูปที่ 4.17 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-3

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.18 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-4

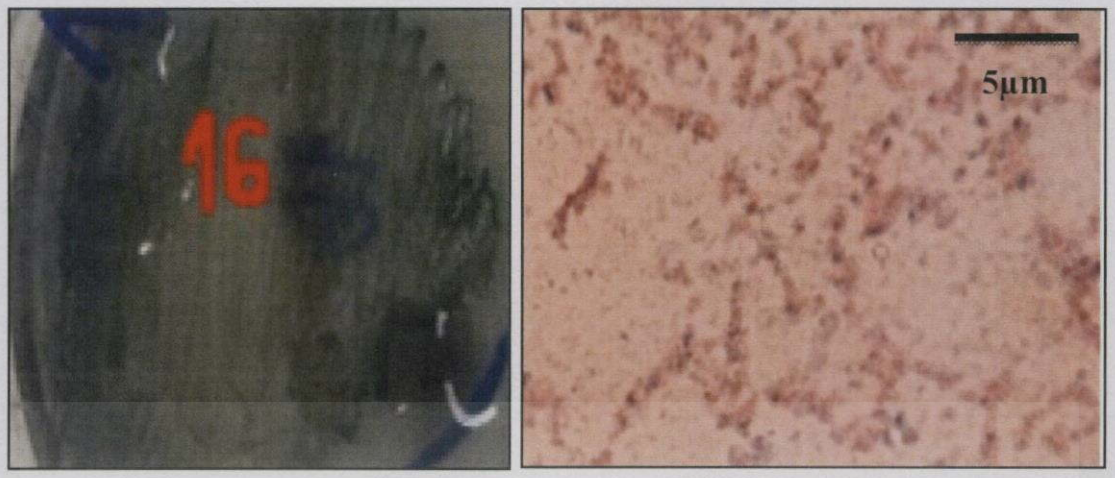
ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-4

ก. ข.

รูปที่ 4.19 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี LB-Ex-16

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 4.20 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-16

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-16

ก. ข.

รูปที่ 4.21 ก.การติดสี Sudan Black B ของโคโลนี NA-Ex-19

ข.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-19

2.3 การคัดแยก(Screening) เชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs

จากผลการย้อมสี Sudan Black B ยืนยันในครั้งที่ 2 และการส่องเชื้อแบคทีเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า จะเห็นแบคทีเรียติดสีน้ำเงินเข้มจนถึงติดสีดำของสีย้อม Sudan Black B เป็นจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อยืนยันผลการผลิต PHAs ของแบคทีเรีย จึงทำการย้อม Nile Blue A และนำไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ซึ่งจะมองเห็นแสงสีส้มสว่าง และมากขึ้น เมื่อความเข้มของแสงเพิ่มขึ้น เทียบกับตัวควบคุมที่ย้อมด้วยสี Sudan Black B ได้ผลการคัดเลือกดังตารางที่ 4.6 และ

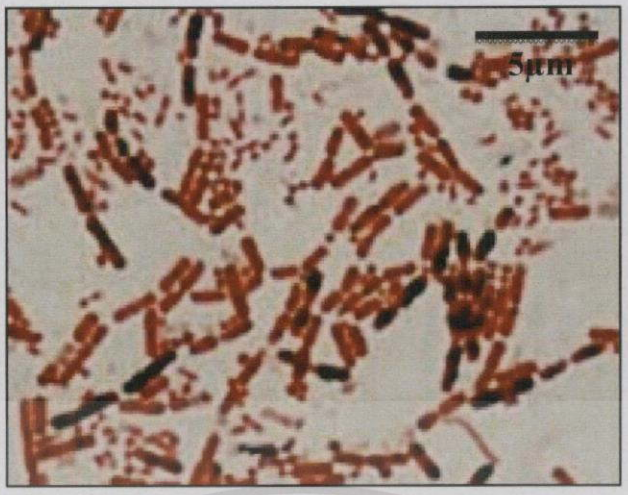
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.22 ถึง รูปที่ 4.25 ซึ่งจากผลการทดลองแบคทีเรียที่ผลิต PHAs จะมองเห็นแสงสีส้มสว่างได้อย่างชัดเจน เช่น โคโลนี LB-Ex-3 จะมองเห็นแสงสีส้มที่ตัวเซลล์แบคทีเรีย เมื่อเทียบกับตัวควบคุม โดยตัวควบคุมโคโลนี LB-Ex-3 มีลักษณะเป็นท่อนยาวต่อกัน ภายในเซลล์ติดสีดำของสีย้อม Sudan Black B ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าแบคทีเรียโคโลนี LB-Ex-3 มีการผลิต PHAs เก็บไว้ภายในเซลล์ เป็นต้น

ตารางที่ 4.6 การคัดเลือกจากการการย้อมสี Nile Blue A และส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์

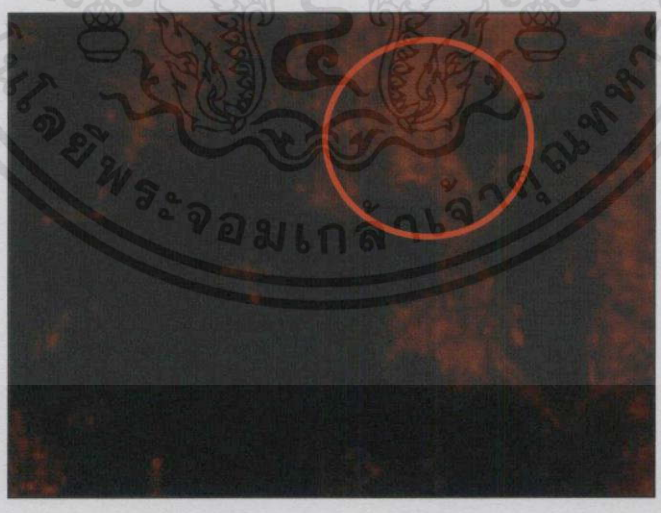
อาหารเลี้ยงเชื้อ / แหล่งน้ำเสีย	หมายเลขโคโลนี
อาหาร LB	
1. น้ำเสียก่อนบำบัด	0
2. น้ำเสียหลังบำบัด	LB-Ex-3 LB-Ex-4
อาหาร NA	
1. น้ำเสียก่อนบำบัด	0
2. น้ำเสียหลังบำบัด	NA-Ex-16 NA-Ex-19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

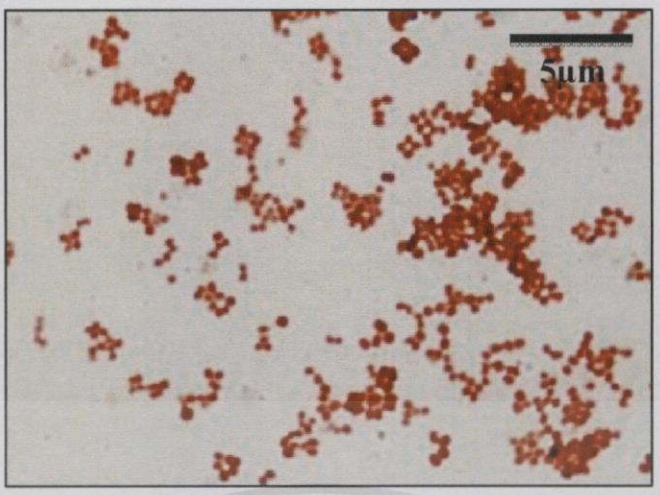
ข.



ค.

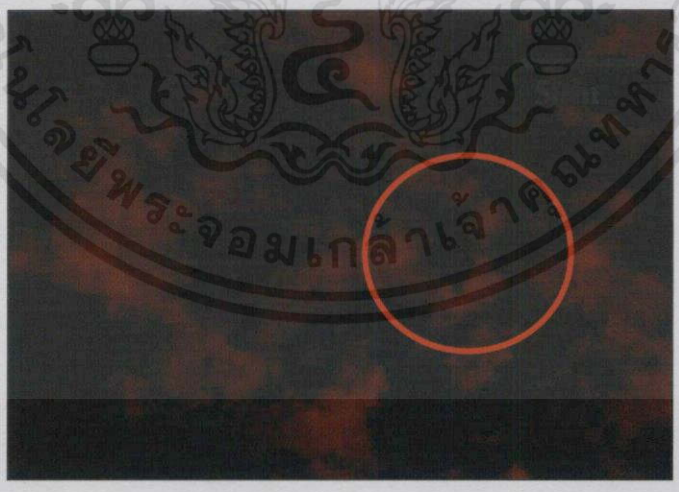
รูปที่ 4.22 ก.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-3
ข.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี LB-Ex-3 (แสงขาว)
ค.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี LB-Ex-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

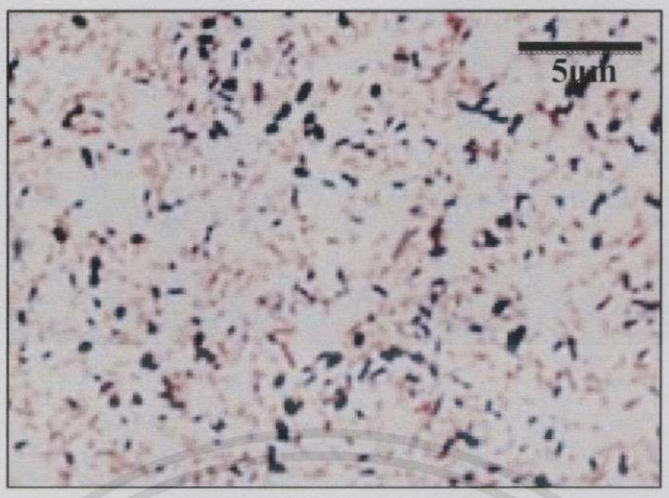
ข.



ค.

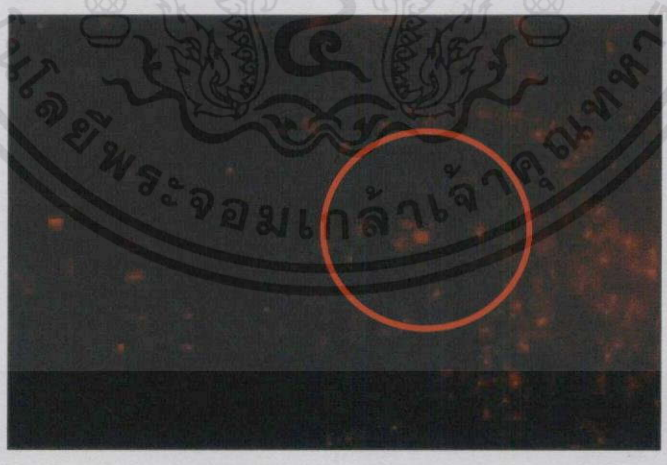
รูปที่ 4.23 ก.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี LB-Ex-4
ข.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี LB-Ex-4(แสงขาว)
ค.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี LB-Ex-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน ไว้สำหรับการใช้งาน เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

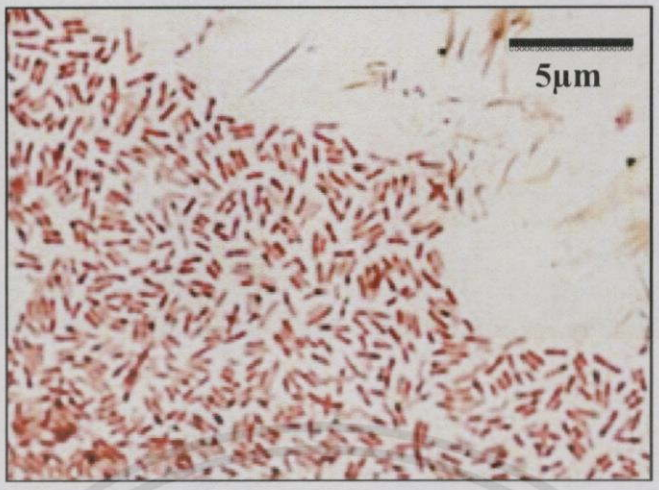
ข.



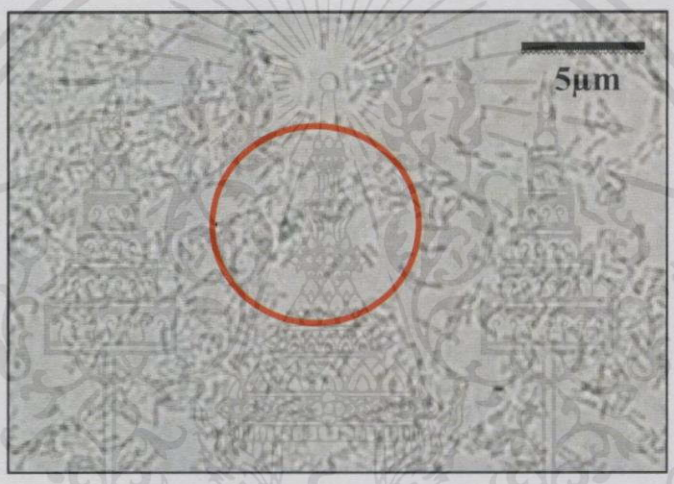
ค.

รูปที่ 4.24 ก.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-16
ข.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี NA-Ex-16 (แสงขาว)
ค.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี NA-Ex-16

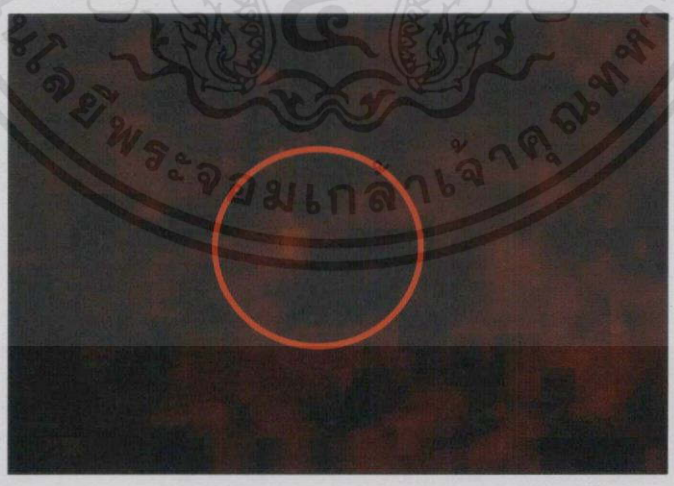
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 4.25 ก.ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของโคโลนี NA-Ex-19

ข.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี NA-Ex-19 (แสงขาว)

ค.ส่อง Fluorescent Microscope ของโคโลนี NA-Ex-19

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ทำการดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ โยชน์ด้านการค้า มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองเพื่อศึกษาแบคทีเรียที่ผลิต Polyhydroxyalkanoates(PHAs) จากน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลโดยแบ่งเป็นน้ำเสียก่อนบำบัดและน้ำเสียหลังบำบัดจากการศึกษาพบว่าในการคัดเลือกครั้งที่ 1โดยการย้อมด้วย Sudan Black B ประเภทอาหาร LB Agar น้ำเสียก่อนบำบัดพบทั้งหมด 5 โคโลนี และ น้ำเสียหลังบำบัดพบ 4 โคโลนี ประเภทอาหาร NA Agar ไม่พบในน้ำเสียก่อนบำบัด น้ำเสียหลังบำบัดพบ 4 โคโลนี และเมื่อนำคัดเลือกครั้งที่ 2 โดยการย้อมด้วย Nile Blue A ประเภทอาหาร LB Agar ไม่พบในน้ำเสียก่อนบำบัด น้ำเสียหลังบำบัดพบ 2 โคโลนี และประเภทอาหาร NA Agar ไม่พบในน้ำเสียก่อนบำบัด น้ำเสียหลังบำบัดพบ 2 โคโลนี เมื่อนำมาส่องด้วยฟลูออเรสเซนต์ พบว่า โคโลนีที่ผลิต PHAs จะมีลักษณะเป็นแท่งและภายในแท่งนั้นจะติดสีดำเช่นเดียวกับโคโลนีที่มีลักษณะกลม ซึ่งเป็นสีที่มาจากการย้อม Sudan Black B เมื่อนำมาส่องผ่านจะให้ผลเป็นสีส้มสว่างและจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มแสงมากขึ้น และจากการศึกษาน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมแห่งนี้มีเชื้อที่สามารถผลิต PHAs ได้ โดยจากการเลือกใช้อาหาร 2 ประเภท คือ อาหาร LB Agar และ NA พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหาร LB Agar

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาหาสภาวะเพิ่มเติมที่เหมาะสมในเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs เช่น พีเอช อุณหภูมิและหัวเชื้อที่เติมในอาหาร

5.2.2 ควรมีการนำเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs ไปตรวจสอบเพื่อหาชื่อเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตจะได้นำมาต่อยอดในการวิเคราะห์เพื่อผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพต่อไป

5.2.3 จากการศึกษาแบคทีเรียที่นำมาศึกษามาจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลเป็นหลักอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ควรที่จะจำกัดสารอาหาร เพราะเนื่องมาจากแหล่งที่มามีปริมาณโซเดียมมากอยู่แล้วจึงไม่ควรที่จะใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของโซเดียมมากไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกพร สังขรักษ์. (2552). **การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากจุลินทรีย์ The Production of Polyhydroxyalkanoate by Microorganisms.**(น.75-84). พัทลุง : มหาวิทยาลัยทักษิณ.

กรองแก้ว ทิพยศักดิ์และพิสมัย ชัยรัตน์อุทัย. **ปฏิบัติการเคมีสิ่งแวดล้อม1.** พิมพ์ครั้งที่1. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ตริตาภรณ์ จันเทศ. (2553). **โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต : พลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย.** บริการวิชาการ, 18(1), 27-30.

มลิวรรณ เกตุกัปตัน, อัญชลี ขุนโมกข์, และอัญชลี วิจิตร.(2552). **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรตจากเชื้อAlcaligeneslatus TISTR 1403.** ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เยาวพา สุวัตถิ. (2554). **พลาสติกชีวภาพ.** วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม, 18(4), 1-3

วรัญญา สุวรรณสงห์ และผกาวดี แก้วกันเนตร. (2553). **การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์จากธรรมชาติ.**วารสารศูนย์บริการวิชาการ, 11-12

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด. (2551). **สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซิบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีวาเลอเรต จากน้ำเสียโรงงานอาหารทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากระบบเอสบีอาร์.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ส่งศรี กุลปรีชา. (2555). **การผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติจากแบคทีเรีย.** โครงการวิทยาศาสตร์สู่ความเป็นเลิศ, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีการสื่อสารและโทรคมนาคมวุฒิสภา, จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย.

สาธิตา ผลอินทร์. (2554). **การคัดแยกและการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต โดยจุลินทรีย์จากทะเล.** วิทยานิพนธ์ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุขใจ ชูจันทร์. (2557). **พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์.**(1)กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. (2549). *การประชุมและนิทรรศการนานาชาติ "Innobioplast2006"*. วันที่ค้นข้อมูล 29 กันยายน 2557, จากสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ เวปไซด์ : http://www.nia.or.th/innolinks/200608/innovculture.htm

Ballard, B.G.H., Holmes, P.A., and Senior, P.J. (1987).**Formation of Polymers of poly-β-hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparition of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state. Recent Advance Mechanical synthesis Aspects of polymer**, pp. 293-214.

Chien, C.C., Chen, C.C., Choi, H.M., Kung S.S. and Wei, Y.H. (2007).**Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by Vibrio spp. isolated from marine environment**. Journal of Biotechnology, (132), 259-263

C.Pozo, M.V.Martinez-Toledo,B.Rodelas and J.Gonzalez-Lopez.(2002). **Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacterchroococcum* H23 in media containinf a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source**. Spain: 125-131

Evan, J.D. and Sikdar, S.K. (1990). **Biodegradable plastic: An idea whose time has come**. Chemtech, (20), 38-42.

India : HindawiPublishing.S.Vishnuvardhan Reddy, M.Thirumala,T.V.Kishore Reddy and S.K.Mahmood.(2008). **Isolation of bacteria producing polyhydroxyalkanoates(PHA) from municipal sewage sludge**. India: World J MicrobiolBiotechnol(2008) 24 2949-2955.

Jyotsana Dalal, Priyangshu M. Sarma, Meeta Lavania, AjoyK.Mandal and Banwari Lal.(2010). **Evaluation of bacterial strains isolated from oil-contaminate soil for production of polyhydroxyalkanoic acids (PHA)**.India: Pedobiologia 54 (2010) 25-30.

Lee, S.Y. (1996). **BacteriaPolyhydroxyalkanoates.Biotechnology and Bioengineering**, 49: 1-14

Luengo, J.M., Garcia, B,, Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E.R. (2003). **Bioplasticfrom microorganisms**. Current opinion in Microbiology, 6: 1-14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Madison, L.L. and Huisman,G.W. (1999). **Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates) : from DNA to plastic**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, (63), 21–53.

M. Suresh Kumar, S.N. Mudliar, and T. Chakrabarti.(2004). **Production of biodegradable plastics fromactivated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant.** India : Elsevier Ltd.

Na Xiao and Nianzhi Jiao.(2011). **Formation of Polyhydroxyalkanoate in Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria and Its Relationship to Carbon Source and Light Availability**. (21). Applied and Environmental Microbiology : p.7445-7450.

RavinNarain.(2013). **Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes**.

Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S. (2007). **Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants.** Biotechnology Advance, (25), 148-175.

Turesin, F., Gumusyazici, Z., Kok, F.N., Gursel, I., Alaaddinoglu, N.G. and Hasirci, V. 2000.**Biosynthesis of polyhydroxybutyrate and its copolymers and their use in controlled drug release.** Turk J. Med. Sci. 30, 535-541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์น้ำ

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนการวิเคราะห์(pretreatment)

ในกรณีที่น้ำตัวอย่างไม่เป็นกลาง จะต้องทำให้มีพีเอช 6.5-7.5 ด้วยกรดซัลฟิวริก 0.5 โมล/ลบ.ดม. หรือโซเดียมไอดรอกไซด์ 1โมล/ลบ.ดม. และต้องระวังไม่ให้ปริมาณของตัวอย่างน้ำเปลี่ยนแปลงมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีตัวอย่างน้ำมีคลอรีนตกค้างจะต้องกำจัดออกก่อนซึ่งโดยทั่วไปคลอรีนตกค้างจะลดลงเองเมื่อตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง แต่ในตัวอย่างน้ำมี pH เท่ากับ 6 อยู่แล้วจึงไม่ต้องปรับให้เป็นกลางอีก

การวิเคราะห์หาค่าบีโอดี (BOD)

การวิเคราะห์หาค่าบีโอดีเป็นการวิเคราะห์เพื่อที่จะทราบถึงปริมาณความสกปรกของน้ำ เช่น แม่น้ำในลำคลอง น้ำทิ้งจากอาคารบ้านเรือน และโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น เพื่อประโยชน์ในการออกแบบระบบบำบัด ควบคุมคุณภาพน้ำทิ้งและประสิทธิภาพของระบบนั้นๆ โดยเปรียบเทียบในรูปของปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์

การวิเคราะห์หาค่าบีโอดีโดยทั่วไปเป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้หมดไปในเวลา 5 วันในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส

เนื่องจากออกซิเจนในอากาศสามารถละลายน้ำได้ในปริมาณจำกัด คือ ประมาณ 9 มก./ลบ.ดม.ในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ดังนั้นในน้ำเสียซึ่งมีความสกปรกมากจำเป็นที่จะต้องทำให้ปริมาณความสกปรกเจือจางลงอยู่ในระดับซึ่งสมมูลพอดีกับปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ การวิเคราะห์นี้เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในน้ำ จึงจำเป็นต้องให้สภาพที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ กล่าวคือไม่มีสารพิษ แต่มีอาหารเสริมเพียงพอสำหรับจุลินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เป็นต้น นอกจากนี้การย่อยสลายอินทรีย์ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำกระทำโดยจุลินทรีย์หลายชนิด ในตัวอย่างน้ำที่วิเคราะห์จึงจำเป็นต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเหล่านี้อยู่อย่างเพียงพอ ถ้าไม่มีหรือมีปริมาณน้อยไปควรเติมจุลชีพซึ่งเรียกว่า หัวเชื้อ (Seed)ลงไป

1.การวิเคราะห์

วิธีทำให้เจือจางใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีความสกปรกสูง (มีค่าบีโอดีมากกว่า 7 มก./ลบ.ดม.) จำเป็นจะต้องทำให้น้ำตัวอย่างที่สกปรกเจือจางลงโดยใช้น้ำผสมเจือจาง และควรทำหลายๆ ความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1การเตรียมน้ำผสมเจือจาง

- นำน้ำกลั่นที่ปราศจากสารเคมีซึ่งกลั่นจากเครื่องกลั่นแก้ว มาทำการปรับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 20±1 องศาเซลเซียส

- ปรับคุณภาพน้ำให้เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และไอร์ออนคลอไรด์อย่างละ 1 ลบ.ซม.ต่อน้ำกลั่น 1 ลบ.ดม.

- เติมอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัวแล้ว

1.2การตรวจสอบคุณภาพน้ำผสมเจือจาง (dilution water check)

เติมน้ำผสมเจือจางที่ยังไม่ได้หัวเชื้อลงในขวดบีโอดี 3 ขวด ขวดหนึ่งนำไปหาค่าออกซิเจนละลายก่อน อีก 2 ขวดปิดจุก นำไปอินคิวเบท 5 วันที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และไม่ต้องนำไปใช้ในการคำนวณ ผลต่างของค่าออกซิเจนละลายก่อนและหลัง 5 วัน ที่ 20 องศาเซลเซียส ไม่ควรเกิน 0.2 มก./ลบ.ดม.และจะยิ่งดีถ้าไม่เกิน 0.1 มก./ลบ.ดม.

1.3การผสมเจือจาง

เนื่องจากการวิเคราะห์ค่าบีโอดีต้องอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวกลางในการย่อยสลาย สภาวะแวดล้อมจะมีผลต่อการวิเคราะห์มาก ทำให้ค่าบีโอดีที่ได้มีความแปรผันสูง การวิเคราะห์ตัวอย่างหนึ่งๆ จึงมักจะทำการผสมเจือจางหลายๆความเข้มข้น(โดยทั่วไปไม่น้อยกว่า 3 ความเข้มข้น) ส่วนอัตราส่วนในการผสมเจือจางอาจประมาณจางชนิดของตัวอย่าง หรือค่าความเข้มข้นโดยประมาณ เมื่อได้อัตราส่วนเหมาะสมแล้วจึงทำการผสมเจือจาง ดังนี้

- ค่อยๆรินน้ำผสมเจือจาง ลงในกระบอกตวงขนาด 1,000 ลบ.ซม.) ประมาณ 500 ลบ.ซม.โดยค่อยๆ ไหลลงตามข้างกระบอกตวง

- เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์(ตารางที่ 1) ลงในกระบอกตวง 2 ลบ.ซม.(ในกรณีที่จำเป็นต้องเติม)

- เติมตัวอย่างน้ำตามส่วนที่คำนวณได้จากตารางที่ (ตารางที่1) หรือกวนให้เข้ากันโดยใช้แท่งแก้วเสียบจุกยางไว้ที่ปลาย ชักขึ้นเบาๆระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

- ค่อยๆเติมตัวอย่างน้ำที่ผสมเข้ากันดีแล้ว ลงในขวดบีโอดีที่แห้งและสะอาดจนเต็ม 3 ขวดปิดจุกให้สนิท ขวดหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาค่าออกซิเจนละลายวันแรก อีกสองขวดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปบ่มให้ตรวจดูว่ามีน้ำหล่อที่ปากขวดและควรตรวจดูทุกวันอย่าให้แห้ง (ให้เติมหัวเชื้อผสมเจือจาง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การเจือจาง

เปอร์เซ็นเจือจาง	ประเภทของน้ำตัวอย่าง
0.0-1.0	Strong industriak wastes
1-5	Raw & Settled wastewater
5-25	Biologically treated effluent
25-100	Polluted river waters

ตารางที่ 2 ค่าบีโอดีที่สัดส่วนได้กับอัตราการเจือจางต่างๆ

เปอร์เซ็นของผสม	อัตราค่าบีโอดี
0.01	20,000-70,000
0.02	10,000-35,000
0.05	4,000-14,000
0.1	2,000-7,000
0.2	1,000-3,500
0.5	400-1,400
1.0	200-700
5.0	40-140
10.0	20-70
20.0	10-35
50.0	4-14
100.0	0-7

1.4การหาค่าออกซิเจนที่สามารถละลายน้ำได้

การหาค่าออกซิเจนละลายในวันแรก และวันหลังจากอินคิวเบทแล้ว 5 วัน ใช้วิธีเดียวกับการวิเคราะห์หาออกซิเจนในหัวข้อ

1.5 การคำนวณ

$$\text{ค่าบีโอดีเมื่อไม่ใส่หัวเชื้อ:บีโอดี(มก./ลบ.ดม.)} = \frac{D1-D2}{P}$$

$$\text{ค่าบีโอดีเมื่อใส่หัวเชื้อ:บีโอดี(มก./ลบ.ดม.)} = \frac{(D1-D2)-(B1-B2)f}{P}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

D1 = ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำเมื่อวัดหลังจากเจือจางทันที

D0 = ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำเมื่อวัดหลังเจือจางน้ำและบ่มเป็นเวลา 5 วัน

B1 = ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำในชุดควบคุมที่เติมหัวเชื้อโดยวัดทันที

B1 = ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำในชุดควบคุมที่เติมหัวเชื้อโดยวัดกลังจากบ่ม5วัน

การวิเคราะห์หาค่าทีเคเอ็น (Total Kjeldahl Nitrogen , TKN)

ทีเคเอ็น เป็นการหาออร์แกนิคไนโตรเจนและแอมโมเนียมไนโตรเจน ซึ่งจะถูกเปลี่ยนโดยจุลชีพให้เป็นองค์ประกอบของเซลล์

1.การวิเคราะห์

นำตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตรใส่ใน Kjeldahl ขนาด 800 มิลลิลิตรใส่สารผสมคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟตปริมาณ 5 กรัมเติมกรดซัลฟูริก 20 มิลลิลิตรย่อยในเตาย่อยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส 30 นาทีเพิ่มอุณหภูมิเป็น 380 องศาเซลเซียสนาน 60 นาทีจนได้สารละลายใสทิ้งไว้ให้เย็นและปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตรและนำกลั่นในอุปกรณ์กลั่นเติม NaOH-$Na_2S_2O_3$ 50 มิลลิลิตรไม่ต้องเขย่านำไปเข้าเครื่องกลั่นนำกรดบอลิก 50 มิลลิลิตรใส่ Flask ขนาด 250 มิลลิลิตรหยดอินดิเคเตอร์ผสม 2 หยดจะได้สารละลายสีม่วงกลั่นจนได้ปริมาตร100 มิลลิลิตรให้หยุดกลั่นนำมาไทเทรตกับ H_2SO_4 0.02 นอร์มอล

การวิเคราะห์หาค่าซีโอดี(COD)

1.การวิเคราะห์

การวิเคราะห์จะทำแบบปิดทำการเลือกช่วงของค่าซีโอดีเพื่อเลือกปริมาณน้ำตัวอย่างนำน้ำตัวอย่างมา 2.5 มิลลิลิตรซ้ำนำมาเติม $K_2Cr_2O_7$ 1.5 มิลลิลิตรเติม H_2SO_4+Ag_2SO_4 3.5 มิลลิลิตรแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา1 ชั่วโมงหลังจากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเปิดฝาหลอดแก้วเติมเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด ไทเทรตกับFAS 0.05 นอร์มอลเมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินไปเป็นน้ำตาลแดง

การวิเคราะห์ออกซิเจนที่สามารถละลายน้ำได้

1.การวิเคราะห์

นำน้ำตัวอย่างใส่ขวดบีโอดี 5 ขวดพร้อมกันโดยไม่ให้มีฟองอากาศนำขวดที่ 4-5 เก็บไว้หาค่าดีโอด้วย การวัดแบบเมมเบรนขวดที่ 1-3 ปิเปต แมงกานีสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร อัลคาไลน์ไอโอไดด์โซเดียมเอไซด์ 2 มิลลิลิตรจุ่มปิเปตใต้น้ำในขณะที่ปล่อยสารละลายปิดจุกคว่ำหงายจนทั่วจะได้ตะกอนสีน้ำตาลทิ้งให้มีส่วนใสประมาณ 100 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมฟลูออไรด์ 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการรบกวนของเหล็ก หลังจากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตรนำมา 203 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ไทเทรตกับโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 นอร์มอลจะได้สีเหลืองฟางข้าวเติมน้ำแป้ง 2 มิลลิลิตรได้สารละลายสีครามไทเทรตต่อจนสีครามหายไป

การหาปริมาณฟอสเฟต(AscorbicAcid Method)

1.การวิเคราะห์

นำตัวอย่างน้ำเสียมา 50 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำยารวม (ภาคผนวก) 8 มิลลิลิตรเขย่าทิ้งไว้ 10-15 นาทีเพื่อให้เกิดสีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตรนำค่าที่ได้ไปอ่านกราฟมาตรฐาน

การหาปริมาณซัลเฟต

1.การวิเคราะห์

นำน้ำตัวอย่างมา 100 มิลลิลิตรใส่ Flask 250 มิลลิลิตรนำไปเติมผลึก $BaCl_2$ 1 ช้อนเล็กเพื่อให้เกิดสารแขวนลอยเติมบัฟเฟอร์ผสมลงไป 20 มิลลิลิตรใช้เครื่องปั่นกวนปั่นความเร็วทันทีและค่อยๆเติม $BaCl_2$ลงไปปรับเทสารละลายลงในหลอดตัวอย่างเพื่อทำการวัดความขุ่นทุกๆ 30 วินาทีเป็นเวลานาน 4 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสีย้อม (Dry)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสีย้อม(dry)

1.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อุปกรณ์

1.จานเพาะเชื้อ

2.ขวดดูเรนขนาด 100 มล.

3.ขวดดูเรนขนาด 500 มล.

4.ตะเกียงแอลกอฮอร์

5.กระดาทิชชู่

6.เครื่อง Auto clave

สารเคมี

1.อาหาร LB both

2.สูตรอาหาร NA

- กลูโคส 1%

-Beef extract 0.3%

-Peptone 0.5%

-Sodium chloride 0.8%

-Agar 1.5%

3.แอลกอฮอร์ 70%

วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหารตามอัตราส่วนที่จะเตรียมในแต่ละครั้ง (เช่น ต้องการเตรียมทั้งหมด 40 เพลทเพลทละ 20 มล.) ดังนั้นจึงต้องเตรียมอัตราส่วนอาหารดังนี้

1.1 อาหาร LB

- อาหาร LB Both มีอัตราส่วน 25 กรัมต่อน้ำ 1,000 มล. เมื่อต้องการเตรียม 800 มล.จะต้องชั่งอาหาร LB both มา 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ชั่ง Agar มา 15 กรัม

1.2 อาหาร NA

- ชั่ง กลูโคสมา 8 กรัมต่อน้ำ 800 มล.
- ชั่ง Beef extract มา 2.4 กรัมต่อน้ำ 800 มล.
- ชั่ง Peptone มา 4 กรัมต่อน้ำ 800 มล.
- ชั่ง Sodium chloride มา 6.4 กรัมต่อน้ำ 800 มล.
- ชั่ง Agar มา 15 กรัมต่อน้ำ 800 มล.

2. หลังจากเมื่อละลายแล้วให้นำมาใส่ในขวดดูเรนที่เตรียมไว้

3. นำไปใส่ในเครื่อง Auto clave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

4. เมื่อเสร็จแล้วรอให้อุ่นประมาณ 60 องศาเซลเซียส ให้รีบนำมาใส่เพลทอาหารที่เตรียมไว้ทันที เนื่องจากถ้ารอให้เย็นจะทำให้อาหารแข็ง

2.การเตรียมสีย้อม

อุปกรณ์

1. หลอดเซนติฟิวขนาด 15 มล.
2. หลอดเซนติฟิวขนาด 1.5 มล.
3. บีกเกอร์ขนาด 100 มล.
4. บีกเกอร์ขนาด 50 มล.
5. แท่งแก้วคนสาร
6. ช้อนตักสาร

สารเคมี

1. Sudan black B
2. เอทิลแอลกอฮอร์AR grade
3. Nile Blue A
4. Dimethysulfoxide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม

Sudan Black B 0.02 เปอร์เซ็น

-ชั่ง Sudan black B มา 0.02 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอร์AR grade 100 มล.

Nile Blue A เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

-ชั่ง Nile Blue A มา 4 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 8 มล.จะได้สีย้อม Nile Blue A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เครื่องมือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องมือ

อุปกรณ์

-กล้องจุลทรรศน์

ที่มา : กล้องจุลทรรศน์ OLYMPUS BX51(ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

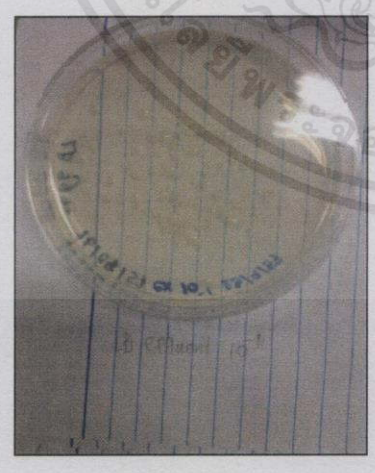
การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.น้ำเสียก่อนบำบัด

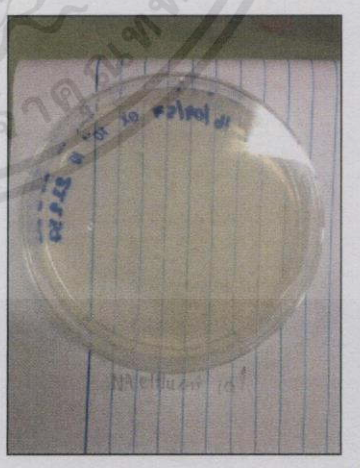
รูปภาพ:บน,อาหาร LB Agar

ล่าง,อาหาร NA

2.น้ำเสียหลังบำบัด



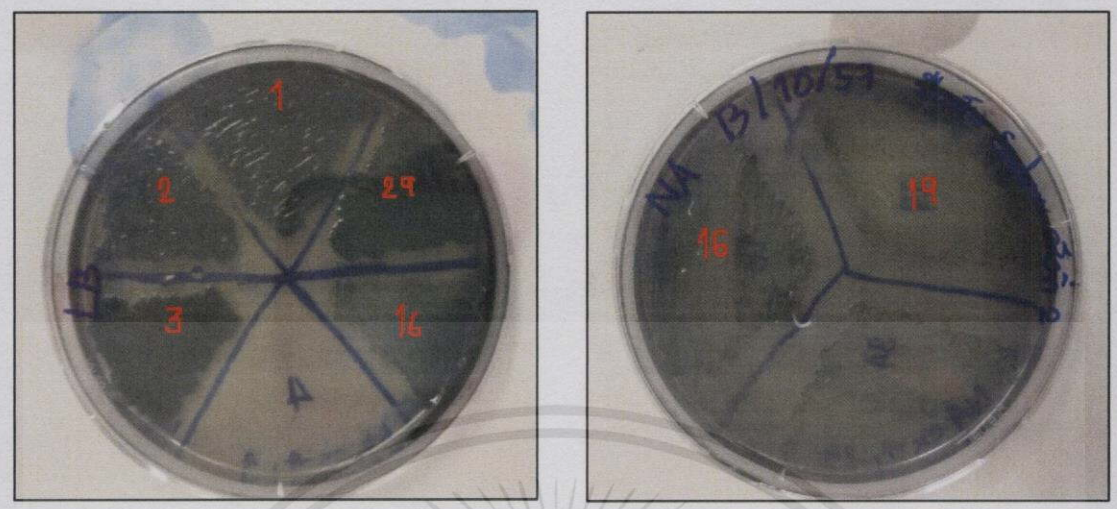
อาหาร LBAgar



อาหาร NA Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

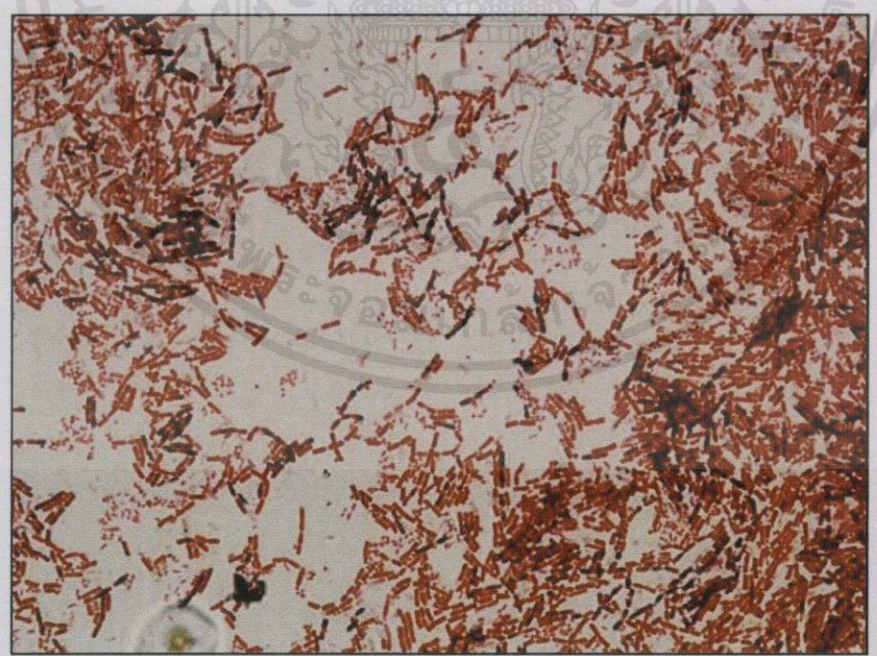
3.การย้อมสี Sudan Black B



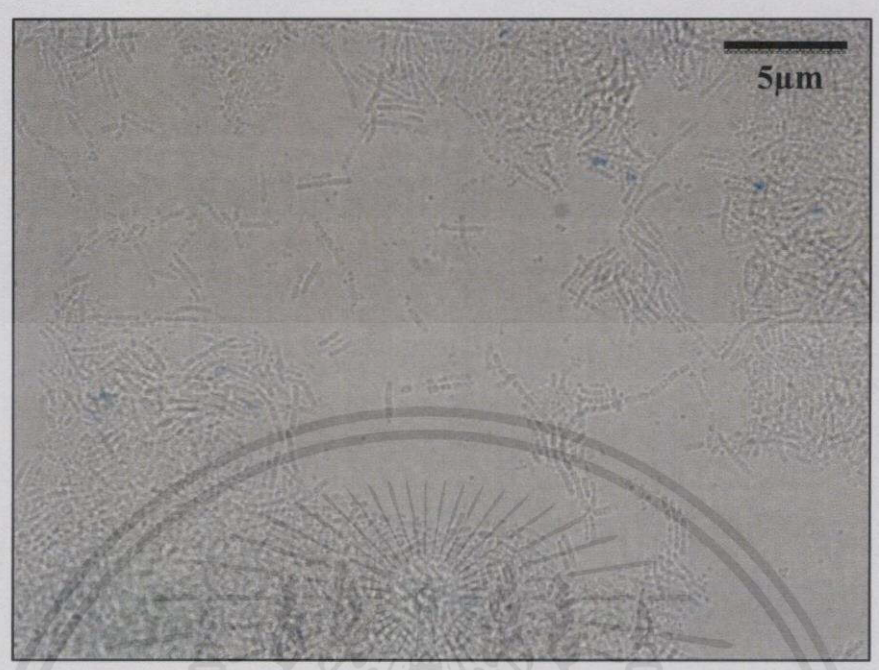
น้ำเสียหลังบำบัด : - ซ้าย:อาหาร LB Agar

- ขวา:อาหาร NA Agar

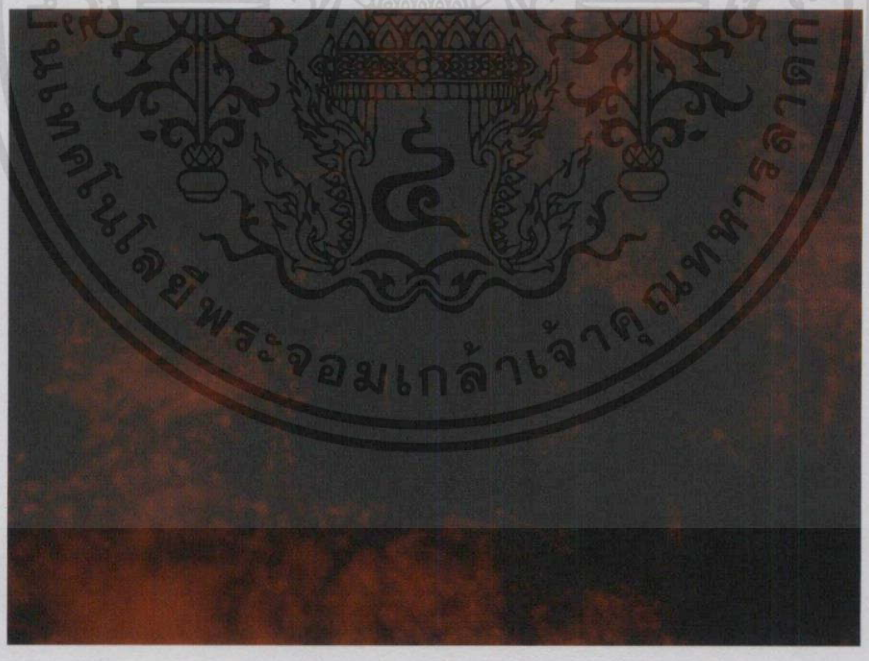
ผลการย้อมสี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ย้อมด้วย Sudan Black B ที่ Objective 100X



ย้อมด้วย Nile Blue A ที่ Objective 100X ส่องด้วยฟลูออเรสเซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้