บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในยุคปัจจุบันพลังงานเป็นสิ่งสำคัญในสังคมมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็นในด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม ธุรกิจ บ้านที่อยู่อาศัย และอื่นๆ ทั้งหมดนี้ล้วนแล้วแต่ต้องการใช้พลังงานในการดำเนินการทั้งสิ้น และเพื่อให้กระบวนการต่างๆดำเนินไปได้อย่างต่อเนื่องไม่หยุดชะงัก จึงทำให้เกิดความต้องการในการใช้พลังงานเพิ่มปริมาณมากขึ้นอย่างไร้ขอบเขต ในปี พ.ศ. 2551 ประเทศไทยต้องนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศ ทั้งน้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ และไฟฟ้า ถึงร้อยละ 60 ของความต้องการการใช้พลังงานทั้งหมด ซึ่งปัจจุบันก็ยังคงมีการนำเข้าพลังงานโดยเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 6 ต่อปี (รายงานประจำปี 2551 การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย) และจากรายงานปีล่าสุด มีการนำเข้าพลังงาน ในปี 2553 เพิ่มขึ้นสูงกว่าปีก่อนร้อยละ 6.7 ในขณะที่ราคานำเข้าพลังงานก็ยังคงสูงขึ้นเรื่อยๆโดยไม่สามารถคาดเดาได้ ภาครัฐและเอกชนจึงหันมาสนใจกับการอนุรักษ์พลังงานและส่งเสริมการพัฒนาพลังงานหมุนเวียนมาใช้ประโยชน์มากขึ้น ได้แก่พลังงานจากชีวมวล พลังงานน้ำ พลังงานลม พลังงานจากแสงแดด พลังงานจากแอลกอฮอล์ ขยะ และก๊าซชีวภาพ ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ได้จากธรรมชาติรอบตัวเรา หามาใช้ได้ไม่มีวันหมด พลังงานหมุนเวียนเหล่านี้เป็นอีกทางเลือกในการสร้างพลังงานและลดการนำเข้าจากต่างประเทศ แต่ก็ยังไม่เพียงพอจึงเกิดการมองหาแหล่งพลังงานใหม่ คือพลังงานทดแทน โดยมีความเชื่อมั่นว่าจะเข้ามามีบทบาทปฏิวัติวงการพลังงานด้วยแหล่งวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและมีมากมายในโลก ทั้งยังเป็นพลังงานสะอาด ไม่ก่อมลพิษ โดยเฉพาะในกลุ่มของเซลล์เชื้อเพลิงและเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ พลังงานทดแทนที่กำลังเป็นที่น่าสนใจและอยู่ในระหว่างการพัฒนาวิจัยอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะทำให้เซลล์เชื้อเพลิงกลายเป็นแหล่งพลังงานแหล่งใหม่ที่มีความยั่งยืน และใช้ทดแทนน้ำมันที่มีราคาสูงและกำลังเหลือน้อยในปัจจุบัน

หลักการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนพลังงานเคมีในสารอินทรีย์ให้เป็นพลังงานไฟฟ้าโดยใช้ไบโอแคตาลิสท์ (biocatalyst) หรือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ โดยการผลิตกระแสไฟฟ้าจะเกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ ทำให้เกิดโปรตอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) ขึ้น และใช้ตัวกลาง (mediator) ช่วยส่งผ่านอิเล็กตรอนให้เคลื่อนที่จากภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ออกมาที่ขั้วไฟฟ้าแอโนด (anode) จากนั้นอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านวงจรภายนอกไปยังส่วนของขั้วแคโทด (Cathode compartment) ส่วนโปรตอนจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่านโปรตอน (Proton exchange membrane: PEM) ไปยังขั้วแคโทดเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น ในสารละลายบัฟเฟอร์ สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงให้กับเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์นั้นมีหลากหลายชนิด แต่ที่น่าสนใจ

และมีจำนวนมากจนก่อให้เกิดปัญหาคือน้ำเสีย เนื่องจากการขยายตัวทางด้านอุตสาหกรรมที่เจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็วทำให้เกิดมลพิษและของเสียจากอุตสาหกรรมมากมาย หนึ่งในนั้นคือน้ำเสีย ตามปกติแล้วก่อนที่จะปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาตินั้นน้ำเสียจากโรงงานต้องผ่านการบำบัดเพื่อให้มีค่าตรงตามมาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งที่กำหนดโดยกรมควบคุมมลพิษ ซึ่งการจัดการระบบบำบัดน้ำเสียนั้นต้องมีค่าใช้จ่ายในการจัดทำระบบมากมาย หากสามารถนำน้ำเสียมาใช้ประโยชน์โดยนำมาเป็นแหล่งอาหารให้กับเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ก็จะได้ประโยชน์คือ ได้กระแสไฟฟ้า ได้น้ำสะอาดขึ้น และมีความเป็นพิษลดลง เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ และถึงแม้ว่าจะได้กระแสไฟฟ้าไม่มากเมื่อเทียบกับการใช้แหล่งพลังงานฟอสซิลแต่ก็ได้ผลพลอยได้คือการบำบัดน้ำเสียไปพร้อมกับการผลิตไฟฟ้านั่นเอง

ปัจจัยสำคัญในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์นั้นมีหลายอย่าง นอกจากชนิดของขั้วไฟฟ้า ความเป็นกรดด่าง แล้วสิ่งที่น่าสนใจ อีกอย่าง คือกลุ่มจุลินทรีย์เพราะเป็นตัวหลักในการทำหน้าที่ผลิตกระแสไฟฟ้า จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้นั้นมีหลายชนิดและบางชนิดก็อาศัยอยู่ในน้ำเสีย เช่น *Pseudomonas aeruginosa* (Rabeay และคณะ, 2004) *Klebsiella pneumonia* (Zhang และคณะ, 2008) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประมาณ 95 เปอร์เซนต์ รองลงมาได้แก่ เชื้อรา สาหร่าย และโปรโตซัว (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548)

จากปัจจัยที่กล่าวมาจึงเป็นที่มาของงานวิจัย งานวิจัยนี้สนใจศึกษากลุ่มแบคทีเรียในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ เพื่อความเข้าใจข้อมูลพื้นฐานที่อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ กลุ่มแบคทีเรียในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่ที่ใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องเป็นอาหาร

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้จัดทำในระดับห้องปฏิบัติการ โดยออกแบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ประกอบด้วยทรงกระบอก อะคริลิกใส ปริมาตรต่อถังเท่ากับ 800 มิลลิลิตร การทำวิจัยมุ่งเน้นการศึกษา กลุ่มแบคทีเรียในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์หลังจากเปลี่ยนแปลงภาวะในถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบชนิดของ กลุ่มแบคทีเรียในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่ และสามารถนำไปเป็นความรู้พื้นฐานที่อาจนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานต่อไป

บทที่ 2
ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ (Microbial fuel cell)

ความคิดในการใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตกระแสไฟฟ้าเกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อต้นศตวรรษที่ 19 โดยบุคคลแรกที่ทำการทดลองคือ Potter ในปี 1911 ได้ทดลองผลิตกระแสไฟฟ้าจาก *Escherichia coli* และ *Saccharomyces* แต่การทดลองนั้นไม่ได้รับความสนใจเท่าไหร่นัก ต่อมาในปี 1931 Barnet Cohen สนใจเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์เชื้อเพลิง โดยเพิ่มจำนวนชุดเซลล์เชื้อเพลิงและเชื่อมต่อกันเป็นชุดอนุกรม พบว่าสามารถผลิตความต่างศักย์ได้มากถึง 35 โวลต์ หรือเท่ากับกระแสไฟ 2 มิลลิแอมแปร์

ต่อมาจึงมีงานวิจัยเกี่ยวกับหัวข้อนี้เพิ่มมากขึ้น DelDuca ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักกลูโคสด้วย *Clostridium butyricum* โดยจุลินทรีย์นี้ทำหน้าที่เป็นตัวทำปฏิกิริยาที่ขั้วแอโนด แม้ผลจากการทดลองผลิตไฮโดรเจนโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดนี้จะยังไม่เสถียรและมีค่าไม่แน่นอน แต่ก็ได้รับการแก้ไขโดยการทำการทดลองอีกครั้งในปี 1976 โดย Suzuki ทำให้เกิดแนวคิดการออกแบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์อย่างที่พบในปัจจุบันขึ้น

จากผลงานวิจัยของ Suzuki ในช่วงปี 1970 ทำให้เกิดความเข้าใจเบื้องต้นเกี่ยวกับวิธีการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ ซึ่งต่อมาถูกนำมาศึกษาต่อในรายละเอียดที่ลึกลงไป โดย MJ Allen และ H.Peter Bennentto ทั้งคู่มองเห็นว่าเซลล์เชื้อเพลิงเป็นวิธีการที่เป็นไปได้ในการผลิตไฟฟ้าสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา งานวิจัยของพวกเขาเริ่มต้นขึ้นในช่วงต้นปี 1980 เรื่อยมา ซึ่งช่วยสร้างความเข้าใจในการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงเป็นอย่างมาก จากผลงานวิจัยเหล่านั้นทำให้ทราบว่าเราสามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้โดยตรงจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ โดยที่เซลล์เชื้อเพลิงประกอบด้วยส่วนของห้องแอโนดที่ไม่มีออกซิเจน เชื่อมต่อกับห้องแคโทด ซึ่งกั้นระหว่างห้องด้วยเยื่อแลกเปลี่ยนไอออน และต่อสายไฟภายนอกที่ขั้วทั้งสองเพื่อให้วงจรสมบูรณ์

ในปัจจุบันได้มีผลงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับการศึกษาเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ พลังงานทางเลือกใหม่ที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีในปัจจุบัน เพื่อประโยชน์ต่อไปในอนาคต Bruce E. Logan ศาสตราจารย์วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม นักวิจัยจาก Penn state ได้นำเสนองานวิจัยร่วมมากมายเกี่ยวกับการนำเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตไฟฟ้า และพลังงานทดแทนอื่นๆ เช่น ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซมีเทน พบว่าการนำหลักการของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์มาใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นให้พลังงานได้มากกว่าเมื่อเทียบกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบเดิมด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส

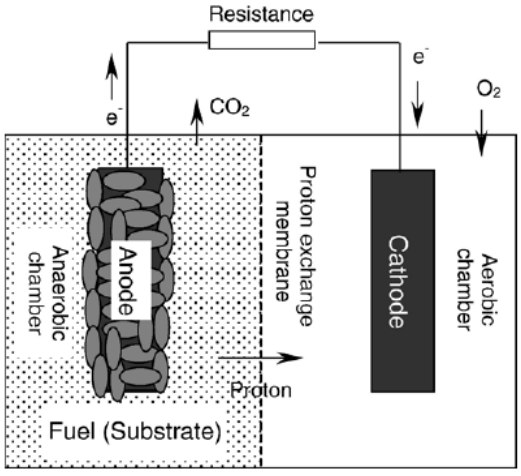
(ประสิทธิภาพ 50-70%) ถึง 144% (ScienceDaily, 2007) หรือการนำมาผลิตก๊าซมีเทนเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนของเชื้อเพลิงหุงต้มแบบพกพาได้ (Penn state live, 2009)

โดยทั่วไปเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ นั้นต้องการเทคโนโลยีที่สามารถรองรับการผลิตไม่ว่าจะเป็นเรื่องต้นทุนการผลิต ขนาดของพื้นที่ผิวสำหรับขั้วแอโนด (anodes) และแคโทด (cathodes) นอกจากนั้นยังต้องมีความเข้าใจกระบวนการทางชีวภาพเป็นอย่างดี โดยเฉพาะชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างเซลล์ และต้องมีการนำเทคโนโลยีอื่นมาใช้ร่วมกัน ที่มีความเป็นไปได้คือระบบบำบัดน้ำเสีย (water treatment) สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน ราคาถูกให้กับระบบได้ เทคโนโลยีเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์สามารถประยุกต์ใช้ไม่ว่าจะเป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen) การผลิตพลังงานจากมวลชีวภาพทางการเกษตร ซึ่งเป็นงานท้าทายสำหรับนักวิทยาศาสตร์และวิศวกรที่จะนำเทคโนโลยีกำจัดของเสียทำงานร่วมกับเทคโนโลยีการผลิตพลังงานในอนาคต

2.2 หลักการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

2.2.1 หลักการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ คือ ระบบของเซลล์ไฟฟ้าที่มีการนำอิเล็กตรอนจากกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์มาเปลี่ยนให้เป็นกระแสไฟฟ้า เป็นการเปลี่ยนพลังงานเคมีให้กลายเป็นพลังงานไฟฟ้าโดยใช้จุลินทรีย์เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งมีหลักการทำงานคล้ายกันกับการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงชนิดเยื่อแลกเปลี่ยนโปรตอน (Proton exchange membrane fuel cell: PEMFC) ซึ่งเป็นเซลล์เชื้อเพลิงอีกประเภทหนึ่งแต่ใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 2.1 แสดงเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่ (Du และคณะ 2007)

ส่วนประกอบหลักของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ประกอบด้วย 3 ส่วนหลักคือ ขั้วไฟฟ้า ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าแอโนด มีหน้าที่ส่งผ่านประจุอิเล็กตรอน (e^-) ออกไปทางขั้วไฟฟ้าแคโทด ขั้วไฟฟ้าแคโทดเป็นขั้วไฟฟ้าที่มีหน้าที่รับอิเล็กตรอนมารวมกับอะตอมของออกซิเจนและโปรตอน (H^+) และเยื่อเลือกผ่านอิเล็กตรอน ทำจากวัสดุต่างๆ เช่น สารละลาย แผ่นพลาสติก มีหน้าที่คือยอมให้โปรตอนเคลื่อนที่ผ่าน

การทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่นั้น จุลินทรีย์ในห้องแอโนดจะทำหน้าที่ออกซิไดซ์ (oxidized) สารตั้งต้นที่ให้ในระบบเซลล์เชื้อเพลิงได้เป็นอิเล็ กตรอน และโปรตอน ซึ่งมีการให้สารตั้งต้นอย่างต่อเนื่องโดยมีการเติมเข้าและถ่ายเอาสารตั้งต้นเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา (Continuous mode) หรือเป็นระบบปิดที่มีสารอาหารตั้งต้นปริมาณจำกัดไม่มีการเติมสารใดๆลงไปอีกหลังจากมีการเดินระบบ (Batch mode) จากนั้นอิเล็ กตรอนจะถูกส่งไปยังขั้วแอโนดโดยกลไกต่างๆของจุลินทรีย์ เช่น ส่งผ่านโดยตรงด้วยเส้นลวดนาโนไวร์ (nanowire) มีลักษณะเป็นรยางค์ยื่นออกมานอกผนังเซลล์ จุลินทรีย์ พบได้ในจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ *Geobacter sulfurreducens* และ *Shewanella oneidensis* (Gorby และคณะ, 2006) หรือการอาศัยตัวกลาง (mediators) ในการขนส่งอิเล็ กตรอนจากเซลล์มายังขั้วแอโนด เป็นต้น อิเล็ กตรอนจากขั้วแอโนดจะไหลผ่านวงจรภายนอกไปยังขั้วแคโทด ในขณะที่โปรตอนหรือไอออนบวกอื่นๆที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่านไอออนมายังส่วนของห้องแคโทดเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ

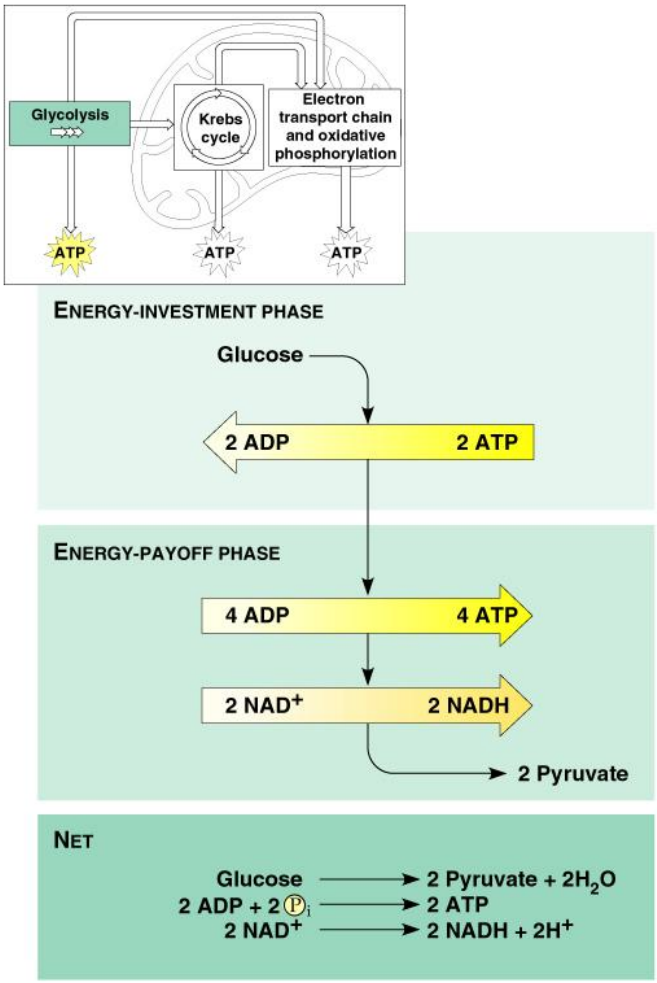
2.2.2 การทำงานของจุลินทรีย์ในเซลล์เชื้อเพลิง

จุลินทรีย์ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์นั้นสามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังขั้วไฟฟ้าได้หลายวิธี ทั้งนี้แล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์นั้นๆด้วย ซึ่งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการเพื่อย่อยสลายสารให้เกิดเป็นพลังงาน โดยพลังงานจะสะสมภายในเซลล์อยู่ในรูปของสารเคมี คือ ATP (Adenosinetriphosphate) (ภาพที่ 2.2) กระบวนการหายใจระดับเซลล์แบ่งเป็น 2 รูปแบบ คือ การหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน

ภาพที่ 2.2 แสดงกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์เกิดเป็นพลังงาน

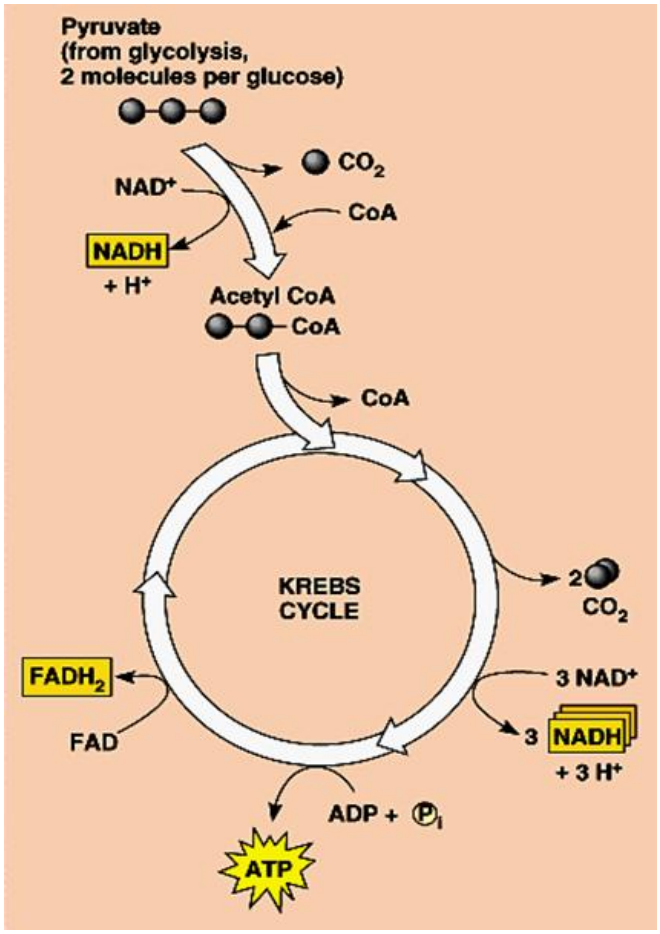
การหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน

การสลายสารอาหารแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic Respiration) เป็นกระบวนการที่มีกลไกเกิดต่อเนื่องกัน 3 ขั้นตอน คือ ไกลโคลิซิส (Glycolysis) วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) และการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron transport chain)



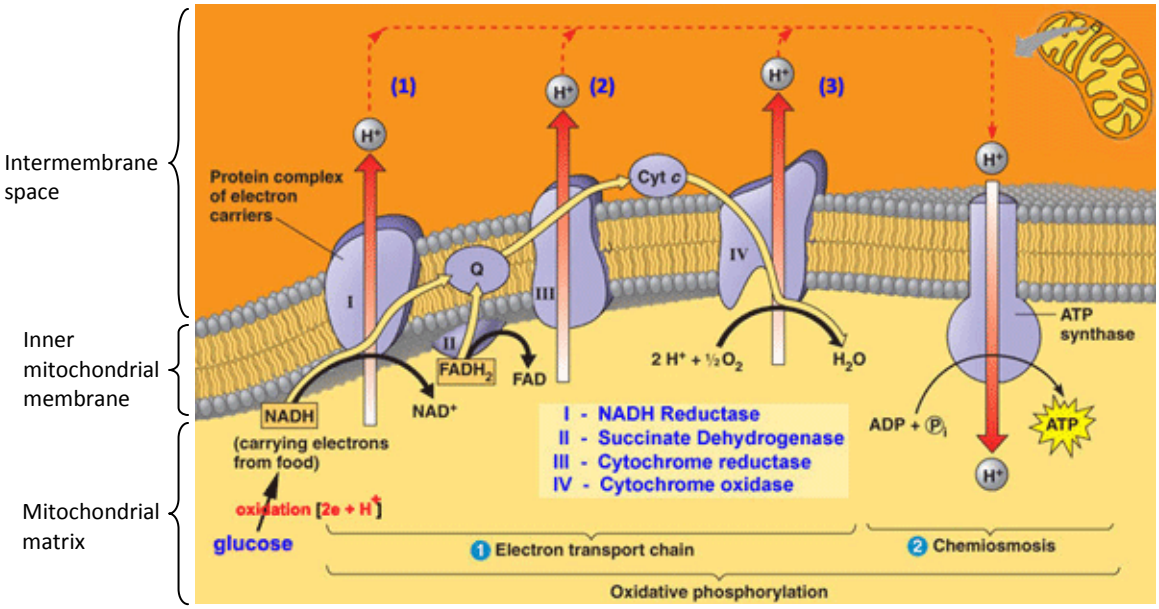
ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนไกลโคลิซิส (Campbell และคณะ, 2008)

ไกลโคไลซิสเป็นกระบวนการสลายกลูโคสที่เกิดขึ้นต่อเนื่องหลายขั้นตอนให้เกิดเป็น ไพรูเวต (Pyruvate) โดยจะได้พลังงานทั้งในรูปของ ATP และ NADH



ภาพที่ 2.4 วัฏจักรเครปส์ (Campbell และคณะ, 2008)

วัฏจักรเครบส์เป็นวัฏจักรตัวกลางในการเผาผลาญสารต่างๆและเป็นขั้นตอนการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์มากที่สุดในการหายใจระดับเซลล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวัฏจักรเครบส์ได้แก่ CO_2, NADH, $FADH_2$ และ ATP



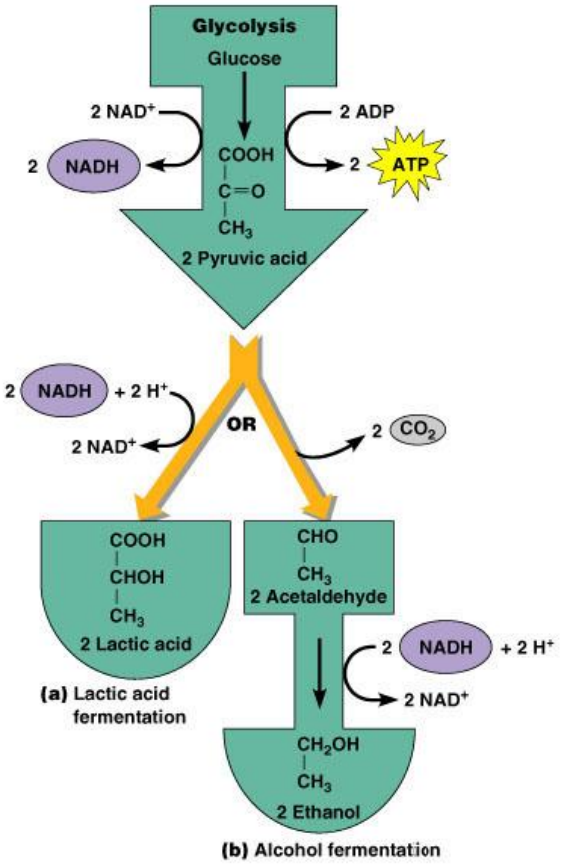
ภาพที่ 2.5 กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Campbell และคณะ, 2008)

ระบบการขนส่งอิเล็กตรอนประกอบด้วยโมเลกุลของตัวรับและส่งอิเล็ กตรอนอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนเรียงตัวอยู่ในเยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) อิเล็กตรอนจาก NADH จะถูกส่งไปตามระบบการขนส่งอิเล็ กตรอน โดยมีตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งมีค่าอิเลคโตรเนกาติวิตี (Electro negativity: EN) สูงกว่าตัวให้และรับอิเล็กตรอนอื่นๆในระบบ

การหายใจระดับเซลล์แบบไม่ใช้ออกซิเจน

การสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic Respiration) เป็นการสลายสารอาหารที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเพื่อสังเคราะห์ ATP โดยไม่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน การสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic respiration) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ไกลโคลิซีส (Gycolysis) และการหมัก (Fermentation) แสดงในภาพที่ 2.6

ดังนั้นในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์จึงจัดเป็นกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพราะใช้ขั้วไฟฟ้าทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายแทนการใช้ออกซิเจน

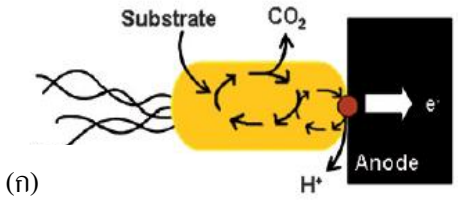


ภาพที่ 2.6 แผนภาพสรุปการสลายกลูโคสโดยไม่ใช้ออกซิเจน (Campbell และคณะ, 2008)

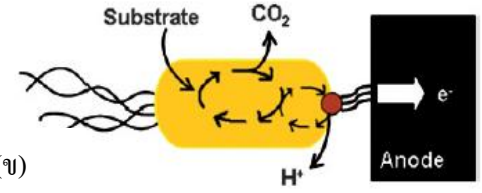
การถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากจุลินทรีย์ไปยังขั้วแอโนดแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

- การถ่ายโอนอิเล็ กตรอนไปยังขั้วแอโนดโดยตรงผ่านไซโตโครม (cytochrome) ที่ผนังเซลล์ชั้นนอก (ภาพที่ 2.7ก)

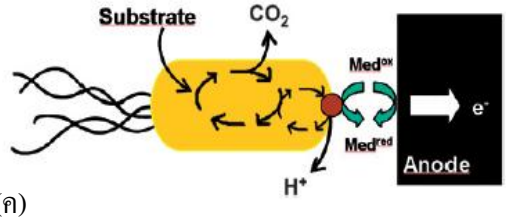
จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะไม่เป็นสื่อนำไฟฟ้า (nonconductive) เนื่องจากเยื่อหุ้มผนังเซลล์ชั้นนอกของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยไขมัน ได้แก่ เปปทิไดโดไกลเคน (peptididoglycan) และไลโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งขัดขวางไม่ให้จุลินทรีย์ถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปยังขั้วแอโนดได้โดยตรง (Du และคณะ, 2007) แต่มีจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Geobacter sulfurreducens* (Magnuson และคณะ, 2001) และ *Shewanella putrefaciens* (Myers และคณะ, 1992) สามารถถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ด้วยตัวเอง ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีไซโตโครมอยู่ที่ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นจำนวนมาก ทำหน้าที่ช่วยให้เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากเซลล์จุลินทรีย์ไปยังขั้วแอโนด



(ก)



(ข)



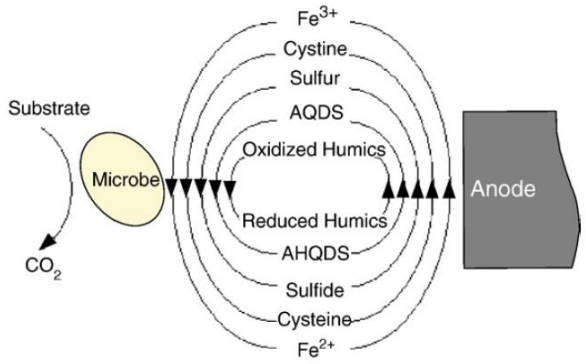
(ค)

ภาพที่ 2.7 ภาพ ก แสดงการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ไซโตโครม (cytochromes)
ภาพ ข แสดงการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้เส้นลวดนาโน (nanowire)
ภาพ ค แสดงการส่งผ่านอิเล็กตรอนโดยใช้ตัวกลาง (mediator)
(Rinaldi และคณะ 2008)

- การถ่ายโอนอิเล็กตรอนด้วยตัวกลางหรือเมดิเอเตอร์ (mediator) (ภาพที่ 2.7ค)

การเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากภายในเซลล์จุลินทรีย์ไปยังขั้วแอโนด สามารถทำได้โดยการใช้เมดิเอเตอร์ เช่น นิวทรอลเรด (neutral red) และเมธิลีนบลู (methyleneblue) เป็นต้น โดยเมดิเอเตอร์จะแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์และนำเอาอิเล็กตรอนออกมานอกเซลล์ในรูปของรีดิวซ์เมดิเอเตอร์ (reduced mediator) และปลดปล่อยอิเล็กตรอนไปยังขั้วแอโนด ในปี 2003 Park และ Zeikus ใช้นิวทรอลเรดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก *Escherichia coli* ไปยังขั้วแอโนด นอกจากนี้ ยังมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเมดิเอเตอร์ให้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นนำไปใช้ได้ ตัวอย่าง เช่น *Pseudomonas aeruginosa* สามารถผลิตฟีนาซีน (phenazine) เพื่อกระตุ้นการถ่ายโอนอิเล็กตรอนสำหรับแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ (Rabaey และคณะ 2004)

แต่อย่างไรก็ตามเมดิเอเตอร์ ก็มีข้อเสียเช่นกัน คือมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ บางชนิดก็เป็นพิษต่อมนุษย์ และยังเป็นการเพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิตกระแสไฟฟ้า



ภาพที่ 2.8 แสดงแบบจำลองการทำงานของตัวอย่างสารประกอบเคมีที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากจุลินทรีย์ให้กับขั้วไฟฟ้าฟ้า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งรีดักชันและออกซิเดชันจึงใช้หมุนเวียนได้ (Du และคณะ 2007)

- การถ่ายโอนอิเล็กตรอนผ่านเส้นลวดนาโนของแบคทีเรีย (ภาพที่ 2.7ข)

มีการค้นพบว่าเส้นลวดนาโนของแบคทีเรียซึ่งมีโครงสร้างคล้ายเส้นผม (pilus-like) พบอยู่ที่ผนังเซลล์ชั้นนอกของจุลินทรีย์ มีคุณสมบัตินำไฟฟ้า และอาจเกี่ยวข้องโดยตรงต่อการถ่ายโอนอิเล็กตรอน โดยมีการพบเส้นลวดนาโนใน *Geobactor sulfurreducens PCA, Shewanella oneidensis MR-1*, สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechocystis sp. PCC6803* และ *Pelotomaculum thermopropionicum* (Gorby และคณะ 2006) (Reguera และคณะ 2003)

2.3 วัสดุและการออกแบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

ส่วนประกอบพื้นฐานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ประกอบด้วยส่วนประกอบหลักได้แก่ ขั้วไฟฟ้าห้องขั้วไฟฟ้าแอโนด และเยื่อเลือกผ่านอิเล็กตรอน วัสดุที่ใช้ประกอบเป็นเซลล์เชื้อเพลิงนั้นมีหลากหลายชนิดดังแสดงในตาราง 2.1 การเลือกใช้วัสดุและการออกแบบการใช้งานจึงมีความสำคัญเพื่อลดค่าใช้จ่ายและได้ประสิทธภาพการทำงานที่ดีที่สุด

Items	Materials	Remarks
Anode	Graphite, graphite felt, carbon paper, carbon-cloth, Pt, Pt black, reticulated vitreous carbon (RVC)	Necessary
Cathode	Graphite, graphite felt, carbon paper, carbon-cloth, Pt, Pt black, RVC	Necessary
Anodic chamber	Glass, polycarbonate, Plexiglas	Necessary
Cathodic chamber	Glass, polycarbonate, Plexiglas	Optional
Proton exchange system	Proton exchange membrane: Nafion, Ultrex, polyethylene.poly (styrene-co-divinylbenzene); salt bridge, porcelain septum, or solely electrolyte	Necessary
Electrode catalyst	Pt, Pt black, MnO_2, Fe^{3+}, polyaniline, electron mediator immobilized on anode	Optional

ตาราง 2.1 แสดงชนิดวัสดุที่ใช้เป็นส่วนประกอบของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ (Du และคณะ 2007)

2.3.1 ขั้วไฟฟ้า

การเลือกใช้วัสดุในการทำขั้วไฟฟ้านั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการนำไฟฟ้า ยิ่งมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าดีก็จะมีราคาแพง ซึ่งขั้วไฟฟ้าที่แตกต่างกันทั้งลักษณะและวัสดุนั้นจะส่งผลต่อการดึงอิเล็กตรอนจากจุลินทรีย์ต่างกัน รวมทั้งการยึดเกาะของจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าด้วย วัสดุที่นำมาใช้เป็นขั้วไฟฟ้านั้นมีหลากหลายชนิดได้แก่ สแตนเลส (Dumas และคณะ 2007) แกรไฟต์ (Rabaey และคณะ 2003) และแผ่นผ้าคาร์บอน (Liu และคณะ 2005) เป็นต้น มีงานวิจัยพบว่าการใช้แผ่นผ้าคาร์บอนเป็นขั้วไฟฟ้าแอโนดสามารถผลิตไฟฟ้าได้ดี เนื่องจากลักษณะของพื้นที่ผิวที่เหมาะสมกับการยึดเกาะของจุลินทรีย์ทำให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนเกิดขึ้นได้ดีกว่าการเลือกใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดที่เป็นผิวเรียบ และในปี 2007 sarinee และคณะ ได้ศึกษาค่าอิมพิแดนซ์ซึ่งเป็นค่าความต้านทานระหว่างรอยต่อของขั้วไฟฟ้ากับสารละลาย ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ โดยพบว่าผ้าเส้นใยคาร์บอนมีค่าอิมพิแดนซ์ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับสแตนเลสทำให้การถ่ายโอนอิเล็กตรอนเกิดขึ้นได้สะดวก

2.3.2 ห้องขั้วไฟฟ้า

วัสดุที่นำมาประกอบเป็นห้องขั้วไฟฟ้าสามารถเลือกใช้ได้หลากหลายแต่ต้องมีคุณสมบัติที่ทนทานโดยเฉพาะในห้องขั้วแอโนดนั้นจะมีสภาพเป็นกรดเนื่องจากกระบวนการย่อยสลายสารอาหารในระบบเกิดเป็นอิเล็กตรอนและโปรตรอนจำนวนมาก วัสดุที่เลือกใช้จึงต้องมีคุณสมบัติที่สามารถทนสภาวะเป็นกรดได้ ตัวอย่างเช่น แก้ว หรือ อะคริลิก เป็นต้น นอกจากนี้การออกแบบและประกอบเป็นเซลล์เชื้อเพลิงนั้นก็มี

ความสำคัญเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพการทำงานสูงสุด มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับการออกแบบเซลล์เชื้อเพลิง มีการออกแบบโดยไม่มีห้องแคโทดและให้ขั้วแคโทดสัมผัสกับอากาศโดยตรงไม่ใช้เมมเบรน หรือทำเป็นชุดเซลล์เพื่อให้ทำงานได้พร้อมกันหลายๆชุดเพื่อเพิ่มกำลังการผลิตไฟฟ้า (Logan, 2008)

2.3.3 การออกแบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

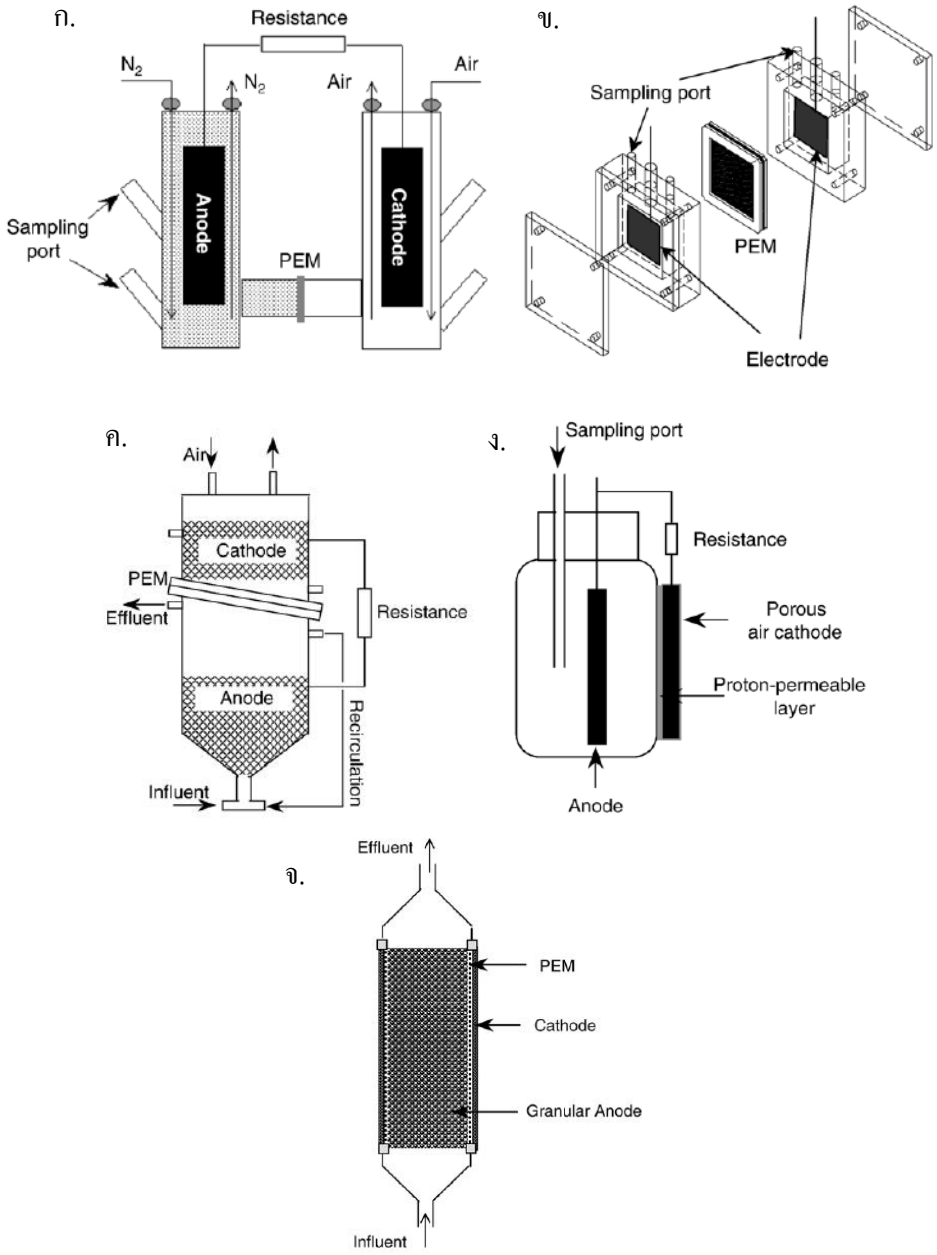
ปัจจุบันมีการศึกษาเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์อย่างกว้างขวางมีการออกแบบรูปทรงที่ซับซ้อนและปรับปรุงอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการทำงานที่ดีที่สุด สามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างออกเป็น 2 แบบดังนี้

2.3.3.1 เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่

เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่สามารถทำงานได้ทั้งแบบกะ (batch) และแบบต่อเนื่อง และนิยมใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ (Du และคณะ 2007) โดยเซลล์เชื้อเพลิงชนิดนี้ประกอบด้วยห้องแอโนดและห้องแคโทดที่กั้นกลางด้วยแผ่นเยื่อเลือกผ่านโปรตอน (proton exchange membrane) หรือในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์บางชนิดอาจใช้สะพานเกลือ (salt bridge) ที่ยอมให้โปรตอนเคลื่อนที่ผ่านเป็นตัวเชื่อมระหว่างห้องแอโนดและห้องแคโทด โปรตอนจะสามารถเคลื่อนที่ผ่าน แผ่นเยื่อเลือกผ่านไปยังห้องแคโทดได้ แต่ออกซิเจนในห้องแคโทดไม่สามารถผ่านไปยังห้องแอโนดได้ เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์บางชนิดจะใช้น้ำเป็นสารอิเล็กโทรไลต์ในห้องแคโทด หรือแคโทรไลต์ (catholyte) โดยจะพ่นอากาศผ่านน้ำเพื่อให้ได้ออกซิเจนละลายในน้ำส่งไปที่ขั้วแคโทด หรืออาจเพิ่มประสิทธิภาพด้วยการเติมสารบางอย่างในห้องแคโทดเพื่อช่วยดึงอิเล็กตรอนให้ไหลไปได้สะดวกขึ้นไม่ถูกจำกัดปฏิกิริยาไว้ ตัวอย่างเช่น เปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) พบว่าเมื่อเติมเปอร์แมงกาเนต 0.1 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความหนาแน่นกำลังไฟฟ้าสูงสุด 115.60 มิลลิวัตต์ต่อตารางเมตร (You และคณะ 2006) (ศุกร์นิมิต, 2553)

2.3.3.2 เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องเดี่ยว

เนื่องจากเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่มีความซับซ้อนในการออกแบบเพื่อขยายขนาด และจำเป็นต้องเติมสารแคโทรไลต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ จึงมีการออกแบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องเดี่ยวมาใช้งาน มีงานศึกษาวิจัยพบว่าห้องแคโทดนั้นไม่จำเป็นต้องมีน้ำบรรจุอยู่ภายในและไม่จำเป็นต้องเป็นส่วนที่แยกออกมาชัดเจน (Logan และคณะ, 2006) เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบ



ภาพที่ 2.9 ภาพ ก, ข และ ค แสดงการออกแบบเซลล์เชื่อเพลิงแบบห้องคู่

แบบ ก เป็นทรงกระบอก ประกอบเป็นรูปทรงตัวเอช (Min และคณะ, 2005a, b)

แบบ ข เป็นรูปสี่เหลี่ยมมุมฉาก ประกอบเป็นกล่องขนาดเล็ก (Delaney และคณะ, 1984)

แบบ ค เป็นรูปทรงกระบอกประยุกต์กับระบบ Upflow (Ringeisen และคณะ, 2006)

ภาพ ง และ จ แสดงการออกแบบเซลล์เชื้อเพลิงแบบห้องเดี่ยว

แบบ ง เป็นรูปทรงกระบอก แคโทดอยู่ภายนอกสัมผัสอากาศโดยตรง (Park และ Zeikus, 2003)

แบบ จ ลักษณะเป็นท่อกลวง และใช้ระบบ Upflow (Rabaey และคณะ, 2005)

ห้องเดี่ยวจึงประกอบด้วยห้องแอโนด และส่วนห้องแคโทดจะไม่มีการให้อากาศ เนื่องจากขั้วแคโทดสัมผัสกับอากาศโดยตรง โปรตอนจะถูกส่งถ่ายจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในห้องแอโนดไปยังขั้วแคโทดซึ่งถูกติดตั้งไว้ที่ด้านนอกของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องเดี่ยว โดยที่เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องเดี่ยวนี้จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่ เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ในการถ่ายโอนมวลของออกซิเจนในอากาศมีค่าสูงกว่าในน้ำ (Khanal, 2008) และเยื่อแผ่นเลือกผ่านโปรตอนในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องเดี่ยวจะทำหน้าที่ป้องกันการแพร่ของออกซิเจนเข้าไปยังห้องแอโนด

2.4 ปัจจัยที่มีผลกับการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

2.4.1 สารอาหารหรือแหล่งคาร์บอน

ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่าง หรือปริมาณที่ให้กับระบบนั้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตกระแสไฟฟ้า สามารถกำหนดเป็นความเข้มข้นของอาหาร อัตราการไหลเข้าระบบเซลล์เชื้อเพลิงหรือระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ เป็นต้น

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น	กระแสไฟฟ้าที่ผลิตได้ (มิลลิแอมแปร์ต่อตารางเซนติเมตร)	อ้างอิง
อะซิเตท (Acetate)	1 กรัมต่อลิตร	0.8	Logan และคณะ 2007
กลูโคส	6.7 มิลลิโมลาร์	0.7	Catal และคณะ 2008
ซูโครส (Sucrose)	2674 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.19	Behera และ Ghangrekar 2009
น้ำเสียโรงงานช๊อกโกแลต	1459 มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร	0.302	Patil และคณะ 2009
น้ำเสียโรงงานแป้ง	4852 มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร	0.09	Lu และคณะ 2009

ตาราง 2.2 แสดงตัวอย่างของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

จากงานวิจัยที่แสดงในตาราง 2.2 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด แต่ความเข้มข้นของสารอาหารที่ต่างกันก็ส่งผลต่อการผลิตกระแสไฟฟ้ามากน้อยต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้ความเข้มข้นของอาหาร รวมไปถึงอัตราการให้อาหารที่มีความสมดุลและเหมาะสมกับจุลินทรีย์นั้นๆ จึงเป็นตัวแปรสำคัญอย่างหนึ่งที่ควรคำนึงในกระบวนการผลิตไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิง

2.4.2 ความเป็นกรดด่าง

ความเป็นกรดด่างนั้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นมีความสามารถในการเจริญได้ในช่วงค่าความเป็นกรดด่างต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดจะเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างต่ำ (Acidophiles) บางชนิดเจริญได้ดีที่ช่วงความเป็นกรดด่างเป็นกลางหรือมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 (Neutralophiles) และบางชนิดเจริญได้ดีที่สภาวะเป็นด่าง (Alkalophiles) การเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นเวลานานจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายอาหารเปลี่ยนไป เนื่องจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และมีการปล่อยสารบางอย่างออกมาซึ่งเป็นได้ทั้งกรดและด่าง ทำให้ไปขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบ จึงต้องมีการเติมสารบางอย่างเพื่อไปทำหน้าที่รักษาสมดุลความเป็นกรดด่างในสารละลายอาหาร หรือทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์นั่นเอง ตัวอย่างสารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 (ศุกร์นิมิต, 2553)

นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดด่างที่ต่างกันระหว่างห้องขั้วไฟฟ้าแอโนดและแคโทดนั้นก็มีความสำคัญเพราะส่งผลต่อเกรเดียนต์ (Gradient) ของความเป็นกรดด่าง มีผลทำให้การไหลของโปรตอนจากห้องขั้วไฟฟ้าแอโนดไปยังห้องขั้วไฟฟ้าแคโทดได้ดี

2.4.3 อุณหภูมิ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (Psychophiles) บางชนิด สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส (Mesophiles) และบางชนิด สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (Thermophiles) ดังนั้นอุณหภูมิที่เลือกใช้นั้นจำเป็นต้องเป็นอุณหภูมิเฉพาะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด จะทำให้ปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆภายในเซลล์สามารถดำเนินไปได้อย่างต่อเนื่องและไม่ส่งผลต่อเสถียรภาพของโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆที่ผลิตขึ้นจากตัวเซลล์เอง (จุฑากานต์, 2552)

2.4.4 เยื่อเลือกผ่านอิเล็กตรอน

มีงานวิจัยที่กล่าวว่าการใช้เมมเบรนนั้นช่วยเพิ่ม ค่า coulombic efficiency (Rae และคณะ 2007) ค่า coulombic efficiency บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ได้จากสารตั้งต้นสู่ขั้วไฟฟ้าแล้วได้เป็นพลังงานออกมา เป็นการอธิบายถึงอัตราการเปลี่ยนอิเล็กตรอนทั้งหมดในสารอินทรีย์ตั้งต้นเป็นกระแสไฟฟ้า แต่ในทางกลับกันการเลือกใช้เมมเบรนก็เป็นการเพิ่มความต้านทานภายในระบบแทนซึ่งจะทำให้ได้กำลังไฟฟ้าน้อยลง (Logan, 2008) นอกจากนี้ความหนาบางของแผ่นเมมเบรน ก็มีความสำคัญ ความหนา

หรือบางของเมมเบรนจะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของโปรตอน ซึ่งเมมเบรนที่มีขนาดบางจะทำให้โปรตอนเคลื่อนที่ผ่านได้เร็วกว่าเมมเบรนที่มีขนาดหนา

2.4.5 จุลินทรีย์

การทำงานของจุลินทรีย์คือการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับขั้วไฟฟ้าด้วยกระบวนการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยจุลินทรีย์ที่ลอยอยู่ในสารละลายหรือโดยจุลินทรีย์ที่เกิดเป็นแผ่นฟิล์มชีวภาพบนขั้วไฟฟ้า การเกิดแผ่นฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) คือการที่จุลินทรีย์เกาะรวมกันที่ขั้วแอโนด มีลักษณะเป็นฟิล์ม แต่การเกิดเป็นแผ่นฟิล์มที่มีความหนามากเกินไปจะ ทำให้อิเล็ กตรอนเคลื่อนที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร การเกิดกระแสไฟฟ้าก็จะน้อยลงด้วย การออกแบบขั้วไฟฟ้าในห้องแอโนดเพื่อให้ได้กระแสไฟฟ้ามากๆจึงมีความสำคัญ

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าในเซลล์เชื้อเพลิงได้นั้นมีทั้งจุลินทรีย์ชนิดเดี่ยวและชนิดผสม ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ชนิดผสมนั้นจะไม่จำเพาะกับสารอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งทำให้เกิดความหลากหลายในการทำงานมากกว่าเพราะสามารถประยุกต์ใช้กับแหล่งอาหารหลายชนิด แต่การใช้จุลินทรีย์ชนิดเดี่ยวก็ทำให้สามารถศึกษากลไกการทำงานของจุลินทรีย์นั้นๆภายในเซลล์เชื้อเพลิงได้อย่างเฉพาะเจาะจง

2.5 ประเภทการสูญเสียไฟฟ้าของระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

เมื่อมีการดึงกระแสจากระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์จะส่งผลต่อค่าความต่างศักย์ของระบบคือ เกิดการสูญเสียความต่างศักย์ (Voltage losses) ซึ่งเกิดจากเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์เป็นการสูญเสียพลังงานที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ การสูญเสียพลังงานดังกล่าวเป็นผลมาจากการการใช้พลังงานของจุลินทรีย์ในการออกซิเดชันหรือการย่อยสลายสารอาหารนั่นเอง โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ต้องการพลังงานในกระบวนการเมทาบอลิซึมอย่างเพียงพอ ส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์จะใช้พลังงานจากวัฏจักรเครบส์

การสูญเสียจากการกระตุ้น (Activation losses) เป็นการสูญเสียพลังงานจากความช้าของอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีในการเริ่มต้นปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของเซลล์ และปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากเซลล์สู่ขั้วไฟฟ้าผ่านเอนไซม์หรือโปรตีนของเซลล์ การสูญเสียพลังงานนี้จะพบในช่วงความหนาแน่นกระแสต่ำๆ ซึ่งสามารถลดการสูญเสียได้โดยการเติมคะตะลิสต์ในฝั่งห้องแคโทด และปรับปรุงการถ่ายทอดอิเล็กตรอนระหว่างจุลินทรีย์และขั้วไฟฟ้าแอโนด นอกจากนี้การเลือกใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดก็มีผลต่อการสูญเสียในส่วนนี้ด้วยเช่นกัน

การสูญเสียจากความต้านทาน (Ohmic lossses) การสูญเสียนี้เกิดจากความต้านทานการนำไฟฟ้าของประจุในสารละลาย เยื่อเลือกผ่านโปรตอน และการไหลของอิเล็กตรอนผ่านจุดเชื่อมต่อระหว่างขั้วไฟฟ้ากับ

สายไฟฟ้า ซึ่งการสูญเสียนี้มีความสำคัญต่อการออกแบบเซลล์เชื้อเพลิง เราสามารถลดการสูญเสียนี้ด้วยการลดระยะห่างของขั้วไฟฟ้า การเลือกเยื่อเลือกผ่านโปรตอน การเคลือบขั้วไฟฟ้าเพื่อลดการต้านทาน การตรวจสอบจุดเชื่อมต่อในวงจรให้มีประสิทธิภาพ และการเพิ่มประสิทธิภาพของการนำไฟฟ้าในสารละลายและบัฟเฟอร์ (ศุกร์นิมิต, 2553)

จากประเภทการสูญเสียไฟฟ้าของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ทั้งหมดจะเห็นได้ว่าการสูญเสียไฟฟ้าในช่วงแรกนั้นมาจากเมทามอลิซึมของจุลินทรีย์เป็นหลัก ปัจจัยที่มีผลต่อเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์นั้นก็คือแหล่งอาหาร หรือแหล่งคาร์บอน ดังนั้นการควบคุมอัตราการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของแหล่งอาหารจึงมีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ โดยขึ้นกับชนิดของแหล่งอาหาร ปริมาณจุลินทรีย์ภายในเซลล์เชื้อเพลิง อัตราการเกิดปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ (Kinetics) รวมถึงระยะกักพักทางชลศาสตร์ หรือระยะการกักเก็บน้ำเสียในระบบ (Hydraulic retention time) (Rabaey และคณะ, 2003) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ เหล่านี้จะช่วยให้สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้ดีและยังบำบัดสารอินทรีย์ได้อีกด้วย

2.6 น้ำเสีย

น้ำเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิต น้ำถูกนำมาใช้ในการอุปโภคและบริโภค เมื่อใช้แล้วก็จะถูกปล่อยทิ้งออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติอีกครั้งหนึ่ง ระบบหมุนเวียนดังกล่าว นี้ก่อให้เกิดปัญหาขึ้น เมื่อน้ำถูกนำมาใช้ในครัวเรือน การเกษตร และอุตสาหกรรมในอัตราสูง และถูกปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำในลักษณะของน้ำเสีย โดยไม่ผ่านการบำบัด ซึ่ง มีปริมาณมากเกินขีดความสามารถที่แหล่งน้ำธรรมชาติจะปรับ สภาพตามธรรมชาติ หรือทำความสะอาดด้วยตนเอง (Self purification) ทำให้แหล่งน้ำมีคุณภาพ แย่ลงและในที่สุดก็กลายเป็นน้ำเน่าเสีย สิ่งมีชีวิตที่เคยอาศัยอยู่ในน้ำก็ไม่ สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถนำมาใช้อุปโภคบริโภคหรือนำมาใช้ทางเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมได้อีกต่อไป

ปัจจุบันประชากรในประเทศไทยและทั่วโลกเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากจึงทำให้ปัญหาน้ำเสียทวีความรุนแรงขึ้นทุก วัน โดยเฉพาะแหล่งน้ำที่อยู่ในบริเวณแหล่งชุมชนขนาดใหญ่รวมทั้งแหล่งอุตสาหกรรมและแหล่งเกษตรกรรม ตามมาตรา 4 ใน พ.ร.บ. ส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมปี พ.ศ. 2535 ได้ให้คำนิยามของน้ำเสีย หมายถึง ของเสียที่อยู่ในสภาพเป็นของเหลวรวมทั้งม วลสารที่ปะปนหรือปนเปื้อนอยู่ในของเหลวทำให้ก่อเกิดภาวะมลพิษทางน้ำในแหล่งน้ำที่สำคัญของประเทศต่างๆ น้ำเสีย ตามความหมายทั่วไปจึง หมายถึงน้ำที่มีสารใด ๆ หรือสิ่งปฏิกูลที่ไม่พึงปรารถนาปนอยู่ ซึ่งการปนเปื้อนของสิ่งสกปรกเหล่านี้ จะทำให้คุณสมบัติของน้ำเปลี่ยนแปลงไปจนอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้ สิ่งปนเปื้อนที่อยู่ในน้ำ

เสีย ได้แก่ น้ำมัน ไขมัน ผงซักฟอก สบู่ ยาฆ่าแมลง สารอินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเหม็นและเชื้อโรคต่าง ๆ สำหรับแหล่งที่มาของน้ำเสียสามารถแบ่งได้เป็น 2 แหล่งใหญ่ ๆ ดังนี้

- น้ำเสียจากแหล่งชุมชน มาจากกิจกรรมสำหรับการดำรงชีวิตของมนุษย์ เช่น อาคารบ้านเรือน หมู่บ้านจัดสรร คอนโดมิเนียม โรงแรม ตลาดสด โรงพยาบาล เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าความเน่าเสียของน้ำในคลองเกิดจากน้ำเสียประเภทนี้ถึง 75%

- น้ำเสียจากกิจกรรมอุตสาหกรรม ได้แก่น้ำเสียจาก กระบวนการ ผลิตของโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งน้ำหล่อเย็นที่มีความร้อนสูง และน้ำเสียจากห้องน้ำของคนงานด้วย ความเน่าเสียของ น้ำในคลองเกิดจากน้ำเสียประเภทนี้ประมาณ 25% แม้จะมีปริมาณไม่มากนัก แต่สิ่งสกปรกในน้ำเสียจะเป็นพวกสารเคมีที่เป็นพิษและพวกโลหะหนักต่างๆรวมทั้งพวกสารอินทรีย์ต่างๆที่มีความเข้มข้นสูงด้วย

กรรมวิธีในการบำบัดน้ำเสียจึงจำเป็นในการนำมาใช้บำบัดน้ำเสียให้เป็นน้ำที่สะอาดก่อนปล่อยทิ้ง เป็นวิธีการหนึ่งในการแก้ไขปัญหาแม่น้ำลำคลองเน่าเสีย โดยอาศัยกรรมวิธีต่างๆเพื่อลดหรือทำลายความสกปรกที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำได้แก่ ไขมัน น้ำมัน สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ สารพิษ รวมทั้งเชื้อโรคต่างๆให้หมดไปหรือให้เหลือน้อยที่สุดเมื่อปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำก็จะไม่ทำให้แหล่งน้ำนั้นเน่าเสียอีกต่อไป เนื่องจากน้ำเสียมีแหล่งที่มาแตกต่างกันจึงทำให้มีปริมาณและความสกปรกของน้ำเสียแตกต่างกันไปด้วย การปรับปรุงคุณภาพของน้ำเสียจำเป็นจะต้องเลือกวิธีการที่เหมาะสม หรือนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ตัวอย่างเช่นการนำมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงให้กับเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ เป็นการกำจัดปัญหาน้ำเสียและยังได้พลังงานไฟฟ้ามาใช้งานอีกด้วย

2.6.1 ลักษณะของน้ำเสีย

ลักษณะของน้ำเสียสามารถจำแนกออกเป็น 3 ลักษณะ คือ

ลักษณะน้ำเสียทางกายภาพ (Physical Characteristics) จะประกอบไปด้วยปริมาณของแข็งทั้งหมด กลิ่น อุณหภูมิ สี และความขุ่น ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของน้ำเสียทางกายภาพได้

- ปริมาณของแข็งทั้งหมด ประกอบด้วยปริมาณของแข็งที่แขวนลอย (Total Suspended Solids: TSS) และปริมาณของแข็งละลาย (Total Dissolved Solids: TDS) ค่าปริมาณของแข็งจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสกปรกและความหนาแน่นของน้ำเสียได้ และยังสามารถบอกถึงประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียต่างๆ ที่เลือกใช้ในการบำบัดได้

- กลิ่น ส่วนมากมาจากก๊าซที่เกิดจากการย่อยสลายของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เช่น ก๊าซไข่เน่า เกิดจากจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจน โดยทำการเปลี่ยนสภาพของซัลเฟตไปเป็นซัลไฟด์ ในการกำจัดกลิ่นในน้ำเสียอาจใช้สารเคมีที่สามารถออกซิไดซ์สารที่ทำให้เกิดกลิ่นได้ เช่น คลอรีน หรือการใช้ผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon)

- อุณหภูมิของน้ำ เมื่อน้ำมีอุณหภูมิสูงมากขึ้นกว่าปกติจะมีผลทำให้ปฏิกิริยาชีวเคมีของพวกจุลินทรีย์สูงขึ้นตามไปด้วย ทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำถูกใช้เพิ่มมากขึ้นและทำให้การเจริญเติบโตของพืชที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำมีมากกว่าปกติ นอกจากนี้ยังมีผลให้การละลายของออกซิเจนในน้ำลดลง เนื่องจากค่าอิ่มตัวของออกซิเจนในน้ำจะลดลงเมื่อน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้น

- สี สีของน้ำเสียเป็นปัญหาเนื่องจากโรงงานหลายแห่ง เช่น โรงงานทอผ้า โรงงานสีย้อมและอื่นๆ ปล่อยน้ำเสียออกมา หรือสีเขียวซึ่งเกิดจากการเกิดสาหร่ายจำนวนมากในแหล่งน้ำ ทำให้เกิดผลเสียคือจะเป็นตัวกั้นขวางแสงแดดไม่ให้ส่องลงใต้น้ำ ทำให้แหล่งน้ำมีสีไม่น่าดูเนื่องจากสามารถมองเห็นสีของน้ำเสียได้ด้วยตาเปล่า

- ความขุ่น เกิดจากการมีสารแขวนลอยที่ลอยอยู่ในน้ำ กั้นหรือขวางแสงแดดไม่ให้ส่องลงใต้น้ำได้มากกว่า 100% เช่นเดียวกันกับสี น้ำที่มีความขุ่นมากจะทำให้ยากต่อการกรองน้ำ

ลักษณะน้ำเสียทางเคมี (Chemical Characteristics) ประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ น้ำเสียที่มาจากบ้านเรือน จะประกอบด้วยสารอินทรีย์ 50% และ สารอนินทรีย์ 50%

- สารอินทรีย์ ส่วนประกอบที่สำคัญของสารอินทรีย์ในน้ำเสียจากชุมชน ได้แก่คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน น้ำมัน และปริมาณเล็กน้อยของผงซักฟอก สารประกอบฟีนอลและยาปราบศัตรูพืช

- สารอนินทรีย์ ได้แก่ คลอไรด์ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โลหะหนัก ก๊าซ และสภาพความเป็นกรดด่างของน้ำเสีย เป็นต้น

- คลอไรด์ ค่าความเข้มข้นของคลอไรด์ในน้ำเสีย ถ้ามีไม่มากจนเกินไปจะไม่มีอันตรายต่อมนุษย์ แต่จะมีผลทำให้น้ำมีรสเค็มเท่านั้น โดยปกติในน้ำประปา กำหนดให้มีความเข้มข้นของคลอไรด์ไม่เกิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ไนโตรเจน ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญธาตุหนึ่งต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ ดังนั้นในกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยวิธีทางชีวภาพจำเป็นต้องมีไนโตรเจนอย่างพอเพียงแต่ถ้ามี

มากเกินไปจะมีผลทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตมา ก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมปริมาณไนโตรเจนในน้ำให้เหมาะสม

- ฟอสฟอรัส เป็นธาตุหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในน้ำเช่นเดียวกับไนโตรเจน ดังนั้นจึงต้องควบคุมปริมาณของฟอสฟอรัสให้เหมาะสม เพราะสามารถ ก่อปัญหาน้ำเน่าเสียได้เช่นเดียวกับไนโตรเจน

- พีเอช (pH) เป็นค่าที่แสดงปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคไฮโดรเจน [H^+] ในน้ำ ใช้บอกความเป็นกรดหรือด่างของน้ำทิ้ง เป็นค่าที่มีความสำคัญในการบำบัดด้วยวิธีการทางเคมี ฟิสิกส์ และชีววิทยา จึงจำเป็นต้องควบคุมค่าพีเอชของน้ำทิ้งให้คงที่หรือควบคุมให้อยู่ในช่วงที่กำหนดไว้

- สภาพกรดและสภาพด่าง (acidity and alkalinity) สภาพกรดของสารละลายใดๆ คือความสามารถของสารละลายนั้นในการแตกตัวให้โปรตอน น้ำทิ้งที่มีสภาพกรด คือ เมื่อ คำนวณเป็นมิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตรของแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีค่าพีเอชต่ำกว่า 8.2 สภาพด่างของสารละลายใดๆ คือความสามารถของสารละลายนั้นในการรับโปรตอน น้ำทิ้งที่มีสภาพด่าง คือ เมื่อคำนวณเป็นมิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตรของแคลเซียมคาร์บอเนต จะมีพีเอชสูงกว่า 4 ดังนั้นสภาพด่างของน้ำธรรมชาติหรือน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว เกิดขึ้นจากองค์ประกอบของสารละลายไบคาร์บอเนต คาร์บอเนตและไฮดรอกไซด์

- ซัลเฟอร์ มีอยู่ในน้ำธรรมชาติและในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เนื่องจากเป็นองค์ประ กอบในกรดอะมิโนของโปรตีน ซัลเฟอร์ที่มีอยู่ในน้ำเสียจะอยู่ในรูปของ สารประกอบอินทรีย์กำมะถัน (organic sulfur) เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟต์ ธาตุซัลเฟอร์และสารซัลเฟต เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหากลิ่นเหม็นจากการย่อยสลายน้ำเสียและการกัดกร่อนต่อสภาพแวดล้อม

- โลหะ เป็นสารซึ่งมีพิษต่อสิ่งมีชีวิต แต่ ก็มีโลหะหนักบางชนิดที่มีความจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต แต่ต้องได้รับในปริมาณที่พอเหมาะถ้ามากเกินไปจะเป็นพิษ ได้แก่ โครเมียม ทองแดง เหล็ก แมงกานีส และสังกะสี เป็นต้น สำหรับโลหะหนักบางชนิดที่ไม่เป็นที่ต้องการและเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ได้แก่ แคดเมียม ตะกั่ว ปรอท และนิกเกิล เป็นต้น

- ก๊าซ ที่พบในน้ำเสียโดยมากจะเป็นพวกไนโตรเจน ออกซิเจน คาร์บอน ไดออกไซด์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ แอมโมเนีย และมีเทน ซึ่งก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไม่มีอากาศ (anaerobic) และตัวการที่ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นในน้ำเสีย คือ

ไฮโดรเจนซัลไฟด์ แอมโมเนียและมีเทน ถ้าสารซัลไฟด์ไปรวมตัวกับเหล็กจะเกิดเป็นเฟอรัสซัลไฟด์ ซึ่งทำให้น้ำเสียมีสีดำเกิดขึ้น

- ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen: DO) ออกซิเจนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ น้ำธรรมชาติที่มีคุณสมบัติดีจะมีค่า DO ประมาณ 5-7 ppm (part per million) แต่ถ้าน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้การละลายของออกซิเจนลดลง หรือถ้าในน้ำมีสิ่งมีชีวิตที่ต้องการออกซิเจนมากก็ จะมีผลทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงเช่นกัน ดังนั้นค่าความต้องการออกซิเจนในน้ำจึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของน้ำ ได้แก่ ความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี เป็นค่าที่ใช้วัดปริมาณออกซิเจน ที่แบคทีเรียใช้เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ ความต้องการออกซิเจนทางเคมี (Chemical Oxygen Demand: COD) เป็นค่าที่ใช้วัดปริมาณสารอินทรีย์ที่มีในน้ำด้วยวิธีทางเคมี

ลักษณะน้ำเสียทางชีววิทยา (Biological Characteristics) ประกอบด้วยจุลินทรีย์มากมายหลายชนิดเจือปนอยู่ จุลินทรีย์ที่พบในน้ำเสียทั่วๆไป ได้แก่ แบคทีเรีย สาหร่าย ฟังไจ โปรโตซัว โรทีเฟอร์ คัสตาเชี่ยน และไวรัส เป็นต้น แหล่งน้ำที่มีคุณภาพต่างกันจะพบชนิด ปริมาณและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะของแหล่งน้ำนั้น ดังนั้นจึงมีการใช้สิ่งมีชีวิตเหล่านี้เป็นตัวบ่งบอกคุณภาพน้ำหรือเรียกว่า ดัชนีชีวภาพ (Biological Indicators) สิ่งมีชีวิตในน้ำสามารถแบ่งกลุ่มออกได้ดังนี้

แบ่งตามแหล่งอินทรีย์ที่ใช้มาเป็นอาหาร สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่

- ออโทโทรฟิกแบคทีเรีย สามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่ต้องการโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง
- เฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย ต้องอาศัยสารอินทรีย์จากแหล่งภายนอก

แบ่งตามความต้องการออกซิเจน แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

- แอโรบ (Aerobes) ต้องดำรงชีวิตในที่มีออกซิเจน
- แอนแอโรบ (Anaerobes) ดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจนอิสระ
- แฟคคัลเททีฟ (Facultative) สามารถดำรงชีวิตได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนอิสระ

ลักษณะของน้ำเสีย	ปริมาณเฉลี่ยที่พบ
น้ำ	99.9%
สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์	0.1%
บีโอดี	200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซีโอดี	400 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอน	100 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปริมาณของแข็ง	200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปริมาณไนโตรเจน	30 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปริมาณฟอสฟอรัส	5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด	500 มิลลิกรัมต่อลิตร
ความขุ่น	ขุ่น
สีและกลิ่น	สีน้ำตาลหรือสีเทาอ่อน
สารพิษ	สารอินทรีย์และโลหะ
จุลินทรีย์	เชื้อก่อโรคและปรสิต

ตาราง 2.3 ตารางแสดงลักษณะทั่วไปของน้ำเสีย (สุบัณฑิต, 2550)

วิธีการบำบัดน้ำเสียจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดการเกิดภาวะมลพิษทางน้ำ เพราะการบำบัดน้ำเสียมีวัตถุประสงค์ใหญ่ๆ 2 ข้อคือ เพื่อป้องกันการเกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำและแหล่งธรรมชาติต่างๆ เพราะน้ำเสียประกอบด้วยสารปนเปื้อนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ และเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคทางน้ำชนิดต่างๆ เพราะในน้ำเสียโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำเสียจากแหล่งชุมชนมักจะมีเชื้อก่อโรคหลากชนิด

2.6.2 ระบบบำบัดน้ำเสีย

การบำบัดน้ำเสียให้เป็นน้ำที่สะอาดก่อนปล่อยทิ้งเป็นวิธีการหนึ่งในการแก้ไขปัญหาแม่น้ำลำคลองเน่าเสีย โดยอาศัยกรรมวิธีต่าง ๆ เพื่อลดหรือทำลายความสกปรกที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำได้แก่ ไขมัน น้ำมัน สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ สารพิษ รวมทั้งเชื้อโรคต่างๆ ให้หมดไปหรือให้เหลือน้อยที่สุดเมื่อปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำก็จะไม่ทำให้แหล่งน้ำนั้นเน่าเสีย อีกต่อไป น้ำเสียมีแหล่งที่มาแตกต่างกันจึงทำให้มีปริมาณและความสกปรกของน้ำเสียแตกต่างกันไปด้วยในการ ปรับปรุงคุณภาพของน้ำเสียจำเป็นจะต้องเลือกวิธีการที่เหมาะสมสำหรับกรรมวิธีในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำเสียนั้นก็มีหลายวิธีด้วยกัน

การบำบัดน้ำเสียเป็นกระบวนการที่ทำให้ของแข็งที่เจือปนอยู่ในน้ำเสียถูกขจัดหรือเปลี่ยนแปลงสภาพจากสารอินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ง่ายกลายเป็นแร่ธาตุหรือสารอินทรีย์ที่ค่อนข้างคงสภาพ ซึ่งส่งผลให้ความสกปรกในน้ำลดลงไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ไม่ทำให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อมเมื่อปล่อยออกไป สำหรับส่วนที่เป็นของแข็งที่แยกออกไปนั้นต้องนำไปกำจัดในทางที่ถูกต้องต่อไป กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบ่งออกเป็น 4 ประเภทดังนี้

- กระบวนการทางกายภาพ (physical process) เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยการแยกของแข็งที่ไม่ละลายน้ำออกจากน้ำเสีย โดยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การดักด้วยตะแกรง (screening) การตัดย่อย (commination) การทำให้ลอย (floating) การตกตะกอน (sedimentation) การกรอง (filtration) เป็นต้น

- กระบวนการทางเคมี (chemical process) เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยการแยกสารต่างๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ด้วยการเติมสารเคมีต่างๆลงไป เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดการแยกสารปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ เมื่อเติมสารเคมีลงในน้ำเสียแล้ว ทำให้เกิดผลกระทบต่างๆเกิดขึ้น เช่น จะมีตะกอนเคมีเกิดเพิ่มขึ้นและค่าใช้จ่ายสำหรับสารเคมีค่อนข้างสูง ดังนั้นกระบวนการทางเคมีจะเลือกใช้ก็ต่อเมื่อน้ำเสียไม่สามารถบำบัดได้ด้วยกระบวนการทางกายภาพหรือชีวภาพ ตัวอย่างกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางเคมี เช่น การเกิดออกซิเดชันทางเคมี (chemical oxidation) เป็นกระบวนการที่เกิดปฏิกิริยาสูญเสียอิเล็กตรอนของอะตอม เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนสภาพของสารที่มีพิษมากไปเป็นสารที่มีพิษน้องหรือไม่มีพิษเลย โดยการสูญเสียอิเล็กตรอนให้แก่สารเคมีที่เติมลงไปในน้ำเสียซึ่งมีสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) เช่น การกำจัดสารเฟอริกไอออน (Fe^{2+}) ที่มีพิษมากไปเป็นสารเฟอรัสไอออน (Fe^{3+}) ซึ่งมีพิษน้อยโดยใช้คลอรีน เช่นเดียวกันกับการเกิดรีดักชันทางเคมี (chemical reduction) กระบวนการเกิดปฏิกิริยารับอิเล็กตรอนของอะตอม เป็นการเปลี่ยนสภาพของสารพิษเป็นสารไม่มีพิษเช่นกัน แต่เป็นการรับอิเล็กตรอนจากสารเคมีที่เติมลงไปซึ่งมีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น การกำจัดสารโครเมต (Cr^{6+}) ไปเป็นโครเมียม (Cr^{3+}) ด้วยเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ในสภาพกรด

- กระบวนการทางกายภาพ – เคมี (physical-chemical process) เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่อาศัยวิธีทางกายภาพและเคมีผสมผสานกันและต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูง เครื่องมืออุปกรณ์ค่อนข้างมากกว่ากระบวนการอื่นๆ แต่ประสิทธิภาพของกระบวนการนี้ สามารถบำบัดน้ำเสียให้

มีคุณภาพดีจนถึงระดับที่ดื่มได้ นิยมใช้กระบวนการนี้เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านกระบวนการอื่นๆ มาแล้ว ตัวอย่างเช่น การดูดซับด้วยถ่าน การแลกเปลี่ยนประจุ เป็นต้น

- กระบวนการทางชีวภาพ (biological process) เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่สามารถลดปริมาณอินทรีย์สารได้มากที่สุด โดยอาศัยหลักการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ มาทำการย่อยสลายเปลี่ยนสภาพของอินทรีย์สารไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย เป็นต้น

2.6.3 เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์และระบบบำบัดน้ำเสียกับการผลิตไฟฟ้า

การประยุกต์ใช้เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ที่สำคัญอีกด้านหนึ่ง คือการใช้งานในด้านวิศวกรรมน้ำเสีย จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ในน้ำเสียเพื่อผลิตกระแสไฟฟ้าได้ โดยจุลินทรีย์จะออกซิไดซ์สารประกอบอินทรีย์ในน้ำเสีย และปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมา เพื่อใช้ผลิตกระแสไฟฟ้า ในปี 2004 Liu และคณะ รายงานว่าสามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้ 26 มิลลิวัตต์ต่อตารางเมตร พร้อมกับลดค่าซีโอดีของน้ำเสียได้ถึงร้อยละ 80 โดยการใช้เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องเดี่ยว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์มีศักยภาพในการใช้เพื่อกำจัดน้ำเสีย และผลิตไฟฟ้าได้ อีกทั้งระบบการบำบัดน้ำเสียแบบเดิมที่มีผลผลิตพลอยได้เป็นก๊าซมีเทนนั้นต้อง มีการควบคุมมาก ได้แก่ สภาวะความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เหล่านี้ล้วนมีผลต่อการเจริญเติบโต ความแข็งแรง และการอยู่รอดของเชื้อ ซึ่งควบคุมได้ยากและมีความเสี่ยงต่อการล้มเหลวของระบบได้ง่าย นอกจากนี้การปลดปล่อยก๊าซมีเทนสู่บรรยากาศ ยังส่งผลต่อสภาวะโลกร้อนอีกด้วย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะแทนที่กระบวนการสร้างก๊าซมีเทนด้วยกระบวนการผลิตกระแสไฟฟ้า

กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นระบบบำบัดที่ประหยัดพลังงานมากที่สุดเพราะไม่จำเป็นต้องเติมอากาศให้กับระบบ ช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการ และยังมีผลผลิตพลอยได้เป็นก๊าซมีเทนมาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้อีก นอกจากนี้ยังเหมาะกับการบำบัดของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูง การย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบบำบัดแบบไร้อากาศต้องอาศัยจุลินทรีย์ 4 กลุ่ม โดยมีปฏิกิริยาต่างๆดังนี้

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) คือปฏิกิริยาที่ทำการเปลี่ยนสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ ได้แก่ สารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งมีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จุลินทรีย์จะดูดซึมเข้าเซลล์ได้ให้เป็นสารที่มีขนาดเล็ก ได้แก่สารจำพวกน้ำตาล อะมิโน และกรดไขมัน โดยไฮโดรไลซิงแบคทีเรียจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แล้วปล่อยออกมาจากเซลล์เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากนั้นสารอินทรีย์ขนาดเล็กจึงถูกดูดซึมเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้โดยตรง

ปฏิกิริยาการเกิดกรด (Acidogenesis) คือปฏิกิริยาย่อยสลายสารที่มีขนาดเล็ก ได้แก่สารจำพวกน้ำตาล อะมิโนและกรดไขมัน ด้วยกระบวนการหมัก ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่คือกรดอินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์อื่นอีก ยกตัวอย่างเช่น ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรดอะซิติก ปะปนออกมา โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและสภาวะแวดล้อมของการเกิดปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาสร้างกรดอะซิติก (Acetogenesis) คือปฏิกิริยาที่ย่อยสลายกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่เกิดจากขั้นตอนของปฏิกิริยาการเกิดกรดให้เป็นกรดอะซิติก โดยแบคทีเรียกลุ่มอะซิโตเจนิก (Acitogenic) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญของการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน เนื่องจากในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเป็นขั้นตอนที่ต่อจากขั้นตอนนี้จะสามารถใช้สารตั้งต้นที่มีปริมาณคาร์บอนจำนวน 1 หรือ 2 อะตอมเท่านั้น ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เมทานอล และเมทีลามีน รวมทั้งก๊าซไฮโดรเจนด้วย โดยจะต้องมีสภาวะแวดล้อมในถังย่อยสลายที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาสร้างก๊าซมีเทน (Methanogenesis) คือปฏิกิริยาเปลี่ยนกรดอะซิติกหรือก๊าซไฮโดรเจนให้เป็นก๊าซมีเทนภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนเจน (Methanogen) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นพวกอาร์เคียแบคทีเรีย (Archaebacteria) ที่มีอัตราการเจริญช้ามากและยังเป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้สารตั้งต้นเพียงบางชนิดคือ สารที่มีคาร์บอนเพียง 1 หรือ 2 อะตอมเท่านั้น ส่วนกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนมากกว่า 2 อะตอมนั้น แบคทีเรียสร้างก๊าซมีเทนจะไม่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นได้ ดังนั้นจะต้องอาศัยแบคทีเรียกลุ่มอื่นเปลี่ยนกรดอินทรีย์ต่างๆให้เป็นกรดอะซิติกหรือก๊าซไฮโดรเจนเสียก่อน แบคทีเรียกลุ่มนี้จึงสามารถทำงานต่อไปได้ (สุบัณฑิต, 2548)

จากกระบวนการที่กล่าวมาข้างต้นจึงมีความเป็นไปได้มากกว่าที่จะนำกระบวนการผลิตไฟฟ้ามาแทนที่กระบวนการผลิตก๊าซมีเทนเพราะกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกระแสไฟฟ้านั้นมีอัตราการเจริญเร็วกว่ากลุ่มที่สร้างมีเทนจึงสามารถเปลี่ยนกรดระเหยง่ายไปเป็นกระแสไฟฟ้าได้เร็วกว่า และโดยทั่วไปนั้นระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะต้องควบคุมปริมาณกรดอินทรีย์และความเป็นกรดด่างให้เหมาะสม หากมีปริมาณกรดสะสมมากจะส่งผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มสร้างก๊าซมีเทนทำให้ระบบล้มเหลว แต่การควบคุมให้เกิดการสร้างไฟฟ้านั้นสามารถควบคุมด้วยอัตราการให้อาหารเพื่อให้มีสารตั้งต้นเพียงพอกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์กรดระเหยง่าย เกิดการผลิตกรดระเหยในปริมาณมากให้แก่จุลินทรีย์กลุ่มอะซิโตเจนิกเพื่อการผลิตไฟฟ้าต่อไป ดังนั้นการควบคุมให้เกิดการผลิตกระแสไฟฟ้าจึงสามารถทำได้ดีกว่า

ระบบบำบัดน้ำเสีย	ข้อดี	ข้อเสีย
แบบใช้อากาศ	ใช้เวลาในการบำบัดสั้น	-เกิดตะกอนจุลินทรีย์จำนวนมาก -เสียค่าใช้จ่ายสูงในการให้อากาศ -ใช้ได้ดีเฉพาะน้ำเสียที่มีความเข้มข้นต่ำ
แบบไม่ใช้อากาศ	ได้ก๊าซชีวภาพ	-ใช้เวลาในการบำบัดนาน -อ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม -เกิดก๊าซพิษพวกไฮโดรเจนซัลไฟด์
เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์	-ใช้เวลาในการบำบัดสั้น -ได้กระแสไฟฟ้า -เกิดตะกอนจุลินทรีย์ต่ำ -ใช้ได้ดีกับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นสูง -บำบัดสารพิษได้ดี -มีความเสถียรสูง -การบำรุงรักษาต่ำ	-เงินทุนสร้างระบบครั้งแรกสูง -เสียค่าใช้จ่ายสูงในการให้อากาศ

ตาราง 2.4 แสดงการเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของระบบบำบัดแบบใช้อากาศ แบบไม่ใช้อากาศและแบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ (ชลทิศา, 2554)

2.6.4 น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องมาลี สามพราน จังหวัดนครปฐม

ผลไม้นับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญประเภทหนึ่งของประเทศไทย โดยผลไม้สามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายพันล้านบาท และผลไม้ไทยยังเป็นที่นิยมบริโภคกันทั่วไปทั้งในประเทศและต่างประเทศ นอกจากนี้ ความต้องการบริโภคผลไม้นับวันจะเพิ่มสูงขึ้น เนื่องมาจากสาเหตุหลักคือจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้นและความสนใจในสุขภาพก็มีมากขึ้นด้วย ในการผลิตผลไม้ถือได้ว่าไทยเป็นประเทศที่มีสภาพพื้นที่และภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตผลไม้เมืองร้อนหลากหลายชนิด ตั้งแต่ภาคเหนือจนถึงภาคใต้ ส่วนฤดูกาลให้ผลผลิตผลไม้แต่ละชนิดก็ยังแตกต่างกันไปในแต่ละสภาพพื้นที่ของแต่ละภาค จึงเป็นข้อดีประการหนึ่งที่ส่งผลให้ไทยมีผลไม้หลากหลายชนิดหมุนเวียนออกสู่ตลาดตลอดทั้งปี

ภาวะการผลิตของอุตสาหกรรมอาหารในภาพรวมปี 2554 ไม่รวมน้ำตาล คาดว่าจะเพิ่มขึ้นจากปีก่อนร้อยละ 4.1 เนื่องจากการผลิตในหลายสินค้า ได้รับผลดีจากการฟื้นตัวของเศรษฐกิจโลก และการที่ประเทศผู้ผลิตสำคัญหลายประเทศประสบปัญหาด้านวัตถุดิบจากภัยธรรมชาติ ส่งผลต่อระดับราคาสินค้าเกษตรและ

อาหารในตลาดโลกมีทิศทางปรับตัวสูงขึ้นในเกือบทุกสินค้า ส่งผลให้การผลิตอุตสาหกรรมอาหารของไทยได้รับผลดี จากแนวโน้มดังกล่าว ใน กลุ่มผักผลไม้ ภาพรวมของการผลิต ปี 2554 คาดว่าจะปรับตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 11.8 จากการผลิตเพิ่มขึ้นของสินค้าสำคัญในกลุ่ม คือ สับปะรดกระป๋อง เนื่องจากวัตถุดิบมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากระดับราคาตลาดโลกที่จูงใจให้ผลิตเพิ่มขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554)

การผลิตเพื่อเพิ่มรายได้ดังกล่าวจึงทำให้เกิดปัญหาสำคัญทางด้านสิ่งแวดล้อมตามมา เนื่องจากในระบบการทำอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องก่อให้เกิดน้ำเสียเป็นจำนวนมาก เพราะเกือบทุกขั้นตอนการผลิตใช้น้ำในปริมาณสูง โดยเฉพาะในกระบวนการล้างและทำความสะอาดวัตถุดิบ ที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูง และน้ำเสียนี้จะถูกปล่อยออกมาสู่แหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณใกล้กับโรงงานผลิต ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมตามมา

บริษัท มาลีสามพราน จำกัด (มหาชน) เป็นบริษัทชั้นนำในกลุ่มผู้ผลิตอาหารและเครื่องดื่ม โดยมีสินค้าหลักคือ ผลไม้กระป๋อง น้ำผลไม้และเครื่องดื่มธัญพืช อีกทั้งเป็นผู้ผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์สับปะรดบรรจุกระป๋อง, สับปะรดบรรจุถุงปลอดเชื้อ, น้ำสับปะรดเข้มข้น, ข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง, ผลไม้รวมและผลไม้ฤดูกาลบรรจุกระป๋อง, น้ำผลไม้, น้ำผักผลไม้บรรจุกล่องยูเอชทีและพาสเจอร์ไรส์, เครื่องดื่มบรรจุกระป๋อง และขวดน้ำพลาสติก (Polyethylene terephthalate: PET) ตลอดจนนมสดยูเอชทีและพาสเจอร์ไรส์

การใช้น้ำในแต่ละสายการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้มาลีสามพรานนั้นต่างกันขึ้นอยู่กับกำลังการผลิต ยิ่งกำลังการผลิตมากปริมาณการใช้น้ำก็มากขึ้นตาม ดังแสดงในตาราง 2.5

ข้อมูลที่ทำการศึกษา		กระบวนการผลิตผลไม้กระป๋อง	
		สับปะรด	ผลไม้ชนิดอื่น
ปริมาณน้ำใช้ (ลบ.ม/วัน)	เฉลี่ย	308	274
ปริมาณวัตถุดิบ (ตัน/วัน)	เฉลี่ย	377	32
ปริมาณน้ำเสีย (ลบ.ม/วัน)	เฉลี่ย	246	219
น้ำที่หายในกระบวนการผลิต (ลบ.ม/วัน)	เฉลี่ย	62	55
ปริมาณการใช้น้ำ/ตัน (ลบ.ม/ตัน)	เฉลี่ย	0.82	8.65
ปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้น/ตัน วัตถุดิบ	เฉลี่ย	0.65	6.95
%ปริมาณน้ำเสีย/น้ำใช้	เฉลี่ย	79.27	81.19
%น้ำที่หายในกระบวนการผลิต	เฉลี่ย	20.73	18.81

ตาราง 2.5 แสดงปริมาณการใช้น้ำของกระบวนการผลิตผลไม้กระป๋อง (สุนทรี, 2550)

จากตารางการใช้น้ำจะเห็นว่าเมื่อมีปริมาณวัตถุดิบเยอะปริมาณการใช้น้ำก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และก่อให้เกิดปริมาณน้ำเสียเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งในกระบวนการผลิตผลไม้กระป๋องนั้นจะเกิดน้ำเสียค่อนข้างมากเนื่องจากกระบวนการล้างทำความสะอาด การใช้น้ำในระบบเครื่องจักร เช่น การหล่อเย็น การนึ่งฆ่าเชื้อ รวมทั้งล้างทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องจักร และส่วนหนึ่งมาจากน้ำในตัวผลิตภัณฑ์เอง ซึ่งน้ำเสียที่เกิดขึ้นนั้นมีมากถึงร้อยละ 80 ของน้ำใช้ทั้งหมด ซึ่งคุณสมบัติน้ำเสียที่เกิดขึ้นมีค่าแสดงดังตาราง 2.6

ข้อมูลที่ทำการศึกษา	กระบวนการผลิตผลไม้กระป๋อง	
	สับปะรด	ผลไม้ชนิดอื่น
pH	4.47	5.48
ปริมาณน้ำเสีย (ลบ.ม/วัน)	246	219
BOD_5 (มก./ล)	820	1523
COD (มก./ล)	1583	2581
SS (มก./ล)	130	169

ตาราง 2.6 แสดงค่าเฉลี่ยของคุณสมบัติน้ำเสียที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตของโรงงาน (สุนทรี, 2550)

ความสกปรกของน้ำเสียสามารถวัดได้ในรูปของค่าบีโอดีและซีโอดี เมื่อใช้ผลไม้ชนิดอื่นในกระบวนการผลิตผลไม้กระป๋องจะพบว่ามีค่าบีโอดีและซีโอดีสูงกว่า หมายความว่ามีสิ่งสกปรกในวัตถุดิบค่อนข้างสูง ต้องเพิ่มขั้นตอนในกระบวนการผลิต จึงเกิดความสกปรกมากกว่า

คุณสมบัติของน้ำเสีย	ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์คุณสมบัติ				
	pH	BOD_5 มก./ล	COD มก./ล	SS มก./ล	FOG มก./ล
ก่อนผ่านระบบบำบัด	5.27	2965	6320	144	11
หลังผ่านระบบบำบัด	7.5	9	43	13	-
ค่ามาตรฐานน้ำทิ้ง	<5.5-9.0	<20	<120	<30-50	<100
ประสิทธิภาพการบำบัด (%)	-	99.7	99	91	100

ตาราง 2.7 แสดงคุณสมบัติน้ำเสียก่อนและหลังผ่านระบบบำบัดน้ำเสียรวมถึงประสิทธิภาพในการบำบัดของโรงงาน (สุนทรี, 2550)

2.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์

ความหลากหลายของจุลินทรีย์ (Microbial diversity)

นักวิจัยจากประเทศต่างๆทั่วโลกให้ความสนใจเรื่องความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในแหล่งธรรมชาติต่างๆหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่น เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาและนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะข้อมูลด้านจุลินทรีย์ที่ยังขาดอยู่มาก ทั้งชนิด จำนวน การกระจายในแต่ละถิ่นที่อยู่ในธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถประเมินความสำคัญ บทบาทในธรรมชาติและความเสี่ยงในสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการมีอยู่หรือหายไปของจุลินทรีย์เหล่านี้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้เรายังมีความจำเป็นที่จะต้องสำรวจและเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ไว้เพื่อนำไปพัฒนาที่จะใช้ประโยชน์ต่อไป

จุลินทรีย์ประจำถิ่นนั้นมีความเกี่ยวข้องกับระบบนิเวศเป็นอย่างมาก เพราะจุลินทรีย์มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในธรรมชาติทำให้เกิดการหมุนเวียนของสารอินทรีย์ในระบบ อีกทั้งจุลินทรีย์บางชนิดยังอาศัยอยู่กับ สิ่งมีชีวิตได้แก่ พืชและสัตว์ โดย มีชีวิตอย่างพึ่งพาอาศัยกั น เพิ่มความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ แต่เดิมการศึกษาจุลินทรีย์ประจำถิ่นนั้นจะศึกษาจากแบคทีเรียเนื่องจาก แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่พบจำนวนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยศึกษาจากแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารแข็ง แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียที่เพาะได้เป็นเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียในระบบนิเวศธรรมชาติทั้งหมดเท่านั้น (Amann et al., 1995)

Habitat	Culturability (%)[a]	Reference(s)
Seawater	0.001–0.1	48, 81, 82
Freshwater	0.25	75
Mesotrophic lake	0.1–1	150
Unpolluted estuarine waters	0.1–3	48
Activated sludge	1–15	160, 161
Sediments	0.25	75
Soil	0.3	153

[a] Culturable bacteria are measured as CFU.

ตาราง 2.8 แสดงเปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีนับปริมาณเซลล์ทั้งหมด (total cell count) (Amann และคณะ, 1995)

โดยทั่วไปแล้วการศึกษาจุลินทรีย์จะทำโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ วิธีนี้รวมถึงการจำแนกโคโลนี ลักษณะทางกายภาพรูปร่างโครงสร้าง ที่แสดงออกเด่นชัด และการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ การนับปริมาณเซลล์ (plate count) MPN (Most probable number) และการดูลักษณะ

รูปร่างจากกล้องจุลทรรศน์ (Direct microscopic examination) นอกจากนี้การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์จนถึงระดับสปีชีส์หรือการหาจำนวนจุลินทรีย์นั้นจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ก่อน (single pure culture) ด้วยวิธีการดังกล่าวซึ่งมีข้อจำกัด ไม่สามารถครอบคลุมชนิดจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด เพราะขึ้นกับความสามารถในการเพาะเลี้ยงเท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มาจากแหล่งสิ่งแวดล้อม ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีความยากที่จะทำการเพาะเลี้ยง และในบางกรณีไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้เลย ทั้งนี้อาจจะมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไม่เหมาะสม หรือสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการการเจริญเติบโต เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์จำนวนมากสูญหายไปในระหว่างทำการเพาะเลี้ยง ทำให้ทั้งจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบนั้น คลาดเคลื่อนและต่ำกว่าความเป็นจริง อีกทั้งยังต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ค่อนข้างยาวนาน ทำให้เทคนิคนี้ไม่สามารถรองรับการตรวจวินิจฉัยหรือการติดตามกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการคำตอบอย่างรวดเร็วได้ จึงมีอีกทางเลือกในการจัดจำแนกคือศึกษาการแสดงออกทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

เทคนิคทางโมเลกุลกับการจัดจำแนกจุลินทรีย์

เทคนิคทางโมเลกุลในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ ใช้ความรู้และเทคนิคจากหลายสาขาในงานวิจัย เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ ชีววิทยาเชิงฟิสิกส์ และคอมพิวเตอร์ รวมกัน เพื่อสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับโครงสร้าง การทำงานของหน่วยพันธุกรรมในระดับโมเลกุล ในการศึกษาทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) จะมุ่งเน้นศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบต่างๆภายในเซลล์ ซึ่งรวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และ โปรตีน และรวมถึงว่าขบวนการเหล่านี้ถูกควบคุมอย่างไร ดังนั้นเทคนิคทางโมเลกุลจึงจัดเป็นเทคนิคที่ดีในการติดตามและจัดจำแนกจุลินทรีย์พี่พบในธรรมชาติ อาหาร และระบบนิเวศที่ซับซ้อน เพราะไม่มีข้อจำกัดเรื่องอาหารเพาะเลี้ยง จึงสามารถใช้แยกชนิดของจุลินทรีย์ทั้งที่เพาะเลี้ยงได้ และเพาะเลี้ยงไม่ได้ มีหรือไม่มีชีวิต ครอบคลุมจุลินทรีย์ที่หลากหลายในธรรมชาติ โดยเฉพาะการใช้โมเลกุลดีเอ็นเอเป็นเทคนิคที่น่าเชื่อถือมากที่สุด และเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป เพราะมีความจำเพาะและความแม่นยำสูง นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างจุลินทรีย์ต่างๆในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

2.7.1 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย จากโมเลกุล 16S ribosomal RNA (16S rRNA gene)

การใช้ 16S rRNA gene สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification)

16S rRNA gene หรือ 16S rDNA ที่ถูกถอดรหัสเป็น 16S rRNA เป็นส่วนหนึ่งของ small subunit ของไรโบโซม ไรโบโซมมีลักษณะเป็นเม็ดไม่มีเยื่อหุ้ม กระจายอยู่ทั่วไป มีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 20

นาโนเมตร อยู่เป็นอิสระในเซลล์ หรืออาจเกาะอยู่ที่ผิวด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่สร้างโปรตีนเพื่อส่งออกนอกเซลล์ องค์ประกอบของไรโบโซม เป็นโปรตีน 40% RNA 60% จับกัน วัดขนาดได้จากค่าสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอน (sedimentation coefficient) เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยง หน่วยที่ใช้วัดคือ หน่วย Svedberg unit (S) ไรโบโซมของแบคทีเรียมีขนาด 70S ซึ่งไรโบโซม 70S ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 50S และ 30S ไรโบโซมส่วน 50S ยังประกอบด้วย 23S rRNA (2900 nucleotides) และ 5S rRNA (120 nucleotides) กับโปรตีน 34 ชนิด ไรโบโซมส่วน 30S ประกอบด้วย 16S rRNA (1500 nucleotides) กับโปรตีน 21 ชนิด หน้าที่ของไรโบโซมเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆ โดยมีไรโบโซมยึดกันด้วย mRNA กลายเป็นสายยาวของโพลิโซมหรือโพลิไรโบโซม (polysome หรือ polyribosome) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดการสังเคราะห์โปรตีน (Madigan และคณะ, 2000)

Ribosomal RNA มีหน้าที่ 2 อย่างคือ เป็นส่วนช่วยในเรื่องโครงสร้างของไรโบโซม และโมเลกุลของ 16S rRNA ในส่วนของ 30 S subunit จะเป็นตัวช่วยในการเริ่มต้นสังเคราะห์โปรตีน เนื่อง จากการเกิดเป็น complex ของปลาย 3’ ของ 16S rRNA กับ initiating signal site บน mRNA และช่วยในเรื่องตำแหน่งของ mRNA บนไรโบโซม รวมทั้งยังรวมกับ initiation factor 3 และ ปลาย 3’ CCA ของ aminoacyl-tRNA ซึ่งอาจเป็นเพราะ rRNA เป็นตัวเร่ง (catalytic) ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Prescott และคณะ, 1999)

ยีน 16 S rRNA ถูกเลือกนำมาใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก (phylogenetic) เนื่องจากมีข้อดีหลายประการคือเป็นยีนที่มีอยู่ในยูแบคทีเรีย (eubacteria) ทุกชนิด ทำให้สามารถเปรียบเทียบยูแบคทีเรียที่มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส บางช่วงของสายดีเอ็นเอของ 16 S rRNA gene เหมือนกันในยูแบคทีเรียทุกชนิด ในขณะเดียวกันก็มีบางช่วงของสายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ในช่วงที่เหมือนและช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอนั้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย ช่วงที่เหมือนกันนี้จะนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ (primer) เพื่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR amplification) การที่สายดีเอ็นเอช่วงนี้มีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด จึงสามารถนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ที่ถือว่าเป็นสากล (universal primers) คือ ไพรเมอร์ 1 คู่นี้สามารถขยายหรือเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ได้จากแบคทีเรียทุกชนิดที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ทำการศึกษาได้

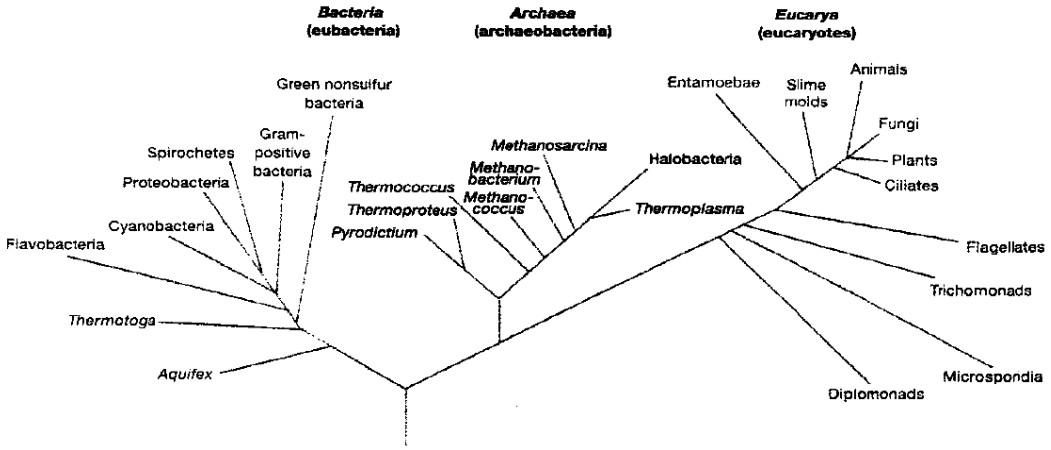
การเรียงตัวของลำดับเบสของ 16 S rDNA นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยในแบคทีเรียแต่ละชนิด และการเรียงตัวของลำดับเบสบนยีนของ 16 S rDNA เป็นที่ทราบกันพอสมควรจึงง่ายต่อการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) และ การวิเคราะห์ลำดับเบส (nucleotide sequence analysis) ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ยากต่อการจัดจำแนก หรือยากต่อการเพาะเลี้ยงได้ (difficult-to-identify หรือ difficult to culture) วิธีนี้นอกจากจะสะดวกรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการจัดการลำดับเบสที่ต้องการแล้ว สามารถ

นำลำดับเบสที่ค้นพบไปเทียบกับฐานข้อมูลออนไลน์ซึ่งรวบรวมลำดับเบสที่มีอยู่แล้วได้ ตัวอย่างเช่น EMBL ฐานข้อมูลจาก European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/embl/) และ BLAST ฐานข้อมูลจาก NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) เมื่อสามารถทราบกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่เดิมไม่สามารถจัดจำแนกได้แล้ว ทำให้เกิดประโยชน์ทางด้านงานวิจัยอื่นๆมากมายและเป็นวิธีที่นิยมใช้จนถึงปัจจุบัน

การใช้ 16S rRNA gene สำหรับแผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก (phylogeny)

มีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มที่พยายามศึกษาเกี่ยวกับการหารความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการโดยอาศัยข้อมูลจากซากบรรพชีวิน (fossil) หรือจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งได้ข้อสรุปคร่าวๆ ที่ไม่ลึกซึ้งหรือชี้ชัดได้ จึงหันมาสนใจข้อมูลระดับโมเลกุลจากเซลล์สิ่งมีชีวิตหรือข้อมูลจากสายดีเอ็นเอและสายโปรตีนอาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษร่วมกันควรจะมีข้อมูลระดับโมเลกุลคล้ายคลึงกันและสิ่งมีชีวิตในสปีชี่ส์ (species) เดียวกันอาจมีความแตกต่างของข้อมูลระดับโมเลกุลได้จากมีการวิวัฒนาการที่ต่างกันของแต่ละสายพันธุ์ (strain) สิ่งมีชีวิตสองชนิดอาจไม่ใกล้ชิดกันมากพอที่จะมี DNA คล้ายกันมาก แต่ก็ยังมีไรโบโซมที่คล้ายกัน ในแบคทีเรียทุกชนิดลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene พบว่ามีความคงตัวสูงมาก แม้จะมีวิวัฒนาการมานาน แต่ลำดับของนิวคลีโอไทด์จะเปลี่ยนไปน้อยมา ซึ่งหมายความว่าแม้สิ่งมีชีวิตสองชนิดจะมีความใกล้ชิดกันน้อยและไม่มี DNA ที่คล้ายกัน แต่ก็ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใน rRNA คล้ายกัน ความคล้ายคลึงกันนี้สามารถใช้เป็นเครื่องวัดความใกล้ชิดระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ ความคล้ายกันของ rRNA ใช้หาความคล้ายคลึงกันของ rRNA ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ

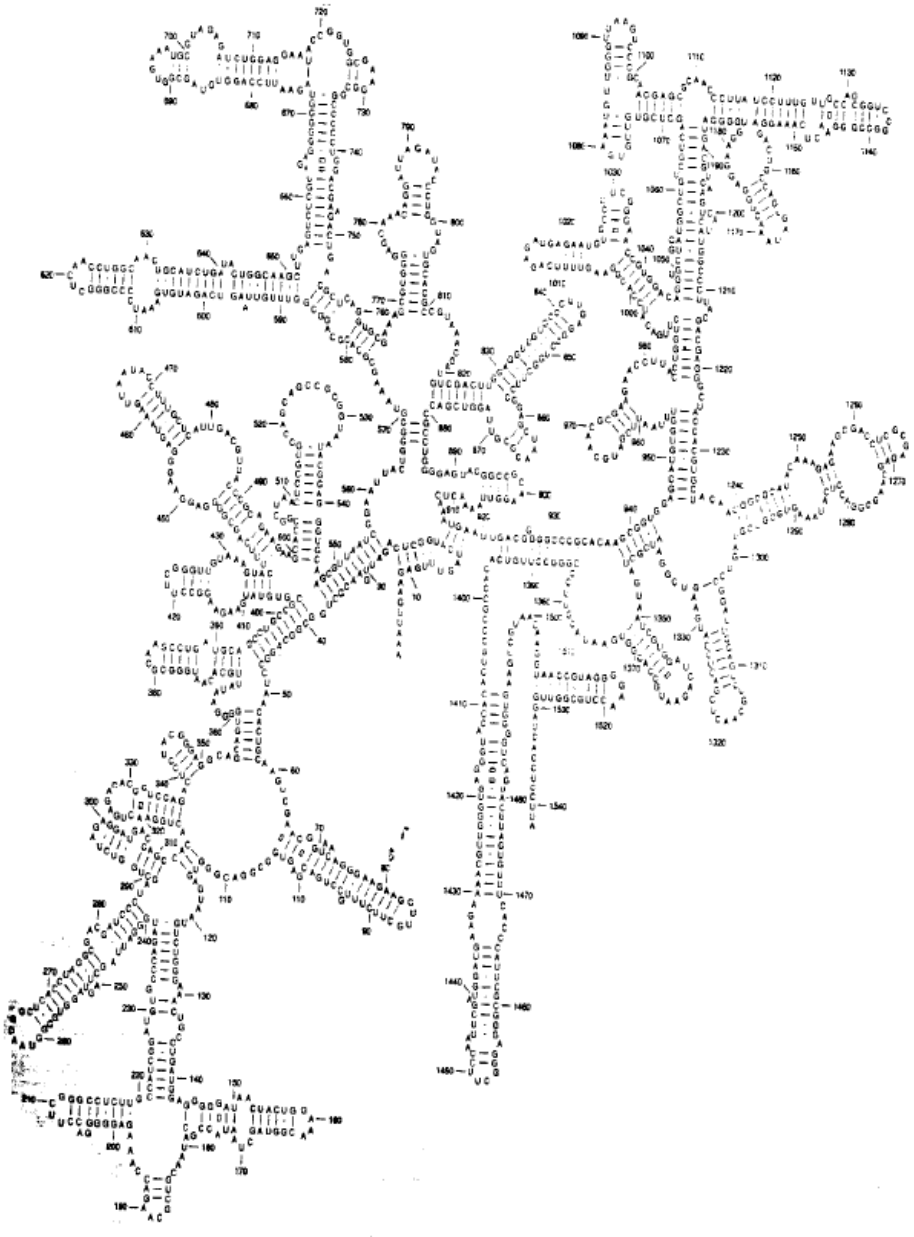
ในปี 1978 Woese และคณะ ได้จัดหมวดหมู่สิ่งมีชีวิตแบ่งได้เป็น 3 อาณาจักร (domain) คือ Bacteria, Archaea และ Eucarya ดังภาพที่ 2.10 โดยแบ่งตามชนิดของไรโบโซมจากการเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ใน ribosomal RNA จากเซลล์ชนิดต่าง ๆ และปัจจุบันยังคงใช้วิธีนี้



ภาพที่ 2.10 Universal Phylogenetic Tree จากการศึกษาเปรียบเทียบลำ ดับเบสของ rRNA (Olsen และ Woese, 1993)

ตัวอย่างโครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure) และทุติยภูมิ (secondary structure) ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ดังภาพที่ 2.11 และเหตุผลสำหรับการเลือกใช้ 16S rRNA มาใช้ศึกษาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมีดังนี้

- RNA จัดเป็นโมเลกุลที่มีมานานแล้ว
- หน้าที่ของ RNA ไม่เปลี่ยนแปลง/คงที่ เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน
- พบ rRNA ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด
- โมเลกุลของ rRNA มีขนาดปานกลาง ไม่ใช้ 5S เนื่องจากประกอบด้วยเบสเพียง 120 คู่เบส (base pair: bp) ซึ่งมีข้อมูลเบสที่น้อย เมื่อเทียบกับ 16S (1500 คู่เบส) ส่วน 23S มี 2900 คู่เบส มีข้อมูลของลำดับเบสมากซึ่งเป็นส่วนดี แต่ทางปฏิบัติแล้วทำได้ยากกว่า 16S
- โมเลกุลมีส่วนของบริเวณ ที่ได้รับการอนุรักษ์และการแปรผันทางพันธุกรรม (conserved และ variation) เพียงพอสำหรับจัดกลุ่มหรือบอ กความสัมพันธ์ ซึ่งหากยีนมี การแปรผันทางพันธุกรรม สูง คือมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม (mutation) สูง จะเกิดการ สูญเสียลักษณะทางพันธุกรรม (loss) ทำให้ทำการเปรียบเทียบลำดับเบส (alignment) ไม่ได้ เนื่องจากในการทำการเปรียบเทียบลำดับเบสคือการเทียบหาส่วนที่เหมือนและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 2.11 ตัวอย่างโครงสร้างปฐมภูมิและทุติยภูมิของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (Madigan และ คณะ, 2000)

ขั้นตอนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก

การจัดเรียงลำดับสายดีเอ็นเอ (alignment of DNA sequences) โดยทำการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์จากสายดีเอ็นเอหลายๆสาย และทำการเพิ่มลำดับของดีเอ็นเอที่เป็น กลุ่มนอก (out group) มาใส่เพิ่มเข้าไปในชุดข้อมูล เพื่อให้เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่นอกกลุ่มที่จะบอกให้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทราบถึงตำแหน่งที่เหมาะสมในการสร้างกิ่ง (rooted) ของแผนภูมิต้นไม้ ตัวอย่างเช่น ใน การศึกษา 16S rRNA ยีนในกลุ่มโปรคาริโอต จะเลือกสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม โดยมักจะใช้ลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Escherichia coli* เป็นต้น จากนั้น ทำการจัดเรียงข้อมูลจนกระทั่งมีระดับของความเหมือนกันสูงสุดโดยการแทรกช่องว่าง (gap) เพื่อให้ช่องว่างและจำนวนที่ทำให้เกิดสายดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (mismatch) น้อยที่สุด วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้มีหลายวิธี ได้แก่

- Distance matrix เป็นการใช้ตารางความแตกต่างโดยรวมระหว่างสายดีเอ็นเอต่างๆ ที่ศึกษาซึ่งจะมีการจัดข้อมูลแบบ Unweighted pair-Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) และวิธี Neighbour-Joining (NJ)

- Maximum likelihood วิธีนี้จะอาศัยการคำนวณหาความน่าจะเป็นที่ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นจากแผนภูมิที่เป็นไปได้ประกอบกับแบบจำลองต่างๆ ของการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการ แผนภูมิที่ได้จึงเป็นแผนภูมิที่มีความเป็นไปได้สูงสุด

- Maximum parsimony เป็นแผนภูมิที่อาศัยจำนวนของการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ในการอธิบายความแตกต่างที่พบที่ได้จากข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่มี ความยาวของแผนภูมิต้นไม้จากโครงสร้างที่เป็นไปได้ในแต่ละแบบจะถูกประมาณขึ้นจากดีเอ็นเอตำแหน่งที่ใหข้อมูลบนตารางแมตทริกซ์ จากนั้นความยาวของกิ่งแต่ละกิ่งบนแผนภูมินั้นจะถูกประมาณขึ้น ตามจำนวนของการเปลี่ยนแปลงในแต่ละตำแหน่งของดีเอ็นเอ

เมื่อได้แผนภูมิแล้วจะมีค่าสนับสนุนทางสถิติ (statistic supporting value) คือค่า bootstrap บนแผนภูมิที่เกิดขึ้นออกมาในรูปของร้อยละ ถ้ามีค่าใกล้ 100 จะมั่นใจได้ว่า กิ่ง (branch) หรือเคลด (clade) ที่เกิดขึ้นบนแผ่นภูมิน่าจะเกิดขึ้นได้จริงและเป็นแผนภูมิที่มีความถูกต้อง

โปรแกรมคอมพิวเตอร์

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาแผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก ในปัจจุบันมีอยู่หลายโปรแกรมทั้งที่สามารถดาวโหลดมาใช้งานได้ และโปรแกรมที่ต้องเสียค่าใช้จ่าย โปรแกรมที่เป็นที่นิยมซึ่งได้แก่ PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony method) เขียนโดย Swofford โปรแกรม Hennig86

เขียนโดย Farris และโปรแกรม PHYLIP ที่เขียนโดย Falsenstein เป็นชุด packages ที่รวมเอาโปรแกรมย่อยๆ เอาไว้ นอกจากนี้ยังมีโปรแกรมอื่นๆ ที่พัฒนาขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) package version 3.1 (Kumar และคณะ, 2004) และ MEGA software version 4.0 (Tamura และคณะ, 2007) เป็นต้น

2.7.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นขบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งขบวนการนี้เลียนแบบขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ในปี 1983 ได้มีผู้คิดค้นเทคนิคพีซีอาร์ คือ Kary Mullis พีซีอาร์ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) ใช้อุณหภูมิ ประมาณ 94 องศาเซลเซียส เมื่อเริ่มต้นดีเอ็นเอแม่แบบจะอยู่ในลักษณะที่เป็นเกลียวคู่ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงประมาณ 94 องศาเซลเซียส จะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ทำให้เส้นดีเอ็นเอแยกออกจากกัน โดยขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคส (Helicase) ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

- การจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) ใช้อุณหภูมิประมาณ 40-62 องศาเซลเซียส เมื่อแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันแล้ว จะลดอุณหภูมิลงเหลือ 40-62 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15-25 เบส ที่เรียกว่าไพร์เมอร์ (Primer) เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่สามารถที่จะเริ่มจากศูนย์ได้เนื่องจากเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ต้องการปลาย-OH ทางด้าน 3'เพื่อนำนิวคลีโอไทด์ตัวต่อมาต่อ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอ็นไซม์ที่มีชื่อว่าไพรเมส (Primase) เป็นตัวสร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ขึ้น

- การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ใช้อุณหภูมิประมาณ 68-72 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพร์เมอร์ โดยอุณหภูมิที่ใช้จะพอเหมาะกับการทำงานของ Taq DNA polymerase

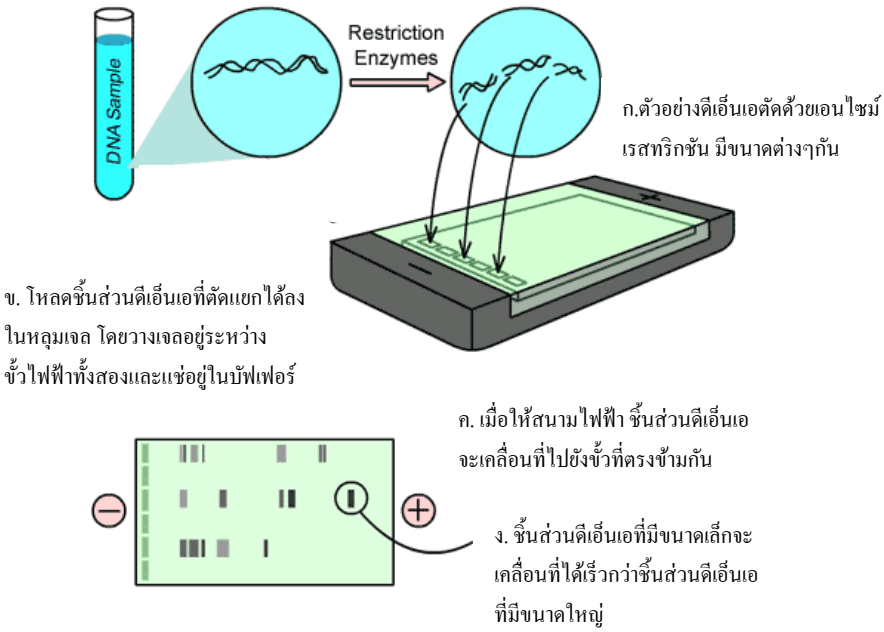
การแยกสารทางไฟฟ้า (Electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกสาร วิเคราะห์ และเตรียมสารที่มีประจุไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก ให้ แยกออกจากกัน โดยอาศัยหลักการ เมื่อให้สนามไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกันด้วยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ซึ่งขึ้นกับ

ปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสารนั้น ตัวกลางที่ใช้ และแรงเคลื่อนไฟฟ้า โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบที่ พีเอช (pH) เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอ จะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจาก หมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของ นิวคลิโอไทด์ ทุกชนิด ดีเอ็นเอ ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของ ดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ การแยกสารทางไฟฟ้าโดยใช้เจล (Gel Electrophoresis) มีหลายชนิดดังนี้

- แบบคอลัมน์ (Column Gel Electrophoresis) เจลจะถูกทำให้แข็งตัวในคอลัมน์และนำไปจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์ทั้งด้านบน และล่าง สารผสมที่ต้องการแยกถูกปล่อยลงบนผิวหน้าของเจลที่อยู่ ด้านบน เมื่อให้สนามไฟฟ้าสารผสมจะแยกออกจากกันเป็นแถบ บัฟเฟอร์ที่ใช้ทั้งในตัวกลางเจลและในอ่างมี pH ประมาณ 9 ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบจึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก

- Slab Gel Electrophoresis การทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเหมือนกับแบบคอลัมน์ แต่มีข้อดีกว่า คือ สามารถแยก และวิเคราะห์สารได้พร้อมกันเป็นจำนวนมากในเจลแผ่นเดียวกันทั้งแบบคอลัมน์และ slab gel สารผสมที่ต้องการแยกต้องใส่กลีเซอรอลหรือน้ำตาลซูโครสเพื่อเพิ่มความหนาแน่นทำให้ไม่เกิดการแพร่กระจายของสารผสมในบัฟเฟอร์ และต้องใส่ประจุบวกที่ละลายน้ำหรือสีติดตามประจุลบด้วย สีย้อมนี้เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าประจุขนาดใหญ่ส่วนใหญ่จึงทำให้เห็นการเคลื่อนที่ระหว่างการทำจนสีย้อมเคลื่อนที่มาถึงปลายสุดของแผ่นเจลจึงจะสิ้นสุดการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและทำการย้อมเจลด้วยสีที่จับกับสารจะได้แถบของสารที่ต้องการ (ภาพที่ 2.12)

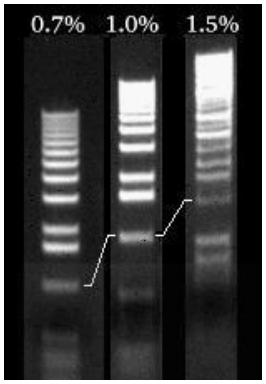


ภาพที่ 2.12 แสดงการแยกสารทางไฟฟ้าแบบแผ่นแนวราบ (slab electrophoresis)

Agarose Gel Electrophoresis

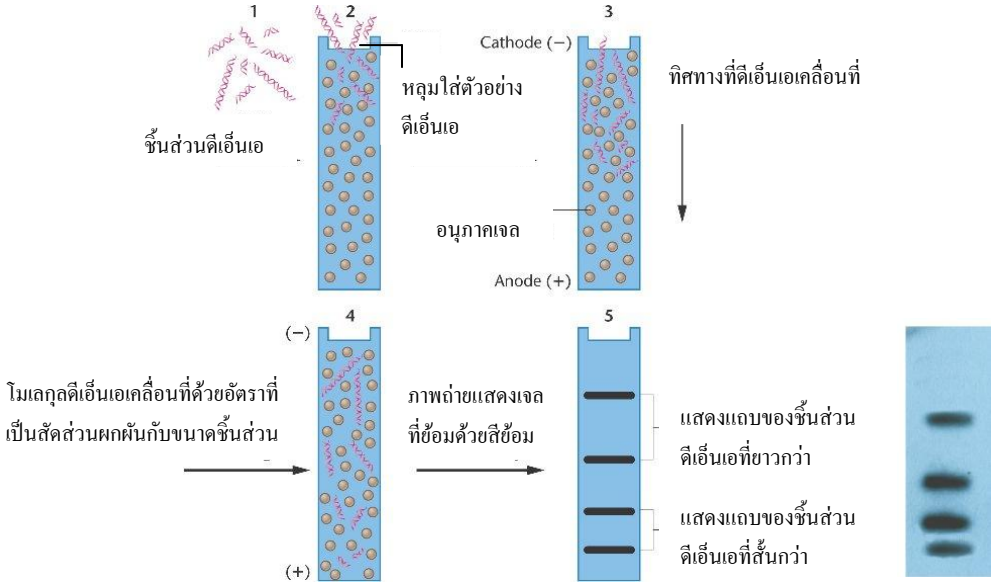
การแยกสารทางไฟฟ้าโดยใช้ตัวกลางเจลคือ อะกาโรส (agarose) เป็นสายพอลิเมอร์ของ D-galactose และ 3,6- anhydro-L-galactose เมื่อเตรียมแผ่นเจลโดยต้มสารละลายอะกาโรสในบัฟเฟอร์แล้วเทลงในถาดเตรียมเพื่อให้แข็งตัวเมื่อเย็นจะได้เจลที่มีรูพรุนใหญ่ใช้แยกสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น กรดนิวคลีอิก ซึ่งขนาดรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรสเมื่อความเข้มข้นสูงรูพรุนจะเล็กลง บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Tris acetate (TAE), Tris borate (TBE) และ Tris phosphate (TPE) ที่ความเข้มข้น 50 mM pH 7.5-8.0 และมี EDTA เพื่อยับยั้งการทำงาน (activity) ของ DNase ส่วนสีที่ใช้ย้อมเป็น fluorescent compound (aromatic cation) เช่น เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) โดยเข้าไปแทรกตัว (intercalate) อยู่ระหว่างคู่เบส (base pair) ที่ซ้อนกัน เมื่อฉายแสง UV จะให้ fluorescence มองเห็นเป็นแถบ (band) ของดีเอ็นเอเรืองแสง

ความเข้มข้นของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเจลจะทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง เจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิก คือ อะกาโรสเจล (Agarose gel) และ พอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ส่วน เจลที่นิยมใช้กับโปรตีนคือ พอลิอะคริลาไมด์เจล



ภาพที่ 2.13 แสดงโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะถูกแยกได้ดีกว่าในเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ (0.7%) ในขณะที่ดีเอ็นเอขนาดเล็กจะแยกได้ดีในเจลที่มีความเข้มข้นสูง (1.5%)

การเคลื่อนที่ของโมเลกุล เมื่อให้สนามไฟฟ้าที่ pH เป็นกลาง โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกจะมีประจุลบและเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยความเร็วที่ขึ้นกับขนาดโมเลกุล (molecular size) และโครงรูป (conformation) เมื่ออัตราส่วนระหว่างประจุต่อมวลของกรดนิวคลีอิกเท่ากับ 1 จะทำให้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่แปรผกผันกับ log10 ของน้ำหนักโมเลกุล กรดนิวคลีอิกขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขนาดใหญ่ และถ้าขนาดเท่ากันแต่มีรูปร่างต่างกันจะมีอัตราเร็วต่างกัน โดยลำดับของความเร็วในการเคลื่อนที่ของแต่ละรูปแบบของกรดนิวคลีอิกในกรณีที่ขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้นพบว่า supercoiled DNA จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า linear double stranded DNA และ Nicked circular DNA ตามลำดับ



ภาพที่ 2.14 แสดงการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอผ่านตัวกลางเจลที่มีลักษณะเป็นรูพรุน เมื่อให้สนามไฟฟ้าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า

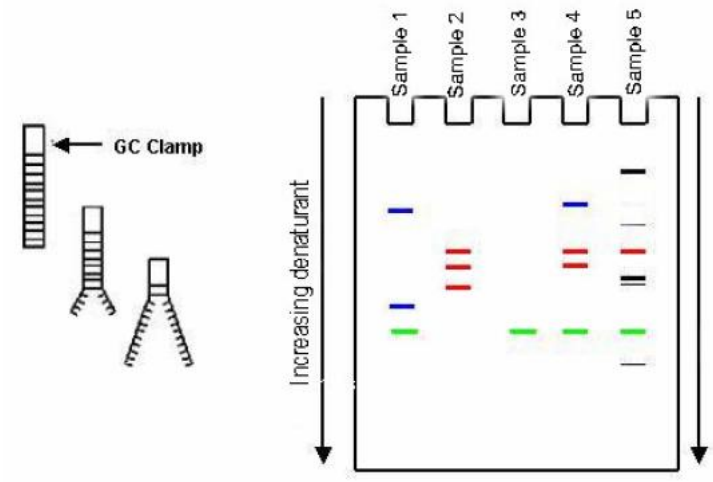
2.7.3 เทคนิคการตรวจหาความผิดปกติของสายพันธุ์ (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE)

ดีจีจีอี เป็นเทคนิคใช้แยกความแตกต่างของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยตัวกลางเป็นเจล โดยจะแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันได้แม้ว่าขนาดความยาวของดีเอ็นเอจะเท่ากัน ซึ่งจะอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturant) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นของสาร (gradient) จากส่วนบนของเจลที่มีความเข้มข้นน้อยไปสู่ส่วนล่างของเจลที่มีความเข้มข้นมาก รวมไปถึงการใช้อุณหภูมิสูงในการทำลายพันธะระหว่างคู่เบส G-C ซึ่งเป็นการจับกันโดยใช้พันธะที่เหนียวแน่น ซึ่งความเข้มข้นหรือปริมาณของคู่เบส G-C ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละคู่ที่แตกต่างกันนี้ทำให้การเคลื่อนที่ในตัวกลางดังที่กล่าวมาข้างต้นแตกต่างกันจึงสามารถมองเห็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลต่างกัน ดังนั้นดีจีจีอีจึงเป็นเป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถแยกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สนใจได้ แม้สิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะมีลำดับเบสต่างกันเพียงหนึ่งตำแหน่งก็ตาม

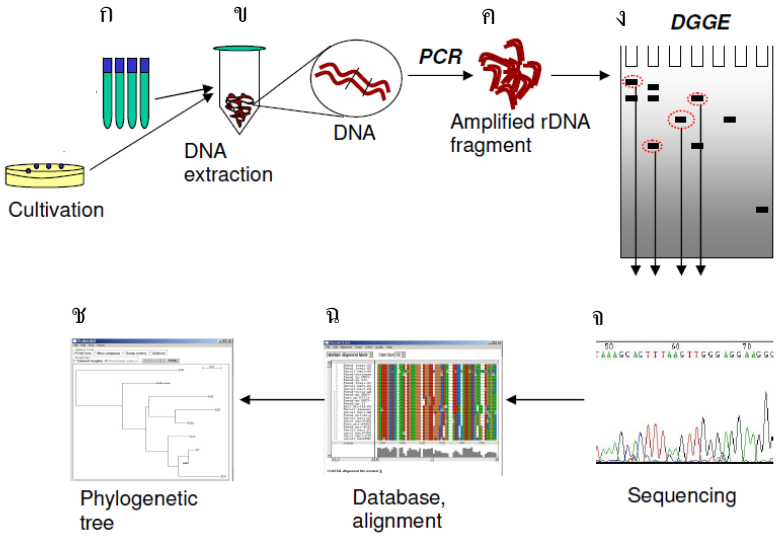
การศึกษาจำนวนประชากรแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี เริ่มขึ้นจากการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในดิน (Muyzer และคณะ, 1993) ต่อมาจึงเริ่มมีการประยุกต์ใช้ในการติดตามประชากรจุลินทรีย์ในอาหาร รวมไปถึงอาหารหมักชนิดอื่นๆ โดยเทคนิคดีจีจีอีสามารถทำได้กับยีนที่มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส สูงสุดไม่เกิน 500 คู่เบส เท่านั้น (Muyzer และ Smalla, 1998) ซึ่งสามารถศึกษาแบคทีเรียในตัวอย่างได้โดยตรง เป็นการลดปัญหาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารในห้องปฏิบัติการได้ และสามารถประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่ สะดวก รวดเร็ว และไม่ยุ่งยาก ทำให้นักวิทยาศาสตร์และวิศวกรทางชีวภาพเข้าใจโครงสร้าง ชนิด และปริมาณของแบคทีเรียว่าเป็นอย่างไร มากหรือน้อยต่างกันในระดับอณูวิทยา ทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ หรือตรวจสอบความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ น้ำเสียหรือของเสียทางอุตสาหกรรมและการเกษตรรวมไปถึงทางการแพทย์ด้วย อีกทั้งยังสามารถคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่สนใจไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อใช้ศึกษาในระดับที่ลึกลงไปได้

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี จะต้องได้ปริมาณดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เมื่อได้ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์รูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนเจล อะคริลาไมด์ (acrylamide) โดยอาศัยปริมาณคู่เบส G-C ที่แตกต่างกันบนสายดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดการเคลื่อนที่ในความเข้มข้นของสาร denaturant ที่ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิการหลอมหรือการแยก (melting temperature) จะแตกต่างกันไปตามลำดับและชนิดของเบส นั่นคือสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะเคลื่อนที่บนเจลต่างกัน (ภาพที่ 2.15) กล่าวคือการเพิ่มเบส GC ประมาณ 30-50 นิวคลีโอไทด์ (Muyzer และคณะ, 1993) เรียกว่า GC clamp ที่ปลายสาย 5’ ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ

เพื่อทำหน้าที่เป็น high melting domain บนสายดีเอ็นเอทำให้ไม่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยวเมื่อเคลื่อนที่บนเจลดีจีจีอี



ภาพที่ 2.15 การเคลื่อนที่บนโพลีอคริลาไมด์เจลของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากเชื้อมาตรฐานในการทำดีจีจีอี (Ward และ Bora, 2004)



ภาพที่ 2.16 แสดงขั้นตอนการศึกษาประชากรแบคทีเรียในตัวอย่าง ภาพ ก เตรียมจุลินทรีย์ก่อนการสกัดเพื่อให้มีจำนวนมากพอ ภาพ ข สกัดดีเอ็นเอ ภาพ ค เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ ภาพ ง วิเคราะห์รูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนเจล อะคริลาไมด์โดยสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะเคลื่อนที่บนเจลต่างกัน ภาพ จ วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สนใจ โดยการนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ภาพ ฉ และ ช ศึกษาแผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติกด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. กระทงอลูมิเนียม
2. ขวดสีชาขนาด 2.5 ลิตร
3. คอมพิวเตอร์
4. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น ARE บริษัท VELP Scientifica, Europe.
5. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, USA.
6. เครื่องชั่งหยาบ 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ100C บริษัท Presica, Switzerland.
7. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204-5 ของบริษัท Mettler, Switzerland.
8. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
9. เครื่องนึ่งความดันฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy, Germany.
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น 4-15 บริษัท Sigma, Germany.
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น1920 บริษัท Kubota, Japan.
12. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VSM-3 บริษัท Shelton scientific, Japan.
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA. และรุ่น MJ Mini™ Personal Thermal Cycler บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., Japan.
14. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค DGGE รุ่น DGGEK-1001 บริษัท C.B.S. scientific, USA.
15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan.
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
17. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer)
18. เครื่องวัดค่าความต่างศักย์ จากภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
19. ชุดอุปกรณ์ทำ Agarose gel electrophoresis ได้แก่ ถาดเทเจล ถังใส่สารละลาย แผ่นหวี และแหล่งจ่ายไฟ ของบริษัท Cosmo bio, USA.

20. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20ºซ รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan.
21. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -80ºซ รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA.
22. ตู้เย็นยี่ห้อ Sharp, Japan.
23. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany.
24. ตู้อบแห้ง (Oven) บริษัท Memmert, Germany.
25. ตู้อบอุณหภูมิสูง บริษัท Memmert, Germany.
26. ตู้ดูดความชื้น (Desiccators) บริษัท Coax group corporation LTD.
27. ถังปฏิกรณ์ประกอบจากอะคริลิก
28. ปั๊มรีดสาย (Hydraulic pump) รุ่น 505U บริษัท Watson Marlow, England.
29. ปั๊มอากาศ รุ่น 6500 บริษัท Regent, Germany.
30. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 5, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf AG, Germany.
31. หลอดย่อยสลาย ขนาด 20×150 มิลลิเมตร
32. ผ้าเส้นใยคาร์บอน ชนิด CF บริษัท ACELAN, Korea.
33. แผ่นเยื่อเลือกผ่านประจุบวก (Proton exchange membrane) ชนิด neocepta บริษัท model CMS, Japan.
34. สายไฟฟ้าขนาด 2 มิลลิเมตร
35. สายยางซิลิโคน ขนาด 3 มิลลิเมตรและ ขนาด 5 มิลลิเมตร
36. หัวทราย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร

เคมีภัณฑ์

1. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany.
2. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) บริษัท Merck, Germany.
3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia.
4. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Analar, England
5. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
6. ชุดสารละลาย KAPA2G Robust Hotstart บริษัท Kapa Biosystems, USA.
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany.
8. โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) บริษัท Unilab, Austrlia.
9. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) บริษัท Unilab, Austrlia.
10. โปตัสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) บริษัท Fisher scientific, UK.
11. โปตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต ($HOOC_6H_4COOK$) บริษัท Fisher scientific, UK.
12. เฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$) บริษัท Fisher scientific, UK.
13. เฟอร์ริกซัลเฟต ($FeSO_4$) บริษัท Fisher scientific, UK.
14. เมอคิวริกซัลเฟต ($HgSO_4$) บริษัท Fisher scientific, UK.
15. 1,10-ฟีแนนโทลีนโมโนไฮเดรต บริษัท Fisher scientific, UK.
16. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (1 kilobase DNA ladder) บริษัท Bio-Rad, UK และ บริษัท Fermentas, USA.
17. ดีเอ็นเอ 100bp DNA ladder ของ บริษัท BioExcellence, Thailand.
18. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany.
19. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany.
20. ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ [Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)] บริษัท USB, USA.
21. เอทานอล (CH_2OH) บริษัท Merck, Germany.
22. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
    - ฟอร์มาไมด์ [Formamide(Deionized)]

- สารละลาย 40% อะคริลาไมด์/บิส (40% Acrylamide/bis solution, 37:5:1)
- ยูเรีย (urea)
- แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate)
- N,N,N',N'-เททระ เมธิล เอธิลีนไดเอมีน (N,N,N',N'-Tetra-methy-ethylenediamine, TEMED)
- ทีเออีบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 เท่า (50xTAE)
- สีติดตาม (Dye solution)
- เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide solution) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

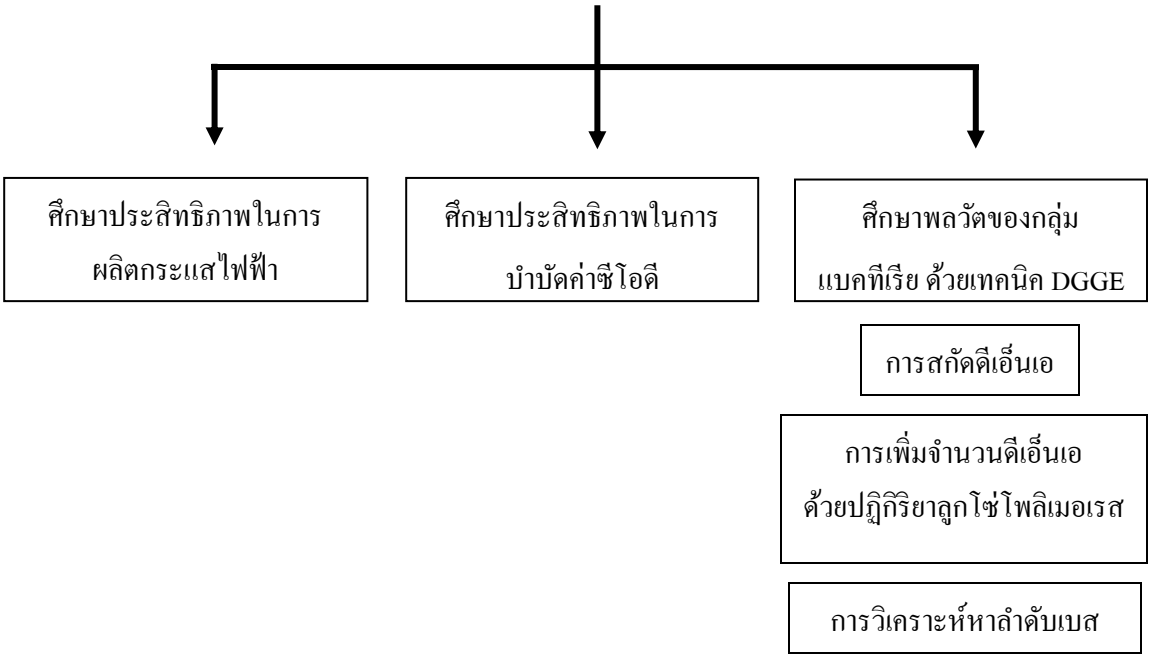
23. สาร EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
24. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท
25. อาร์เอ็นเอสเอ (Ribonuclease A, Rnase A) บริษัท Promega, USA.
26. เอธานอล (Ethanol) ของบริษัท J.T. Baker, USA.

แผนผังงานวิจัย

ประกอบถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่
และการเตรียมวัสดุสำหรับเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

↓

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียภายในถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์จากการเปลี่ยนภาวะในถัง
โดยการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ เท่ากับ 36 24 และ 12 ชั่วโมง



↓

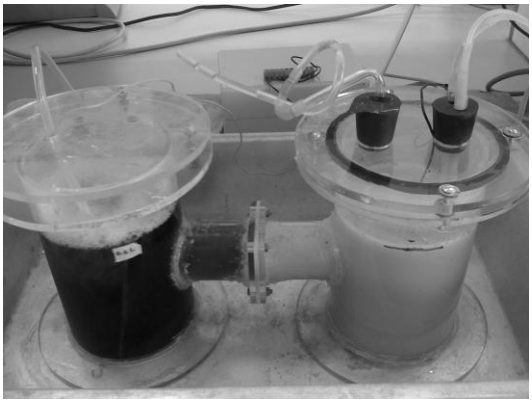
ทดสอบกับน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องมาลีสามพราน จังหวัดนครปฐม
โดยเลือกภาวะการแปรผันที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกระแสไฟฟ้าดีที่สุด

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ประกอบถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่ และการเตรียมวัสดุสำหรับเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

3.1.1 ประกอบถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่

เลือกใช้อะคริลิกเป็นวัสดุในการทำงานเนื่องจากเป็นวัสดุที่ทนสภาวะเป็นกรด ไม่ถูกกัดกร่อน มีความทนทาน และราคาไม่แพง ถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ประกอบจากอะคริลิกทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.4 เซนติเมตร สูง 14 เซนติเมตร ถังแอโนดและถังแคโทดเชื่อมต่อกันด้วยท่ออะคริลิกทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร รูปทรงสำเร็จเป็นตัวเอช (H-shape) ปริมาตรต่อหนึ่งถังเท่ากับ 800 มิลลิลิตร ดัดแปลงแบบจาก Mohan และคณะ (2008) ภายในท่อเชื่อมระหว่างถังแอโนดและแคโทดกั้นด้วยเยื่อเลือกผ่านประจุบวก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.4 เซนติเมตร ด้านบนของถังแอโนดเจาะรู 2 รู สำหรับเก็บตัวอย่างและใส่สายอาหารเข้า-ออก สำหรับการเก็บตัวอย่างจะผ่านทางจุกยางที่ต่อหลอดแก้วและสายยางซิลิโคน เมื่อไม่ได้ใช้งานจะหล่อน้ำไว้ภายในสายยางเพื่อทำหน้าที่เป็นท่อปล่อยก๊าซและป้องกันอากาศเข้าไปภายในถัง ก่อนปิดฝาถังแอโนดใส่ยางวง (O-ring) อีกหนึ่งชั้น แล้วยึดด้วยน๊อตสกรูให้แน่นเพื่อป้องกันอากาศเข้า ด้านบนถังแคโทดให้ออกซิเจนด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านทางหัวทราย และต่อสายยางซิลิโคนสำหรับใส่สารละลายบัฟเฟอร์เข้า-ออก นำสายยางซิลิโคนทั้งหมดต่อกับเครื่องปั๊มรีดสาย ทากาวซิลิโคนทุกจุดป้องกันการรั่วซึมของของเหลวและป้องกันอากาศเข้า



ภาพที่ 3.1 รูปแสดงถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่ประกอบจากอะคริลิก รูปทรงตัวเอช (H-shape)

3.1.2 การเตรียมวัสดุสำหรับเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

3.1.2.1 ขั้วไฟฟ้าแอโนดและแคโทด

เลือกใช้ผ้าเส้นใยคาร์บอน เพราะเส้นใยคาร์บอนที่ทอเป็นผ้าทำให้สารละลายและจุลินทรีย์แทรกผ่านได้ทั่วถึง เป็นประโยชน์ต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ ขั้วไฟฟ้าแอโนดมีพื้นที่ผิวเท่ากับ 15 ตารางเซนติเมตร ขั้วไฟฟ้าแคโทดมีขนาดเป็น 5 เท่าของพื้นที่ผิวขั้วไฟฟ้าแอโนด คือเท่ากับ 75 ตารางเซนติเมตร (Dewan และคณะ, 2008)

3.1.2.2 แผ่นเยื่อเลือกผ่านประจุบวก

เลือกใช้แผ่นเยื่อเลือกผ่านประจุบวกนีโอเซปต้า เตรียมแผ่นเยื่อเลือกผ่านประจุบวกตามวิธีของ Mohan และคณะ (2008) จากนั้นนำเยื่อเลือกผ่านประจุบวกขึงระหว่างท่อเชื่อมกลางของถังแอโนดและถังแคโทด ขึงให้ตึงยึดด้วยน๊อตสกรูให้แน่น

3.1.2.3 น้ำเสียสังเคราะห์

สำหรับการทดลองที่เปลี่ยนแปลงภาวะในถังแอโนดโดยการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ จะใช้น้ำเสียสังเคราะห์เป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ ดัดแปลงจากสูตรของณัฏฐริกา ตันติวงศ์ (2550) (ภาคผนวก ก) โดยปรับส่วนประกอบในน้ำเสียสังเคราะห์ให้มีค่าซีโอดีเท่ากับ 2500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่าซีโอดีของน้ำเสียจริงจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องมาลีสามพราน จังหวัดนครปฐม (สุนทรี, 2550)

3.1.2.4 สารละลายบัฟเฟอร์

ถังแคโทดใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข) และเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์โดยเติมโพแทสซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร (You และคณะ, 2006)

3.1.2.5 หัวเชื้อจุลินทรีย์

หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้มาจากถังปฏิกรณ์แบบไร้อากาศในห้องปฏิบัติการของหลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่ผ่านการ

ทำวิจัยเรื่องผลของแหล่งคาร์บอนต่อการลดไนโตรเจนในน้ำเสียโดยกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดย สุนทรี อยู่สถาน (2550) ซึ่งในการทดลองใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องมาลีสาม พราน จังหวัดนครปฐม เช่นเดียวกัน ตะกอนจุลินทรีย์ผสมจากงานวิจัยดังกล่าวถูกนำมาเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ไร้อากาศและให้แหล่งอาหารคือน้ำเสียชุมชนเป็นเวลานาน ด้วยสภาวะนี้จึงเป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์จนกระทั่งสามารถกำจัดจุลินทรีย์พวกก๊าซมีเทนไปได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้อย่างมากเพราะจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้าไม่ต้องการกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซมีเทนได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะแย่งกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซีติก ไปผลิตเป็นก๊าซมีเทนแทนที่จะเป็นสารตั้งต้นให้กับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกระแสไฟฟ้านำมาผลิตกระแสไฟฟ้าได้ ในงานวิจัยนี้เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยดูดตะกอนจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ไร้อากาศปริมาตร 20 มิลลิลิตร เลี้ยงในน้ำเสียสังเคราะห์ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในทุกการทดลองเตรียมตะกอนหัวเชื้อเริ่มต้นให้มีปริมาตรประมาณ 1 กรัมต่อลิตร

ภาพที่ 3.2 แสดงถังปฏิกรณ์แบบไร้อากาศในห้องปฏิบัติการของหลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียภายในถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์จากการเปลี่ยนภาวะในถัง โดยการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ เท่ากับ 12 24 และ 36 ชั่วโมง

3.2.1 การเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ และการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์

เตรียมระบบการทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์โดยใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เตรียมจากข้อ 3.1.2.5 ลงในถังแอโนดที่ประกอบขึ้นจากข้อ 3.1.1 ใส่อาหารคือน้ำเสียสังเคราะห์อย่างต่อเนื่องควบคุมอัตราการไหลเข้าออกด้วยเครื่องปั๊มรีดสาย กำหนดให้ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง ต่อตัว

ต้านทานภายนอกแบบอนุกรมกับเครื่องวัดค่าความต่างศักย์ ตัวต้านทานมีขนาดเท่ากับ 100 โอห์ม วิเคราะห์ค่าความต่างศักย์และค่าซีโอดี ตั้งแต่เริ่มต้นจนค่าความต่างศักย์มีค่าคงที่และเข้าสู่สภาวะเสถียร (steady state) แปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ (Hydraulic retention time: HRT) หรือระยะเวลาในการเก็บกักน้ำในถังปฏิกรณ์เท่ากับ 36 24 และ 12 ชั่วโมง อัตราการไหลของน้ำเสียสังเคราะห์ในแต่ละระยะเวลาสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ (ชั่วโมง)} = \frac{\text{ปริมาตรของของเหลวในถัง (มิลลิลิตร)}}{\text{อัตราการไหลของอาหาร (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)}}$$

จากสมการสามารถคำนวณระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ของน้ำเสียสังเคราะห์ที่ไหลเข้าสู่ระบบที่ 36 ชั่วโมงได้เท่ากับ 19.4 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 29.6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และที่ 12 ชั่วโมงเท่ากับ 58.3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงในแต่ละระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์จะกำหนดให้มีน้ำเสียสังเคราะห์เข้าสู่ระบบทั้งหมด 10 เท่าของปริมาตรถัง คือเท่ากับ 7000 มิลลิลิตร เพื่อให้แน่ใจว่าระบบเข้าสู่สภาวะเสถียรอย่างแท้จริง

3.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตกระแสไฟฟ้า

วิเคราะห์ประสิทธิภาพทางไฟฟ้าตั้งแต่เริ่มต้นเดินระบบจนระบบเข้าสู่สภาวะเสถียรด้วยเครื่องวัดค่าความต่างศักย์ (โวลต์) จากนั้นคำนวณค่าความหนาแน่นกระแสไฟฟ้า และกำลังไฟฟ้าจากสมการดังนี้

$i = \frac{I}{A}$ หรือ $\frac{V}{R_{ex}A}$ i คือ ความหนาแน่นกระแส (หน่วยมิลลิแอมแปร์ต่อตารางเมตร)

I คือ ค่ากระแส (หน่วยมิลลิแอมแปร์)

A คือ ขนาดพื้นที่ผิวของขั้วไฟฟ้าแอโนด (หน่วยตารางเมตร)

V คือ ค่าความต่างศักย์ (หน่วยมิลลิโวลต์)

R_{ex} คือ ค่าความต้านทานภายนอก (หน่วยโอห์ม)

$P = IV = \frac{V^2}{R_{ex}}$ P คือ กำลังไฟฟ้า (หน่วยมิลลิวัตต์)

$P = iV$ P คือ ความหนาแน่นกำลังไฟฟ้า (หน่วยมิลลิวัตต์ต่อตารางเมตร)

3.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย

วิเคราะห์ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากเปอร์เซนต์การลดลงของค่าซีโอดีหรือค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำเสียตลอดการเดินระบบด้วยวิธีย่อยสลายโดยโพแทสเซียมไดโครเมตตามคู่มือวิเคราะห์น้ำเสียของวิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทย

ขั้นตอนการวิเคราะห์ซีโอดี

- นำตัวอย่างน้ำเสียจากถังปฏิกรณ์ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนสารแขวนลอย
- ปิเปตตัวอย่างส่วนน้ำใส 2.5 มิลลิลิตรลงในหลอดย่อยสลาย
- เติมสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมต (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสารละลายกรดซัลฟุริก (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร
- ปิดฝาให้แน่นพอดี แกว่งขวดวนไปมาเพื่อให้สารละลายผสมกันดี
- นำหลอดย่อยสลายใส่ฝังในขาตั้งใส่หลอดแก้วแล้วนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- เปิดฝาหลอดแก้ว แล้วเติมเฟอร์โรอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด แล้วไตเตรทด้วย 0.10N เอฟเอเอสจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง

ในการวิเคราะห์ทุกครั้งทำแบลงค์ (Blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างและทำการวิเคราะห์เหมือนตัวอย่างน้ำ

การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A - B) \times N \times 8000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของเอฟเอเอส ที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

B = มิลลิลิตรของเอฟเอเอส ที่ใช้ไตเตรทน้ำตัวอย่าง

N = นอร์มัลลิตี้ของเอฟเอเอส

$$\text{นอร์มัลลิตีของสารละลายเอฟเอเอส} = \frac{\text{ปริมาตรของ } 0.1N\ K_2Cr_2O_7 \times 0.10}{\text{ปริมาตร FAS ที่ใช้ไตเตรท}}$$

3.2.4 ศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE

เก็บตัวอย่างก่อนเริ่มเดินระบบและหลังจากระบบเข้าสู่สภาวะเสถียรจากนั้นวิเคราะห์โดยดำเนินตามขั้นตอนต่อไปนี้

3.2.4.1 สกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียตามวิธีของ จุฑากานต์ บุญมี (2552) ปิเปต 1.5 มิลลิลิตรของตัวอย่างลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำกัน 3 รอบ จนได้ปริมาณเซลล์ตามต้องการ (ประมาณ 50 มิลลิกรัมของน้ำหนักเปียก) จากนั้นล้างเซลล์ที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปลอดประจุ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสออกให้หมดจากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอปริมาตร 300 ไมโครลิตร เม็ดแก้ว (glass bead) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-0.25 มิลลิเมตร 0.4 กรัม และฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol-chloroform-isoamyl (25:24:1)) ปริมตร 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ นำไปเขย่าด้วยเครื่องปั่นผสมนาน 15-20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนซึ่งมีดีเอ็นเออยู่มาใส่หลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ จากนั้นเติมฟีนอล -คลอโรฟอร์ม -ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol-chloroform-isoamyl (25:24:1)) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกกลับไปมาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ เติม 100% เอทานอลแช่เย็นปริมาตร 800 ไมโครลิตร และ 5 โมลาร์โซเดียมอะซิเตต 0.1 เท่าของปริมาตรน้ำใส เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ พลิกกลับไปมา นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเติม 70% เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอให้สะอาด จากนั้นตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส เอ (RNase A) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมารตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

3.2.4.2 ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจล (gel electrophoresis) และการสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์

เตรียมแผ่นวุ้นความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งผงวุ้นอะกาโรส (agarose gel) 1 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ทริส -อะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า (1XTAE buffer,

ภาคผนวก ข) นำไปหลอมในเตาไมโครเวฟจนวุ้นละลาย ประมาณ 2-3 นาที รอให้วุ้นเย็นลงประมาณ 55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่วางซี่หวี (comb) ลงไปเรียบร้อยเพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับเติมตัวอย่าง รอจนวุ้นแข็งตัว ประมาณ 60 นาที จึงดึงซี่หวีออก จากนั้นวางถาดวุ้นลงในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) เทสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวลงในแชมเบอร์ให้ท่วมแผ่นวุ้นประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอ กับสีติดตาม (6X loading dye, ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 บนแผ่นพาราฟิล์ม นำมาหยอดลงในหลุมบนแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล หลุมแรกให้หยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานแลมด้าดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII marker) เพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านแผ่นวุ้นและบัฟเฟอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ (volt) นาน 30 นาที ขั้นตอนต่อไปย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 15 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยการแช่น้ำกลั่น ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร) ด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Documentation system)

การสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลเพื่อทำให้บริสุทธิ์

ตัดอะกาโรสเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAquick Gel ExtractionKit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิตดังต่อไปนี้ นำชิ้นอะกาโรสเจลที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที พลิกหลอดกลับไปมาจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล ผสมให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดสารละลายที่เหลือติดคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรองในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอ จากนั้นเก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.4.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (Ultraviolet absorption spectroscopy)

ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.2.4.1 ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A260 และ A280) วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอได้จากอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร ถ้าได้ค่าเท่ากับ 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นบริสุทธิ์ แต่ถ้าหากส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนจากโปรตีนซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้ด้วยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ แล้วจึงตกตะกอนด้วยเอธานอลอีกครั้ง แต่ถ้ามีค่าสูงจนใกล้ 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนเปื้อนอยู่มากซึ่งกำจัดได้ด้วยการใส่เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส เอ (RNase A) ความเข้มข้นของดีเอ็นเอคำนวณได้จากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อลิตร) $= A_{260} \times 50 \times$ dilution factor

3.2.4.4 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรีย ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR)

เลือกใช้ไพร์เมอร์ 338F (5’-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3’) และไพร์เมอร์ 518R (5’ATTACCGCGGCTGG-3’) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร , DreamTaq™ PCR Master Mix (Qaigen, Germany) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร , 1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตรของสารละลายไพร์เมอร์ 338F และ 518R อย่างละ 1 ไมโครลิตร และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) โดยกำหนดการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ดังนี้ อ้างอิงจาก Qu และคณะ 2009

1. Initial denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์

2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ

2.1 Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

2.2 Annealing step อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที

(ลดอุณหภูมิลง 0.5 องศาเซลเซียสในแต่ละรอบ)

ดีเอ็นเอต้นแบบจับตัวอย่างเหมาะสมกับไพรเมอร์

2.3 Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที

เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพร์เมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ

3. Denaturation step อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

4. Annealing step อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที

5. Extension step อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที

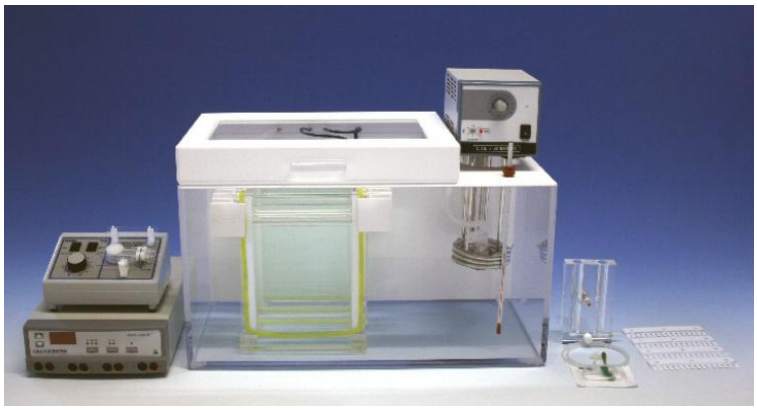
ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 10 รอบ

6. Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 6 นาที

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีความยาวประมาณ 200 คู่เบส (base pair: bp)

3.2.4.5 วิเคราะห์สายพันธุ์ของกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค DGGE

ใช้อุปกรณ์ของ DGGEK-1001 (C.B.S. scientific, USA) ในการวิเคราะห์เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 30-60% จากสารละลาย denaturant 0% และ 100% ภาคผนวก ข ทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามที่ระบุไว้ในคู่มือ เมื่อได้เกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ในชุดแซนวิชเตรียมเจล แล้วเสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิช ระวังอย่างให้มีฟองอากาศ ทิ้งไว้ประมาณ 3-4 ชั่วโมงเพื่อให้พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัว จากนั้นนำชุดแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีทีเออีบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 เท่า ปริมาตร 20 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วจนมีอุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ทั้งหมดที่ได้จากข้อ 3.2.4.4 กับสีติดตาม หยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นเปิดสวิตซ์ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านชุดเจลแซนวิชและทีเออีบัฟเฟอร์ จากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 150 โวลต์ นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นย้อมแผ่นวุ้นพอลิอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องตรวจสอบเจล



ภาพที่3.3 เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค DGGE รุ่น DGGEK-1001

ตัดชิ้นพอลิอะคริลาไมด์เจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่สนใจใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปลอดประจุ 20 ไมโครลิตร แช่ชิ้นเจลไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 20-24 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาจากเจลให้มากที่สุด นำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามวิธการในข้อ 3.2.4.4 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาโหลดลงในพอลิอะคริลาไมด์เจลอีกครั้งเพื่อยืนยันผลว่าแถบดีเอ็นเอที่ตัดมาได้นั้นเป็นแถบดีเอ็นเอเดี่ยวจริง จา กนั้นตัดชิ้นพอลิอะคริลาไมด์เจลบริเวณแถบดีเอ็นเอเดี่ยวในแต่ละแถบนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วนำไปส่งวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ที่เรียกว่า GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

3.3 ศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียในการผลิตกระแสไฟฟ้าเมื่อทดสอบกับน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง

เลือกภาวะการแปรผันระยะกักพักทางชลศาสตร์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกระแสไฟฟ้าได้ดีที่สุดมาใช้ทดสอบ วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการผลิตกระแสไฟฟ้าตามข้อ 3.2.2 ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียตามข้อ 3.2.3 และพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียตามข้อ 3.2.4

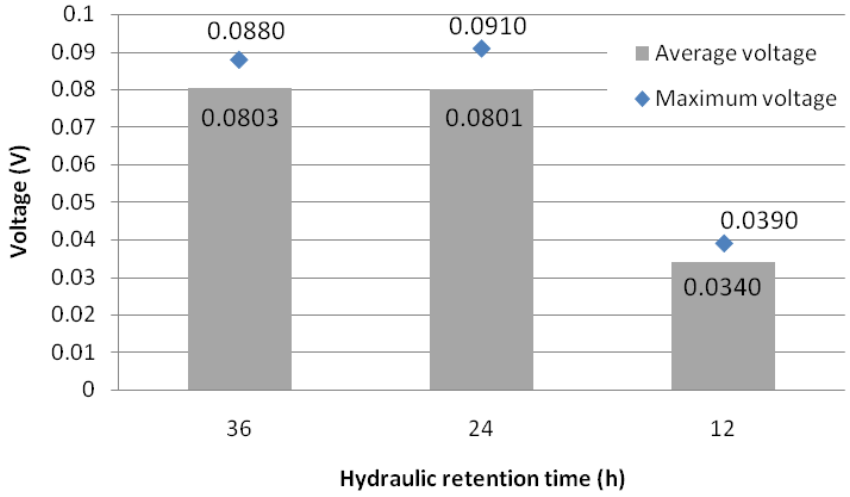
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียภายในถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์จากการเปลี่ยนภาวะในถังโดยการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ เท่ากับ 12 24 และ 36 ชั่วโมง

4.1.1 การแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ (Hydraulic retention time หรือ HRT)

จากการศึกษาผลของการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์โดย ศุกร์นิมิต สุจิรา 2553 พบว่าระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์มีผลทำให้ได้ไฟฟ้าสูงสุดคือ ที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 24 ชั่วโมง

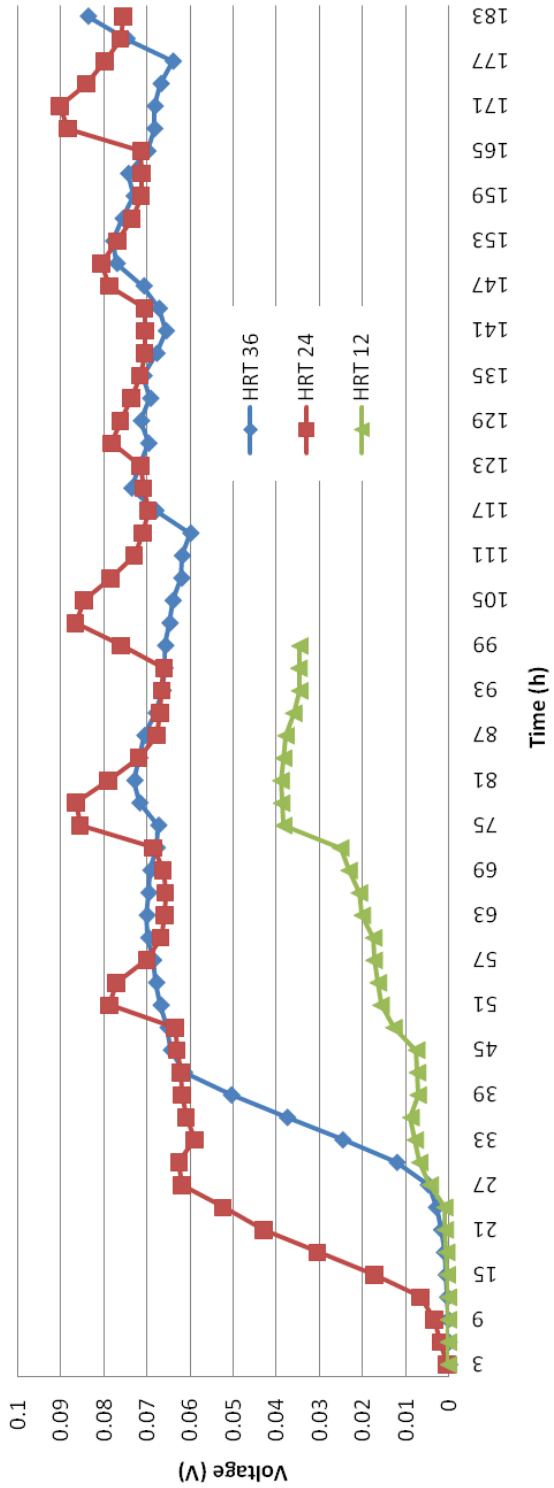
จากผลการทดลองพบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 36 และ 24 ชั่วโมงนั้น มีค่าความต่างศักย์เฉลี่ยในช่วงสภาวะเสถียรใกล้เคียงกันคือ 0.0803 และ 0.0801 โวลต์ ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาค่าความต่างศักย์สูงสุดที่สามารถผลิตได้พบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 24 ชั่วโมง ให้ค่าความต่างศักย์สูงที่สุด คือ 0.0910 โวลต์ และที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 12 ชั่วโมง นั้นมีค่าความต่างศักย์เฉลี่ยในช่วงสภาวะเสถียรต่ำที่สุด คือ 0.0340 โวลต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.1



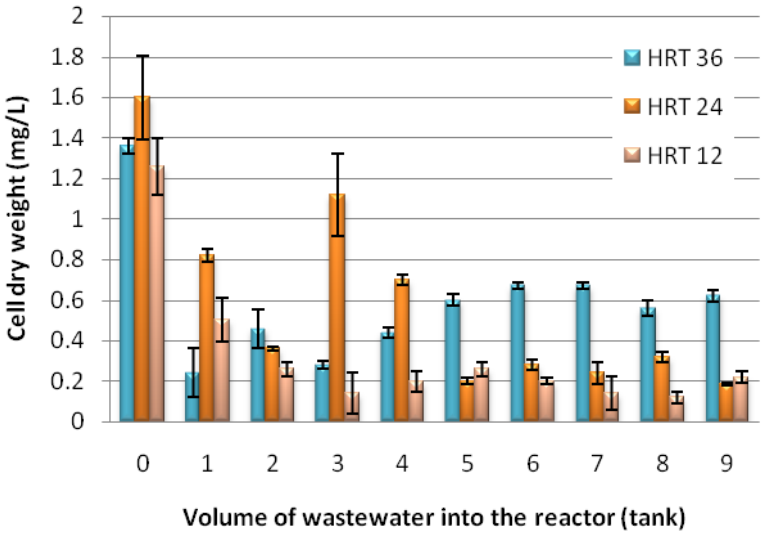
ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงค่าความต่างศักย์เฉลี่ยและค่าความต่างศักย์สูงสุดในแต่ละระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์คือ 36 24 และ 12 ชั่วโมง

จากผลการทดลองในการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ จะเห็นว่าแต่ละระยะเวลาใช้เวลาในการเข้าสู่สภาวะเสถียรไม่เท่ากัน โดยที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 36 ชั่วโมง ใช้เวลาในการเข้าสู่สภาวะเสถียรเร็วที่สุด เนื่องจากระยะเวลาของอาหารที่อยู่ในระบบนานกว่าทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในอาหาร และนำไปสร้างเป็นเซลล์ใหม่จำนวนมาก ทำให้การผลิตความต่างศักย์เร็วและมีค่าเข้าสู่สภาวะเสถียรได้เร็วกว่าที่ระยะเวลาอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 4.2

เมื่อพิจารณาจากปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง มีปริมาณมากที่สุด (ภาพที่ 4.3) เนื่องจากระยะเวลาของอาหารที่เข้าและออกในระบบไม่เท่ากัน เมื่ออาหารอยู่ในระบบนานจุลินทรีย์จะมีเวลาในการย่อยสลายอาหารได้นานกว่า และนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด โดยนำไปสร้างมวล เพิ่มขนาด และเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยมากขึ้น เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นก็จะทำให้ผลิตความต่างศักย์ได้มากขึ้นเช่นกัน แต่จากผลการทดลองพบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง สามารถผลิตค่าความต่างศักย์ได้สูงสุด (0.0910V) ในขณะที่ค่าความต่างศักย์เฉลี่ยของระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 36 และ 24 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกัน (0.0803V และ 0.0801V ตามลำดับ) แม้ว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 36 ชั่วโมงจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยมากกว่า แต่ผลิตความต่างศักย์สูงสุดได้น้อย เป็นเพราะผลของระยะเวลาที่อาหารเข้าและออกจากระบบที่ช้ากว่า ถึงแม้ว่าระยะเวลาที่ของอาหารที่อยู่ในระบบนานกว่าทำให้จุลินทรีย์ใช้อาหารได้หมด เพิ่มจำนวนได้มากกว่า แต่เมื่อจุลินทรีย์มีจำนวนมากทำให้เกิดการภาวะแย่งอาหารกันเพราะอาหารที่ได้มีจำนวนเท่าเดิมไม่พอเพียงต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีจุลินทรีย์แค่บางชนิดที่สามารถอยู่รอดได้ อีกทั้งอัตราในการนำออกจากระบบที่ช้าทำให้มีของเสียตกค้างมาก ในขณะที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 24 ชั่วโมง มีระยะเวลาที่เหมาะสมกว่า คือ อัตราเข้าและออกของอาหารพอดีกับการเจริญของจุลินทรีย์ และพอเหมาะกับการยึดเกาะกับขั้วอิเลคโทรดอีกด้วย จึงทำให้ได้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงสุด เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 12 ชั่วโมง ก็เป็นเหตุผลเช่นเดียวกัน ระยะเวลาของอาหารที่อยู่ในระบบสั้นเกินไปทำให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้น้อย ไม่ทันได้เจริญเติบโตก็ถูกชะออกจากระบบ มาสามารถยึดเกาะกับอิเลคโทรดได้เหนียวแน่นพอจึงมีน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยน้อย และผลิตค่าความต่างศักย์ได้ต่ำที่สุด



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความต่างศักย์เฉลี่ยต่อชั่วโมง ในแต่ละระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์คือ 36 24 และ 12 ชั่วโมง

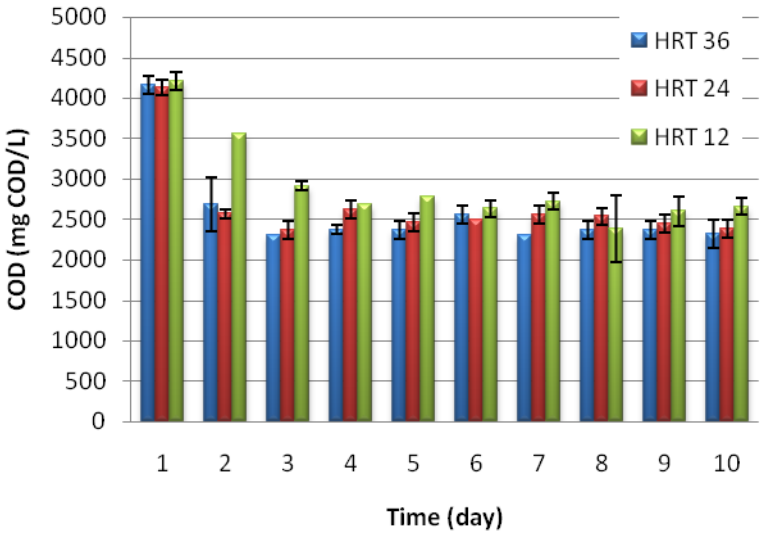


ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยต่อปริมาตรอาหารที่เข้าสู่ระบบ (หน่วยเป็นถัง) ในแต่ละระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์คือ 36 24 และ 12 ชั่วโมง

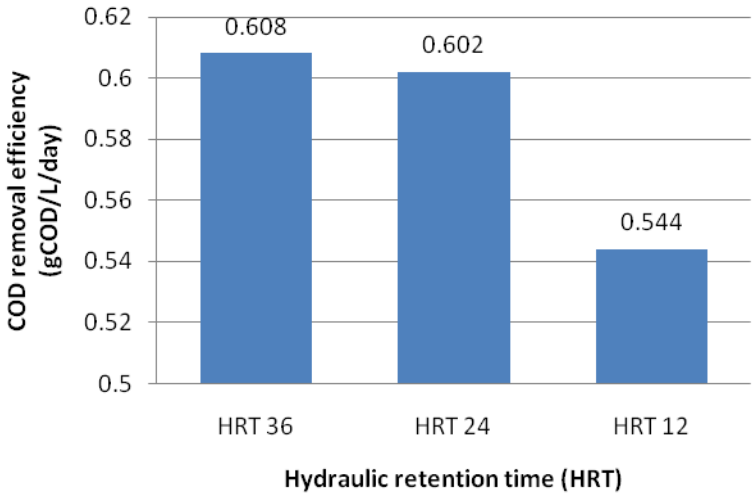
เมื่อคำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยเฉลี่ยในแต่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ เมื่อเข้าสู่สภาวะคงที่ โดยที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 36 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 0.624 กรัมต่อลิตร ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.248 และระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 12 ชั่วโมงเท่ากับ 0.188 กรัมต่อลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด มีความสมดุลกันของอัตราการไหลเข้าของอาหารให้แก่จุลินทรีย์ในระบบกับอัตราการชะล้างออกจากระบบ

4.1.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี (Chemical oxygen demand หรือ COD)

จากการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ทั้ง 3 ระยะเวลา พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีเริ่มลดลงเข้าสู่สภาวะเสถียรในวันที่ 3 โดยที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 36 และ 24 ชั่วโมง นั้นมีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.4) เมื่อคำนวณประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีต่อลิตรต่อวัน พบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 และ 24 ชั่วโมง สามารถกำจัดซีโอดีได้เท่ากับ 0.608 และ 0.602 กรัมซีโอดีต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ และประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีที่ต่ำที่สุดคือที่ 12 ชั่วโมง คือ 0.544 กรัมซีโอดีต่อลิตรต่อวัน ดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าซีโอดีต่อวัน ในแต่ละระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ คือ 36 24 และ 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงประสิทธิภาพของการกำจัดซีโอดีต่อลิตรต่อวัน ในแต่ละระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์คือ 36 24 และ 12 ชั่วโมง

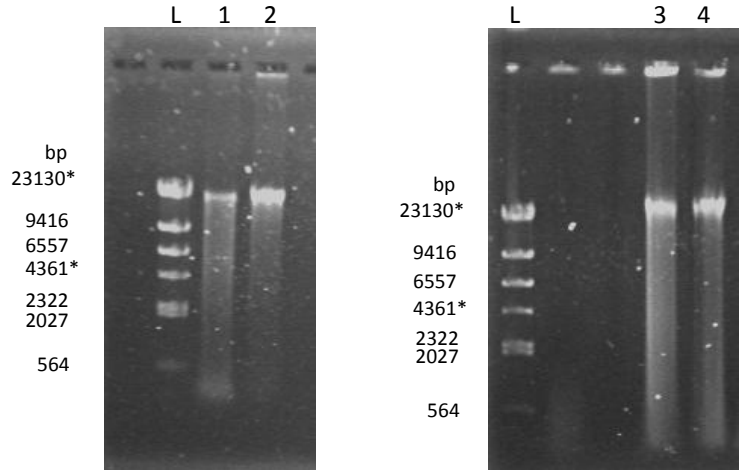
ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีนั้นขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ ค่าพีเอช ค่าความเป็นด่าง ค่ากรดโวลาไทล์ (volatile fatty acid) อัตราส่วนของค่ากรดโวลาไทล์ต่อสภาพความเป็นด่าง และ อุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่อาจมีผลกระทบต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ควบคุมค่าพีเอช และอุณหภูมิ ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบแล้ว และแปรผันเฉพาะระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36

24 และ 12 ชั่วโมง พบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีดีที่สุด เนื่องจากอาหารอยู่ในระบบนานกว่า จุลินทรีย์จึงมีเวลาในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในอาหารได้นาน ทำให้สามารถกำจัดซีโอดีได้มากที่สุด

4.1.3 ศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE

สกัดดีเอ็นเอ

เมื่อการผลิตความต่างศักย์เข้าสู่สภาวะเสถียรแล้ว เก็บตัวอย่างและทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้ง 3 การแปรผัน และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แลมดาดีเอ็นเอ ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII ได้ผลดังนี้



ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้แสดงในรูปของเจลอิเลคโตรโฟเรสิส (gel electrophoresis) ความเข้มข้นเจลเท่ากับ 0.5% โดย ช่องวิ่ง L คือ λ/HindIII marker ช่องวิ่งที่ 1 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอก่อนเริ่มเดินระบบ ช่องวิ่งที่ 2 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง ช่องวิ่งที่ 3 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง และช่องวิ่งที่ 4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 12 ชั่วโมง

จากผลการสกัดดีเอ็นเอดังภาพที่ 4.6 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทั้ง 3 การแปรผัน รวมทั้งดีเอ็นเอจากตัวอย่างก่อนเริ่มเดินระบบมีขนาดความยาวอยู่ที่ประมาณ 23130 คู่เบส เท่ากันหมดทุกตัวอย่าง จากนั้นทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (Ultraviolet absorption spectroscopy) แสดงผลดังตารางที่ 4.1

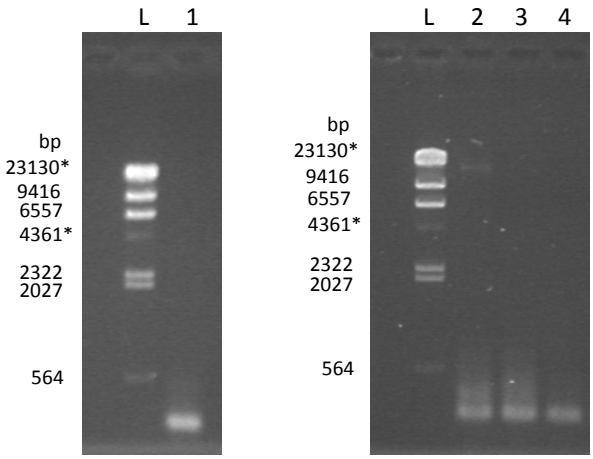
ตัวอย่างดีเอ็นเอ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร	อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร	ปริมาณดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ก่อนเริ่มเดินระบบ	0.227	0.121	1.876	1,135
ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 36 ชั่วโมง	0.140	0.075	1.866	700
ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 24 ชั่วโมง	0.179	0.129	1.387	895
ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 12 ชั่วโมง	0.173	0.116	1.491	865

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างที่การแปรผันต่างๆ

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้อยู่ในเกณฑ์ดีคือมีค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ไม่เกิน 2.0 หมายถึงไม่มีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ (RNA) อยู่ในตัวอย่างดีเอ็นเอ และถ้าได้ค่าเท่ากับ 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอดังการทดลองข้างต้นนั้นมีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ได้ตะกอนดีเอ็นเอปริมาณมากมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง และมีการปนเปื้อนจากโปรตีนน้อย ทำให้ลดระยะเวลาการทำงานให้สั้นลงได้ และเมื่อนำไปทำ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยาจากสารปนเปื้อน

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR)

เมื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรีย ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วย ไพร์เมอร์ 338F (5’-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3’) และไพร์เมอร์ 518R (5’ATTACCGCGGCTGG-3’) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จะมีขนาดความยาวประมาณ 200 คู่เบส เท่ากันหมดทุกตัวอย่าง แสดงในภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 แสดงขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ เมื่อผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในรูปของเจลอิเลคโตรโฟเรสิส ความเข้มข้นเจลเท่ากับ 0.1% โดยช่องวิ่ง L คือ λ/HindIII marker ช่องวิ่งที่ 1 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอก่อนเริ่มเดินระบบ ช่องวิ่งที่ 2 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง ช่องวิ่งที่ 3 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง และช่องวิ่งที่ 4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 12 ชั่วโมง

เมื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรีย ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วย ไพร์เมอร์ 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') และไพร์เมอร์ 518R (5'ATTACCGCGGCTGG-3') ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 200 คู่เบส เท่ากันหมดทุกตัวอย่าง แสดงในภาพที่ 4.7

วิเคราะห์สายพันธุ์ของกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค DGGE

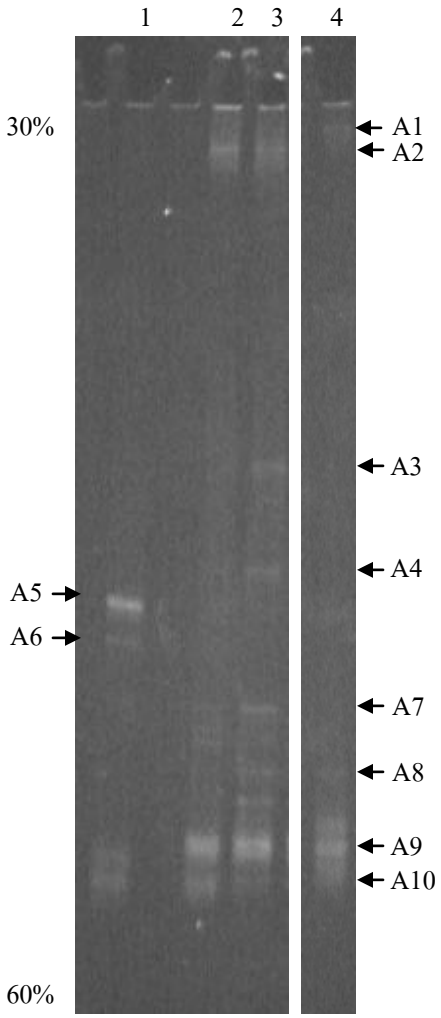
นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดมาทำการ วิเคราะห์สายพันธุ์ของกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค DGGE และใช้สัดส่วนความเข้มข้นของสารจากส่วนบนของเจลที่มีความเข้มข้นน้อยไปสู่ส่วนล่างของเจลที่มีความเข้มข้นมากเท่ากับ 20 – 80%, 30 - 60% และ 40 – 60% พบว่าสัดส่วน 30 - 60% เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดสามารถเห็นความแตกต่างของแถบตัวอย่างได้ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 4.8

จากผลการทดลองพบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ทั้ง 3 ระยะ มีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ในแถวโดยพบว่าหลังจากเดินระบบและมีการผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้าเข้าสู่สภาวะเสถียรแล้ว ปรากฏมีเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง มี

ความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์อื่นๆ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์มีความสำคัญต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบ นั่นคือระยะเวลาของอาหารที่อยู่ในระบบนั้นมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก เมื่อควบคุมให้ปริมาณอาหารเท่ากันคือมีค่าซีโอดีเท่ากับ 2500 มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร และความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ที่มากกว่านี้เองส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ระยะกักพักทางชลศาสตร์ 24 ชั่วโมง สามารถผลิตค่าความต่างศักย์ได้สูงที่สุด เนื่องจากการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ต่างชนิดกัน หรือบางชนิดต้องทำงานร่วมกัน

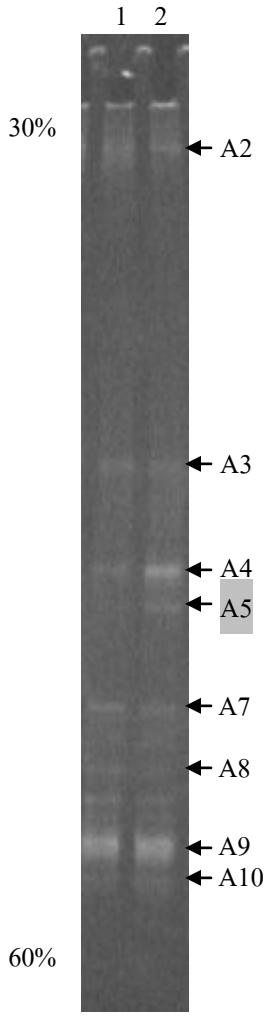
จากการศึกษาเรื่องพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียสังเกตได้ว่ากลุ่มแบคทีเรียก่อนเริ่มเดินระบบนั้นมีจำนวนความหลากหลายน้อยกว่าหลังเดินระบบ เนื่องจากสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของอาหารต่ำ ทำให้จุลินทรีย์มีจำนวนเซลล์น้อย และยังไม่เพิ่มจำนวน มีเพียงบางชนิดที่สามารถปรับตัวได้และมีจำนวนเซลล์มาก แต่เมื่อมีการให้อาหารใหม่แก่จุลินทรีย์จึงทำให้จุลินทรีย์มีการปรับสภาพใหม่และเพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงทำให้ปรากฏชนิดจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น

โดยในการทดลองที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง พบแถบ A2 A3 A4 A7 A8 A9 และ A10 ในเจล DGGE จากนั้นตัดแถบตัวอย่างดังกล่าวไปทำการรันเจล DGGE อีกครั้งเพื่อให้ได้แถบตัวอย่างเป็นแถบเดียวเดี่ยวๆ เมื่อได้แล้วจึงนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST/Blast.cgi) จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ สามารถจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ Proteobacteria, Fimicutes, Actinobacteria และ Candidate division TM7 (ตาราง 4.2) ซึ่งแบคทีเรียในแถบรหัส A9 เป็นแบคทีเรียหลักที่พบอยู่ในทุกระยะการแปรผัน เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์พบว่า แบคทีเรียรหัส A9 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella pneumonia* โดยมีค่าเปอร์เซนต์ identity เท่ากับ 97% *Klebsiella pneumonia* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง สามารถสร้างแคปซูล (encapsulate) ห่อหุ้มตัวเองได้ จึงทำให้สามารถอยู่รอดได้นานกว่าและยึดเกาะกับขั้วอิเลคโทรดก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม และส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับขั้วไฟฟ้าได้โดยตรงด้วยตัวกลางที่สร้างขึ้นเอง (electron shuttle via self-producing mediator) (Lifang และคณะ, 2009)



ภาพที่ 4.8 รูปแสดงเจล DGGE ที่สัดส่วนความเข้มข้นของสารจากส่วนบนไปส่วนล่างเท่ากับ 30-60% โดยช่องวิ่งที่ 1 คือ ดีเอ็นเอตัวอย่างก่อนเริ่มเดินระบบ ช่องวิ่งที่ 2 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง ช่องวิ่งที่ 3 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง และช่องวิ่งที่ 4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 12 ชั่วโมง

เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอบนขั้วอิเลคโทรดที่ระยะกักพักทางชลศาสตร์ 24 ชั่วโมงมารันเจล DGGE พบว่ามีชนิดของแบคทีเรียเหมือนกับตัวอย่างดีเอ็นเอในสารละลายอาหารแต่บนขั้วอิเลคโทรดมีจุลินทรีย์ที่แตกต่างกับจุลินทรีย์ในสารละลายอาหาร 1 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแถบรหัส A5 ดังแสดงในภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 รูปแสดงเจล DGGE ที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง สัดส่วนความเข้มข้นของสารจากส่วนบนไปส่วนล่างเท่ากับ 30 – 60% โดยช่องวิ่งที่ 1 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากสารละลายอาหาร ช่องวิ่งที่ 2 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากขั้วอิเลคโทรด

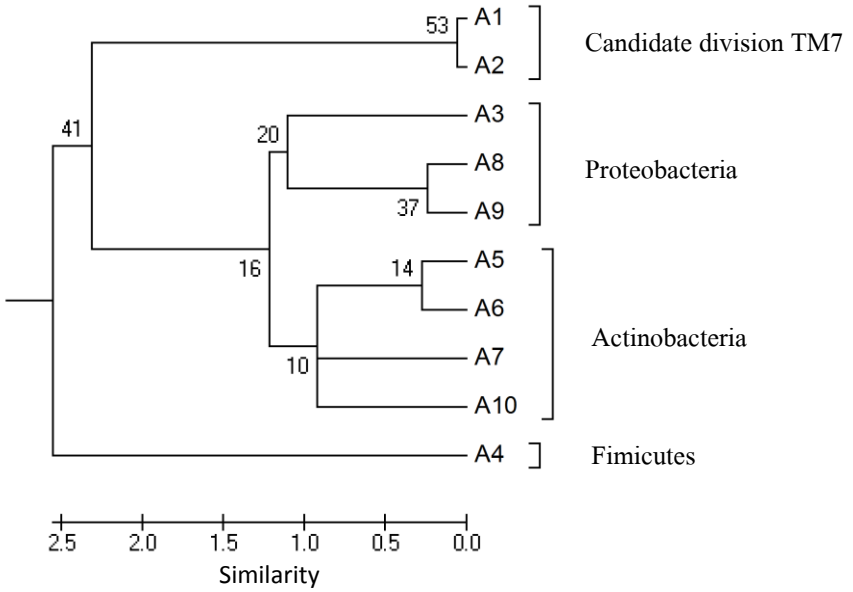
พิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียรหัส A5 พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Mycobacterium bovis* โดยมีค่าเปอร์เซนต์ identity เท่ากับ 74% แสดงในตาราง 4.2 โดยเป็นแบคทีเรียในไฟลัม Actinobacteria สาเหตุที่พบเฉพาะบนขั้วไฟฟ้าอาจเป็นเพราะการดึงดูดกันได้ดีของประจุบนขั้วไฟฟ้ากับประจุบนผนังเซลล์ของ *Mycobacterium bovis* ทำให้ไม่พบในสารละลายอาหารแต่พบเฉพาะขั้วไฟฟ้าเท่านั้น

ชื่อแถบตัวอย่าง	Accession Number	ไฟลัม (Phylum)	ความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลใน GenBank	เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ (% identity)
A1	ABBV01002500.1	Candidate division TM7	Candidate division TM7 single-cell isolate TM7a TM7a_contig_4584, whole genome shotgun sequence	80%
A2	ABBV01001721.1	Candidate division TM7	Candidate division TM7 single-cell isolate TM7a TM7a_contig_2687, whole genome shotgun sequence	84%
A3	AFAD01000009.1	Proteobacteria	*Escherichia coli* 2.4168 ctg1126004750225, whole genome shotgun sequence	92%
A4	ACMN01000078.1	Fimicutes	*Bacillus cereus* Rock4-18 contig00089, whole genome shotgun sequence	96%
A5	AEZH01000008.1	Actinobacteria	*Mycobacterium bovis* BCG str. ATCC 35743 BCG_tice_contig008, whole genome shotgun sequence	74%
A6	AELF01000080.1	Actinobacteria	*Mycobacterium tuberculosis* CDC1551A cont1.80, whole genome shotgun sequence	79%
A7	AEXR01000013.1	Actinobacteria	*Eggerthella sp.* HGA1 contig00029, whole genome shotgun sequence	86%

ชื่อแถบตัวอย่าง	Accession Number	ไฟลัม (Phylum)	ความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลใน GenBank	เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ (% identity)
A8	AFXH01000122.1	Proteobacteria	*Klebsiella pneumoniae* 1191100241 Contig122, whole genome shotgun sequence	90%
A9	AFQK01000047.1	Proteobacteria	*Klebsiella pneumoniae* JH1 contig00085, whole genome shotgun sequence	97%
A10	ACEX01000461.1	Actinobacteria	*Streptomyces himastatinicus* ATCC 53653 cont1.461, whole genome shotgun sequence	88%

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวอย่างจากการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST/Blast.cgi)

จากข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ดังกล่าวสามารถนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแบคทีเรียที่พบในการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 24 ชั่วโมงได้ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ให้การผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้าได้มากที่สุด โดยใช้โปรแกรม MEGA beta program และวิธีวิเคราะห์ข้อมูลการคำนวณ algorithms และการสร้าง tree ซ้ำเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง ได้แก่วิธี distance matrix แบบ minimum evolution (ME) พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่ม คือ Candidate division TM7, Proteobacteria, Actinobacteria และ Fimicutes แสดงในภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (phylogenic tree) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตไฟฟ้าด้วยเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ที่สำคัญอย่างหนึ่งคือระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ เมื่อใช้ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่มีความสมดุลกันเหมาะสมกับจุลินทรีย์ในระบบจะทำให้เกิดประสิทธิภาพในการผลิตไฟฟ้าได้ดีที่สุด ในการทดลองนี้คือระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาประชากรจุลินทรีย์ในระบบพบว่าที่การผลิตไฟฟ้าได้มากที่สุดนั้นมีกลุ่มประชากรจุลินทรีย์หลากหลายที่สุด ได้แก่ แบคทีเรียแถบรหัส A2 A3 A4 A7 A8 A9 และ A10 สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่ม การที่มีกลุ่มประชากรหลากหลายทำให้เกิดการทำงานร่วมกันเนื่องจากสามารถย่อยสลายสารอาหารได้หลากหลายกว่าไม่จำกัดเฉพาะกลุ่มสารอาหารชนิดใดชนิดหนึ่ง มีผลทำให้ได้ผลรวมของการผลิตไฟฟ้าที่สูงกว่า เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มจุลินทรีย์พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่พบในการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง มีกลุ่มแบคทีเรียที่แตกต่างจากการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์อื่นคือ กลุ่มของ Actinobacteria และยังเป็นกลุ่มที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดด้วย

4.2 ศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียในการผลิตกระแสไฟฟ้าเมื่อทดสอบกับน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง

จากผลการทดลองข้อ 4.1 พบว่าภาวะการแปรผันระยะกักพักทางชลศาสตร์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้าได้ดีที่สุดคือ ระยะกักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง จึงเลือกภาวะนี้ในการทดสอบกับน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง จากนั้นวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการผลิตความต่าง

ศักย์ไฟฟ้าตามข้อ 3.2.2 วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียตามข้อ 3.2.3 และศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียตามข้อ 3.2.4

เมื่อนำน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องมาทำการทดลอง ได้วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของน้ำเสียดังแสดงในตาราง 4.3 จากข้อมูลดังกล่าวก่อนนำน้ำเสียมาใช้ในการทดลองทำการกรองก่อน และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7 (ศุกร์นิมิต, 2553)

ลักษณะของน้ำเสีย	ปริมาณที่พบ
สีและกลิ่น	สีขาวขุ่น ได้กลิ่นข้าวโพดและสับปะรด มีตะกอน กากผลไม้
อุณหภูมิ	31 องศาเซลเซียส
ซีโอดี	1888 มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร
pH	8.5

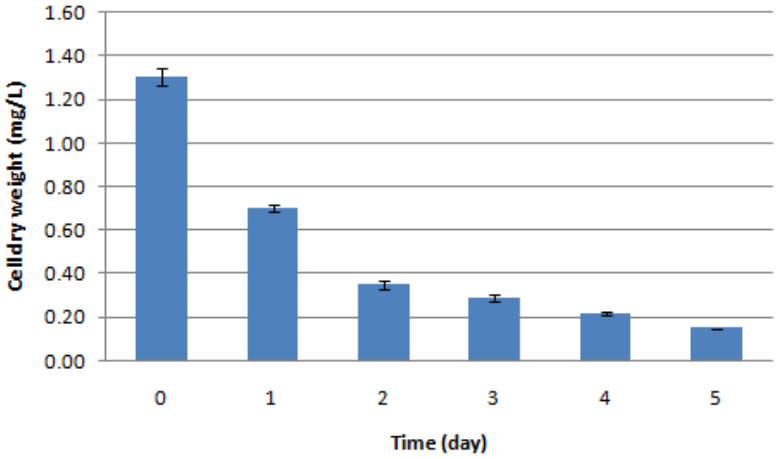
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์เบื้องต้นของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง

4.2.1 ประสิทธิภาพในการผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้า

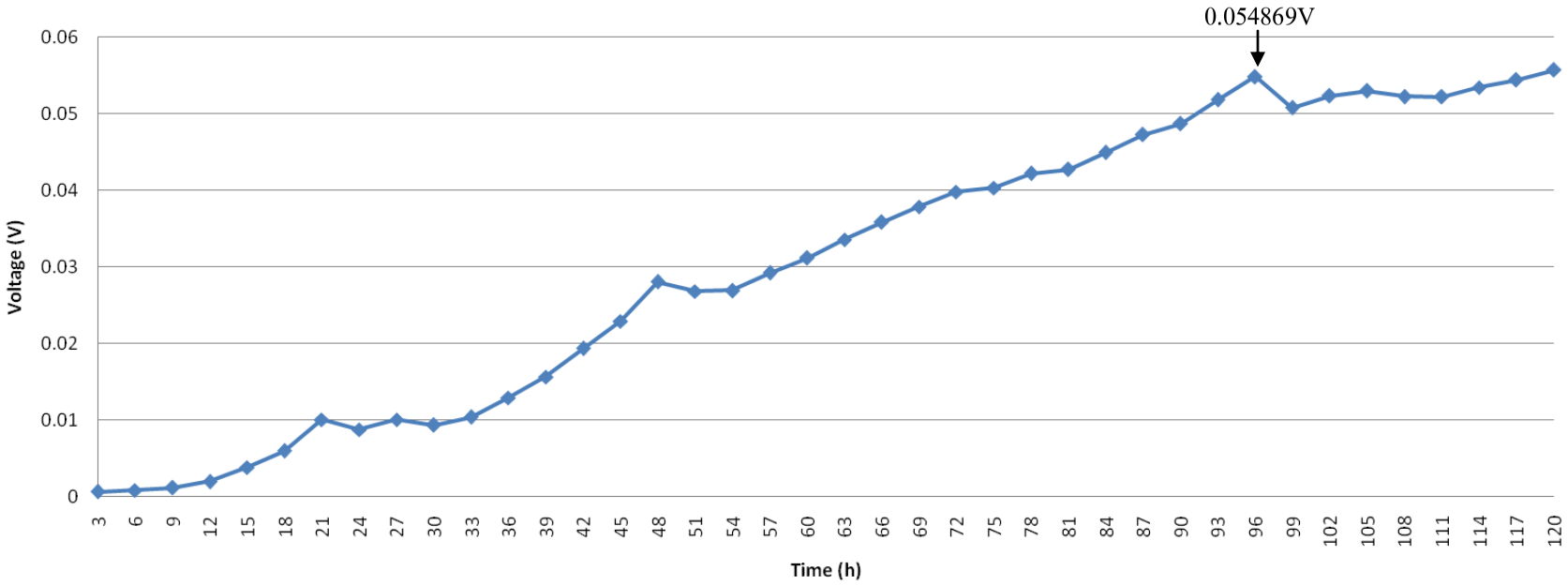
หลังจากทำการเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์พบว่าสามารถผลิตความต่างศักย์เฉลี่ยเมื่อเข้าสู่สภาวะคงที่แล้วเท่ากับ 0.0530V และผลิตค่าความต่างศักย์สูงสุดได้เท่ากับ 0.0548V ดังแสดงในภาพที่ 4.10 จากผลการทดลองดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบการทดลองนี้กับการทดลองแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ใช้อาหารคือน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 2500 มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร พบว่าในระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมงเหมือนกัน เมื่อใช้อาหารเป็นน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องนั้นมีค่าการผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า ในขณะที่เมื่อใช้อาหารเป็นน้ำเสียสังเคราะห์ให้ค่าความต่างศักย์เฉลี่ยเมื่อเข้าสู่สภาวะเสถียรเท่ากับ 0.0801V และความต่างศักย์สูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 0.0910V

เนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องนั้นมีค่าซีโอดีต่ำกว่า หมายถึงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องนั้นมีสารอินทรีย์ที่เป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ในระบบน้อยกว่าอาหารจากน้ำเสียสังเคราะห์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องพบว่ามีค่าเท่ากับ 1.33 กรัมต่อลิตรเท่านั้น (ศุกร์นิมิต , 2553) ในขณะที่ในน้ำเสียสังเคราะห์มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 3.168 กรัมต่อลิตร เป็นเหตุผลที่ทำให้การผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้ามีค่าต่ำ

เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตความต่างศักย์เข้าสู่สภาวะเสถียร พบว่าใช้เวลานานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 24 ชั่วโมงแต่ใช้อาหารเป็นน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้เวลาประมาณ 4 วันจึงเข้าสู่สภาวะเสถียร ในขณะที่น้ำเสียสังเคราะห์ใช้เวลาประมาณ 1 วัน เนื่องจากน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องนั้นอาจมีปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้มีการเจริญเติบโตช้า ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ต่ำกว่า สารอินทรีย์อื่นๆที่ย่อยสลายได้ยาก ทำให้ใช้เวลานานในการผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้า และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยเฉลี่ยเมื่อการผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้าเข้าสู่สภาวะเสถียรเท่ากับ 0.185 กรัมต่อลิตร



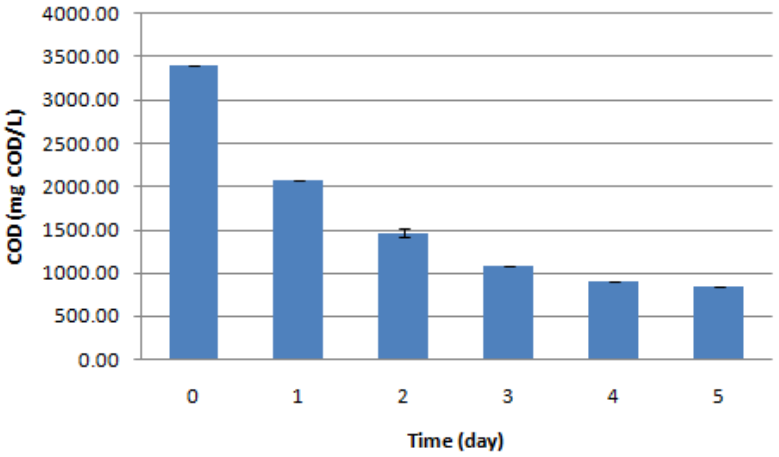
ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยต่อวัน เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องเป็นอาหารแก่ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ ควบคุมระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความต่างศักย์เฉลี่ยต่อชั่วโมง เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องเป็นอาหารของจุลินทรีย์ในระบบอย่างต่อเนื่อง โดยควบคุมให้ระยะกักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง

4.2.2 ประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี

จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่าค่าซีโอดีลดลงและเข้าสู่สภาวะเสถียรในวันที่ 4 เป็นต้นไป มีค่าซีโอดีเฉลี่ยคงที่เท่ากับ 872 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีเป็นเปอร์เซนต์ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์นี้สามารถกำจัดค่าซีโอดีจากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องได้ถึง 54%



ภาพที่ 4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าซีโอดีต่อวัน เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องเป็นอาหารแก่ระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ และควบคุมระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง

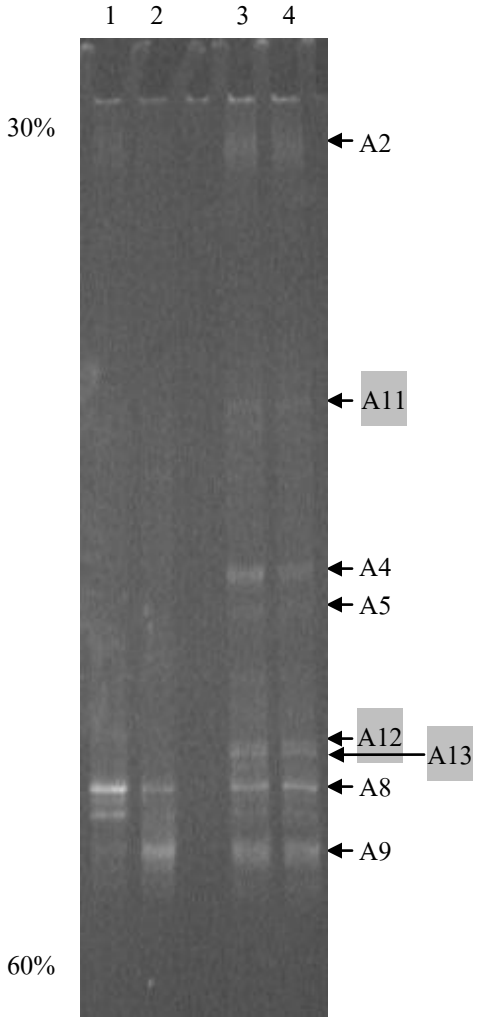
4.2.3 ศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้ง 4 คือ น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง ตัวอย่างน้ำเสียกับจุลินทรีย์ก่อนเริ่มเดินระบบ ตัวอย่างเมื่อระบบผลิตไฟฟ้าเข้าสู่สภาวะเสถียร และตัวอย่างบนขั้วอิเลคโทรดในห้องขั้วไฟฟ้าแอโนด โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทั้ง 4 มีขนาดความยาวอยู่ที่ประมาณ 23130 คู่เบส เท่ากันหมดทุกตัวอย่าง จากนั้นทำการ ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต แสดงผลดังตารางที่ 4.4

ตัวอย่างดีเอ็นเอ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร	อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร	ปริมาณดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
น้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง	0.116	0.102	1.137	580
ก่อนเริ่มเดินระบบ	0.121	0.122	0.991	605
เมื่อความต่างศักย์เข้าสู่สภาวะเสถียร	0.144	0.119	1.210	720
ขั้วอิเลคโทรด	0.165	0.132	1.250	825

ตาราง 4.4 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างเมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องในการทดสอบ

จากนั้นนำไป เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16s rDNA ของแบคทีเรีย ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และนำไปศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียต่อไปด้วยเทคนิคดีจีจีอี พบว่าจำนวนประชากรจุลินทรีย์เมื่อการผลิตกระแสไฟฟ้าเข้าสู่สภาวะเสถียรแล้วมีจำนวนชนิดเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจุลินทรีย์เมื่อเริ่มต้นทั้งก่อนการเดินระบบและในตัวอย่างน้ำเสียเพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์เด่น (Dominant species) ที่ปรากฏในทุกตัวอย่าง ได้แก่ แถบรหัส A8 และ A9 เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วคือ *Klebsiella pneumoniae* แต่ต่างสายสายพันธุ์กัน (strain) ดังแสดงในตาราง 4.2 แต่เมื่อพิจารณาความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผลิตได้พบว่ามีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่ 24 ชั่วโมงเหมือนกัน ในขณะที่จำนวนชนิดของแบคทีเรียในระบบนั้นก็มีจำนวนเท่ากัน ได้แก่ แบคทีเรียแถบรหัส A2 A4 A5 A8 A9 A11 A12 และ A13 เป็นเพราะว่าการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่ให้กับระบบเซลล์เชื้อเพลิงทำให้กลุ่มแบคทีเรียเกิดการปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งอาหารใหม่ เมื่อทำการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแบคทีเรียพบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม และมีกลุ่ม Proteobacteria และ Fimicutes เป็นกลุ่มหลัก



ภาพที่ 4.14 รูปแสดงเจล DGGE เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องในการทดลองเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ ควบคุมระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง โดยช่องวิ่งที่ 1 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากน้ำเสียของโรงงาน ช่องวิ่งที่ 2 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ในระบบ+น้ำเสียของโรงงานก่อนเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ ช่องวิ่งที่ 3 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอในสารละลายน้ำเสียเมื่อการผลิตความต่างศักย์เข้าสู่สภาวะเสถียร และช่องวิ่งที่ 4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากขั้วอิเลคโทรดเมื่อการผลิตความต่างศักย์เข้าสู่สภาวะเสถียร

ชื่อแถบตัวอย่าง	Accession Number	ไฟลัม (Phylum)	ความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลใน GenBank	เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ (% identity)
A11	NC_015949.1	*Firmicutes*	*Caldicellulosiruptor lactoaceticus* 6A chromosome, complete genome	84%
A12	ACMU01000144.1	*Firmicutes*	*Bacillus mycoides* DSM 2048 contig00387, whole genome shotgun sequence	88%
A13	AFTC01000040.1	*Proteobacteria*	*Acinetobacter baumannii* ABNIH4 contig00042, whole genome shotgun sequence	89%

ตาราง 4.5 ตารางแสดงผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวอย่างเมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST/Blast.cgi)

เมื่อพิจารณาแบคทีเรียสังเกตได้ว่าชนิดแบคทีเรียที่พบนั้นแตกต่างจากการใช้แหล่งอาหารน้ำเสียสังเคราะห์คือแบคทีเรียแถบรหัส A11 A12 และ A13 เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วคือ *Caldicellulosiruptor lactoaceticus, Bacillus mycoides* และ *Acinetobacter baumannii* ตามลำดับ (ตาราง 4.5) อาจเป็นเพราะแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสารอินทรีย์ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง จึงสามารถเจริญได้ดีและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากช่วงก่อนเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิง

จากผลการศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบแล้วพบว่าแบคทีเรียแถบรหัส A3 A7 และ A10 *(Escherichia coli, Eggerthella sp.* และ *Streptomyces himastatinicus* ตามลำดับ) อาจเป็นแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ ทำให้เกิดสารตั้งต้นของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ 2 ตัวหลักคือ อิเล็กตรอนและโปรตรอนจำนวนมาก ส่งผลให้การผลิตกระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียภายในถังเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์จากการเปลี่ยนภาวะในถัง โดยการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ เท่ากับ 36 24 และ 12 ชั่วโมง พบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 36 และ 24 ชั่วโมง เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์สามารถผลิตความต่างศักย์เฉลี่ยได้ใกล้เคียงกันคือ 0.0803 และ 0.0801 โวลต์ ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาค่าความต่างศักย์สูงสุดที่สามารถผลิตได้พบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 24 ชั่วโมง ให้ค่าความต่างศักย์สูงที่สุด คือ 0.0910 โวลต์ และที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 12 ชั่วโมง นั้นผลิตความต่างศักย์เฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.0340 โวลต์ เนื่องจากระยะเวลาของอาหารที่อยู่ในระบบนานกว่าทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในอาหารได้หมด และนำไปสร้างเป็นเซลล์ใหม่จำนวนมาก และส่งผลให้การผลิตความต่างศักย์เกิดเร็วและมีค่าเข้าสู่สภาวะเสถียรได้เร็วกว่าที่ระยะเวลาอื่นๆ พิจารณาได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย ปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอยที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง นั้นมีปริมาณมากที่สุด แต่ค่าความต่างศักย์ที่ผลิตได้สูงสุดนั้นเป็นระยะเวลากักพักทางชลศาตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง แม้ว่าที่ระยะกักพักทางชลศาสตร์ 36 ชั่วโมงนั้นจะมีการเจริญในปริมาณที่มากกว่า แต่ก็ไม่เหมาะสมกับการผลิตไฟฟ้า เนื่องจากอัตราเข้าและออกของอาหารที่ไม่สมดุลกันกับจุลินทรีย์ในระบบ ซึ่งที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมงนั้นมีระยะเวลาที่อาหารอยู่ในระบบเหมาะสมกว่าจึงทำให้ผลิตความต่างศักย์ได้สูงสุด และเข้าสู่สภาวะเสถียรได้เร็วกว่า

คำนวณประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดี พบว่าที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 และ 24 ชั่วโมง สามารถกำจัดซีโอดีได้เท่ากับ 0.608 และ 0.602 กรัมซีโอดีต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ และประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีที่ต่ำที่สุดคือที่ 12 ชั่วโมง คือ 0.544 กรัมซีโอดีต่อลิตรต่อวัน

ศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียสังเกตได้ว่ากลุ่มแบคทีเรียก่อนเริ่มเดินระบบนั้นมีจำนวนความหลากหลายน้อยกว่าหลังเดินระบบ เนื่องจากสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของอาหารต่ำ ทำให้จุลินทรีย์มีจำนวนเซลล์น้อย และยังไม่เพิ่มจำนวน มีเพียงบางชนิดที่สามารถปรับตัวได้และมีจำนวนเซลล์มาก แต่เมื่อมีการให้อาหารใหม่แก่จุลินทรีย์จึงทำให้จุลินทรีย์มีการปรับสภาพใหม่และเพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงทำให้ปรากฏชนิดจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งแบคทีเรียเด่นที่พบในทุกการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์คือ แบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ JH1จากข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่พบทั้งหมดสามารถนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแบคทีเรีย โดยสามารถจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ Proteobacteria, Fimicutes, Actinobacteria และCandidate division TM7

เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องมาใช้กับระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมและผลิตความต่างศักย์ได้ดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้า คือ ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตความต่างศักย์สูงสุดได้ 0.0548โวลต์ และมีประสิทธิภาพในการบำบัดซีโอดี โดยสามารถกำจัดซีโอดีได้ถึง 54 เปอร์เซนต์ ผลการศึกษาพลวัตของกลุ่มแบคทีเรียสังเกตได้ว่าแบคทีเรียเด่นที่พบ ได้แก่ แบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ JH1 และ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ 1191100241 จากข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่พบสามารถนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแบคทีเรียได้ 4 กลุ่มเช่นเดียวกันคือ Proteobacteria, Fimicutes, Actinobacteria และ Candidate division TM7

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสิ่งที่มีผลต่อการผลิตไฟฟ้าในการทดลองนี้ ได้แก่ ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ โดยระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่เหมาะสมและสมดุลกัน จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตความต่างศักย์สูง และด้วยระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ที่เหมาะสมนี้ทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพมาก ดังแสดงให้เห็นในการทดลองแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง ทั้งในน้ำเสียสังเคราะห์และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์อื่น และจะเห็นได้ว่ามีชนิดจำนวนแบคทีเรียเท่ากันแม้ว่าการผลิตความต่างศักย์จะได้ไม่เท่ากันเนื่องจากสารอาหารแตกต่าง นอกเหนือจากสารอาหารที่แตกต่างแล้วชนิดแบคทีเรียยังมีผลต่อการผลิตไฟฟ้าด้วย จากผลการทดลองงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียหลักที่พบในการเดินระบบเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์คือ *Klebsiella pneumoniae* เหมือนกันทุกการแปรผันปัจจัย ดังนั้นการที่เซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ผลิตความต่างศักย์ไฟฟ้าได้สูงนั้นจึงเกี่ยวข้องกับการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มที่แตกต่างไป ที่อาจมีส่วนช่วยให้การย่อยสลายสารอาหารนั้นเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฟฟ้ามากขึ้น ได้แก่ *Escherichia coli, Eggerthella sp.* และ *Streptomyces himastatinicus*

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จุฑากานต์ บุญมี . การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต , สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

ชลทิศา สุขเกษม. 2554. เซลล์เชื้อเพลิงจุลชีพ : เทคโนโลยีนวัตกรรม "แปลงน้ำเสียเป็นไฟฟ้า". วิศวกรรมสาร มข. 38, 3 (347 –362) (กรกฎาคม – กันยายน 2554).

ณัฏฐริกา ตันติวงศ์. ผลของคลอไรด์ที่มีต่อการกำจัดซีโอดีในน้ำเสียปิโตรเคมีโดยใช้ระบบยูเอสบี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต , สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

วิศวกรรมฐานแห่งประเทศไทย. คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. กรุงเทพฯ: บริษัทจุดทอง. 2545.

ศุกร์นิมิต สุจิรา. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกระแสไฟฟ้าในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์แบบห้องคู่โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต , สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.

สุนทรี อยู่สถาน . ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการลดไนโตรเจนในน้ำเสียโดยกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต , สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. จุลชีววิทยาของน้ำเสีย . พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . 2548.

สำนักนโยบายและแผนพัฒนาการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร . รายงานภาวะเศรษฐกิจการเกษตรปี 2554 และแนวโน้มปี 2555. 2554.

ภาษาอังกฤษ

Allen, R.M. and Bennetto, H.P. Microbial fuel cells: Electricity production from carbohydrates. Applied Biochemistry and Biotechnology. 39-40: 27–40. 1993.

Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K-H. Phylogenetic identification an in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological reviews. 59: 143-169. 1995.

Behera, M. and Ghangrekar, M.M. Performance of microbial fuel cell in response to change in sludge loading rate at different anodic feed pH. Bioresource Technology. 100: 5114–5121. 2009.

Campbell, N.A., Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. and Jackson, R.B. Biology 8th ed. Pearson education, Inc., San Francisco. 2008.

Catal, T., Li, K., Bermek, H. and Liu, H. Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. Journal of Power Sources. 175: 196–200. 2008.

DelDuca, M. G., Friscoe, J. M. and Zurilla, R. W. Developments in Industrial Microbiology. American Institute of Biological Sciences. 4: 81–84. 1963.

Deleney, G.M., Bennetto, H.P., Mason, J.R., Roller, S.D., Stirling, J.L. and Thurston, C.F. Electron-transfer coupling in microbial fuel cells. 2. Performance of fuel cells containing selected microorganism-mediator-substrate combinations. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 34:13-27. 1984.

Dewan, A., Beyenal, H. and Lewandowski, Z. Scaling up microbial fuel cells. Environmental Science Technology. 42: 7643-7648. 2008.

Du, Z., Li, H., and Gu, T. A State of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. Biotechnology Advances. 25:464-482. 2007.

Dumas, C., Molica, A., Féron, D., Basséguy, R., Etcheverry, L. and Bergel, A. Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. Electrochimica Acta. 53: 468-473. 2007.

Gorby, Y.A., Dohnalkova, A., Rosso, K.M., Yanina, S., Marshall, M.J., Beliaev, A.S., Moyles, D., Korenevski, A., Beveridge, T.J., McLean, J.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Shi, L., Elias, D.A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Hill, E.A., Zachara, J.M., Nealson, K.H. and Fredricson, J.K. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 103: 11358–11363. 2006.

Khanal, S.K. Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production Principles and Applications. Singapore: Fabulous Printers Pte Ltd. 2008.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 5: 150-163. 2004.

Liu, H., Cheng, S. and Logan, B.E., Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. Environmental Science Technology. 39: 5488-5493. 2005.

Liu, H., Ramnarayanan, R. and Logan, B.E. Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. Environmental science and technology. 38: 2281-2285. 2004.

Logan, B.E. Microbial Fuel Cells. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2008.

Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schroder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W. and Rabaey, K. Microbial fuel cells: Methodology and Technology. Environmental science and Technology. 17: 5181-5192. 2006.

Logan, B.E., Cheng, S., Watson, V. and Estadt, G. Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells. Environmental science and technology. 41: 3341–3346. 2007.

Lu, N., Zhou, S.-G., Zhuang, L., Zhnag, J.-T. and Ni, J.-R. Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology. Biochemical Engineering Journal. 43: 246–251. 2009.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. Brock Biology of Microorganisms, 9th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. 2000.

Magnuson, T.S., Isoyama, N., Hodges-Myerson, A.L., Davidson, G., Maroney, M.J., Geesey, G.G. and Lovley, D.R. Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89 kDa Fe(III) reducing cytochrome c from Geobacter sulfutteducens. Biochemical Journal. 359:147-152. 2001.

Min, B., Cheng, S. and Logan, B.E. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. Water Research. 39: 1675-1686. 2005a.

Min, B., Kim, J.R., Oh, S.E., Regan, J.M. and Logan, B.E. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. Water Research. 39: 4961-4968. 2005b.

Mohan S. V., Mohanakrishna, G., Srikanth, S. and Sarma, P. N. Harnessing of bioelectricity in microbial fuel cell (MFC) employing aerated cathode through anaerobic treatment of chemical wastewater using selectively enriched hydrogen producing mixed consortia. Fuel. 87: 2667-2676. 2008.

Muyzer, G., Waal, E.C.D. and Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 59: 695-700. 1993.

Muyzer, G. and Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek. 73: 127-141. 1998.

Myers, C.R. and Myers, J.M. Localization cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown Shewanella putrefacians MR-1. Journal of Bacteriology. 174:3429-3438. 1992.

Olsen, G.J. and Woese, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. The Faseb journal. 7: 113-123. 1993.

Patil, S.A., Surakasi, V.P., Koul, S., Ijmulwar, S., Vivek, A., Shouche, Y.S. and Kapadnis, B.P. Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber. Bioresource Technology. 100: 5132–5139. 2009.

Park, D.H. and Zeikus, J.G. Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. Biotechnology and Bioengineering. 81: 348- 355. 2003.

Penn state live. (March. 30, 2009). Microbes turn carbon dioxide into methane.

Potter, M.C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences. 84: 160–276. 1911.

Prescott, L., Harley, J. and Klein, D. Microbiology 4th ed. United states of America : McGraw-Hill. 1999.

Qu, Y-Y., Zhang, Q., Wei, L., Ma, F., Zhou, J-T., Pi, W-Q. and Gou, M. Optimization of metagenomic DNA extraction from activated sludge samples. Asia-Pacific journal of Chemical Engineering. 4: 780-786. 2009.

Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S.D., Verhaege, M. and Verstraete, W. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. Applied and Environmental Microbiology. 70: 5373-5382. 2004.

Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P. and Verstraete, W. Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. Environmental science and technology. 39: 8077-8082. 2005.

Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S.D. and Verstraete, W. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. Biotechnology letters. 25: 1531-1535. 2003.

Rae, K.J., Cheng, S., Oh, S. and Logan, B.E. Power generation using different cation, anion, and ultrafiltration membranes in microbial fuel cells. Environmental Science and Technology. 41: 1004-1009. 2007.

Reguera, G. McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T. and Lovley, D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. Nature. 435: 1098-1101. 2005.

Rinaldi, A., Mecheri, B., Garavaglia, V., Licoccia, S., Nardo, P.D and Traversa, E. Engineering materials and biology to boost performance of microbial fuel cells: a critical review. Energy and Environmental Science. 1: 417-429. 2008.

Ringeisen, B.R., Henderson, E., Wu, P.K., Pietron, J., Ray, R. and Little, B. High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP 10. Environmental science and technology. 40: 2629-2634. 2006.

Sarinee, O., Mana, S., Sumittra, C. and Toshihide, K. Impidance analysis of bio fuel cell electrodes. Biocensors and Bioelectronics. 23: 721-7272007.

ScienceDaily (Nov. 12, 2007). New method converts organic matter to hydrogen fuel easily and efficiently.

Suzuki, S., Karube, I., Matasunga, T. and Tsuru, S. Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum.* Biocheimica et Biophysica Acta. 24: 338–343. 1976.

Tamura, K, Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 24: 1596–1599. 2007.

You, S., Zhao, Q., Zhang, J., Jiang, J. and Zhao, S. A microbial fuel cell using permanganate as the cathodic electron acceptor. Journal of power sources. 162: 1409-1415. 2006.

Ward, A. and Bora, N. 2004. Workshop on denaturing grad ient gel electrophoresis. 4 – 6th May. Department of Biology. Faculty of Science. Chiang Mai University. 2004.

Woese, C. R., Magrum, L. J. and Fox, G. E. Archaebacteria. Journal of Molecular Evolution. 11: 245–252. 1978.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำเสียสังเคราะห์

กลูโคส	3.168 กรัม
ยูเรีย	0.076 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.313 กรัม
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	0.1 กรัม
โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	0.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110ºC เป็นเวลา 20 นาที

ปรับความเป็นกรดด่างของน้ำเสียสังเคราะห์โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

นำโปตัสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ไปอบแห้งที่ 130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาชั่ง 4.913 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 167 มิลลิลิตร และเติมเมอคิวริกซัลเฟต ($HgSO_4$) 33.3 กรัม ทิ้งให้ละลาย แล้วปล่อยให้เย็น เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายกรดซัลฟูริกสำหรับการวิเคราะห์ซีโอดี

เติมซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 5.5 กรัม ลงในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 540 มิลลิลิตร หรือ 1 กิโลกรัม ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลายหมด เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายเฟอร์โรอินดิเคเตอร์

ละลาย 1,10 – ฟีแนนโทลีนโมโนไฮเดรต 1.485 กรัม และเฟอริกซัลเฟต 695 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นเจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดหลอดหยดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท

นำโปตัสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท ($C_8H_5KO_4$) มาบดแล้วอบแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส นำมาชั่ง 425 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และเจือจางจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งโปตัสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท 1 กรัม มีซีโอดีเท่ากับ 1.176 กรัม ออกซิเจนและสารละลายนี้จะมีซีโอดีเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 โมลาร์

ละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 39.2 กรัม ในน้ำกลั่น เตรียมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นนำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอนสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมตทุกครั้งที่ใช้

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 17.41 กรัม และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8.71 กรัม เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมเปอแมงกาเนสความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์

นำเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 200 กรัม มาเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

70% เอธานอล

นำเอธานอล 99.99% ปริมาตร 700 มิลลิลิตร มาเจือจางกับน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร จะได้เอธานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 1 ลิตร

10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

ค่อยๆละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จนได้สารละลายใส จากนั้นเติมน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 7.31 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15% Triton X-100

นำ Triton X-100 15 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลาย Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$) 6.056 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.0 จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์

นำ EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2.2H_2O$) 186.1 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ ปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอดไซด์ 20 กรัม คนให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็น แล้วปรับ pH 8.0 จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

นำ EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2.2H_2O$) 18.164 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ ปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอดไซด์ 20 กรัม คนให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็น แล้วปรับ pH 8.0 จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

DNA breaking buffer

15% Triton X-100	26.67	มิลลิลิตร
10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	20	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0	40	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์	40	มิลลิลิตร
Tris – HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	18.33	มิลลิลิตร

TE buffer

Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

TE buffer ที่ผสมกับ RNase A

TE buffer	1	มิลลิลิตร
RNase A	2	ไมโครลิตร

เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

บัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 50 เท่า

Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$)	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มิลลิลิตร

กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) 57.1 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรโดยเติมน้ำปลอดประจุปปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

ละลายโซเดียมอะซิเตท 0.0410 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 5.2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น	10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	20	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		200	มิลลิลิตร

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์จนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชาหุ้มด้วยกระดาษทึบแสงเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกันเนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง)

สีติดตาม (6X loading dye)

ซูโครส	20	กรัม
โบรโมฟีนอลบลู (ละลาย 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)	12.5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย TE buffer จนได้ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ 50 ไมโครลิตร

DreamTaq™ PCR Master Mix (2X)	25	ไมโครลิตร
Forward Primer 10 µM ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1-1.0 µM	0.5	ไมโครลิตร
Reverse Primer 10 µM ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1-1.0 µM	0.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ	2	ไมโครลิตร
น้ำ PCR grade	22	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีจีจีอี

0% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์เจล/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	78	มิลลิลิตร

100% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์เจล/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
ฟอร์มาไมด์	40	มิลลิลิตร
ยูเรีย	42	กรัม

เติมน้ำปลอดประจุ จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

30% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

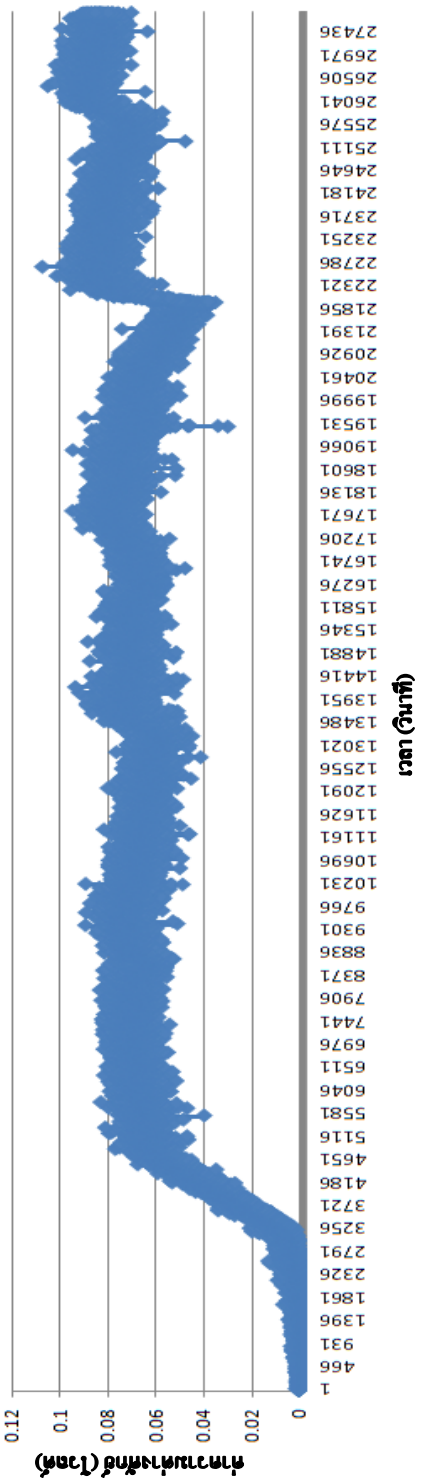
0% Denaturing solution	11.2	มิลลิลิตร
100% Denaturing solution	4.8	มิลลิลิตร

60% Denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

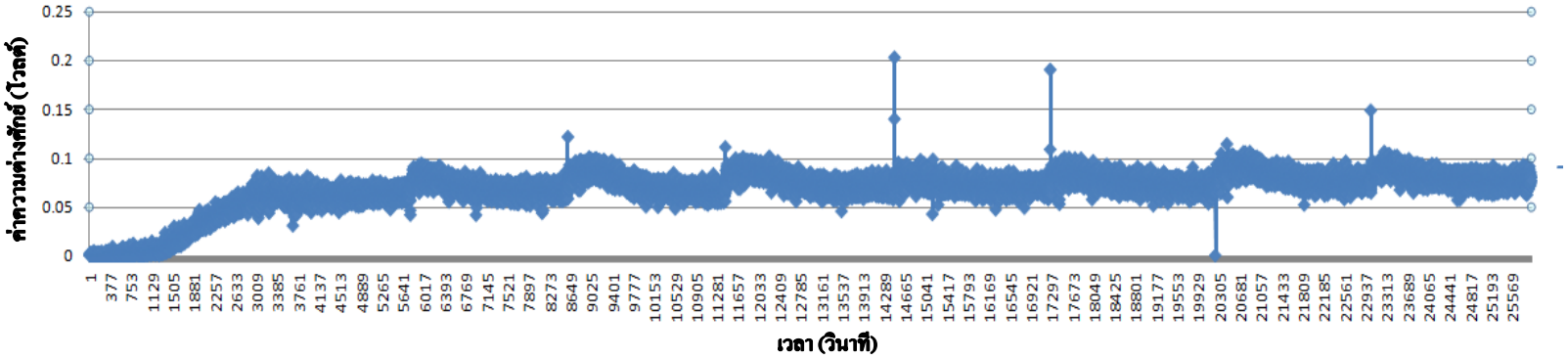
0% Denaturing solution	6.4	มิลลิลิตร
100% Denaturing solution	9.6	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

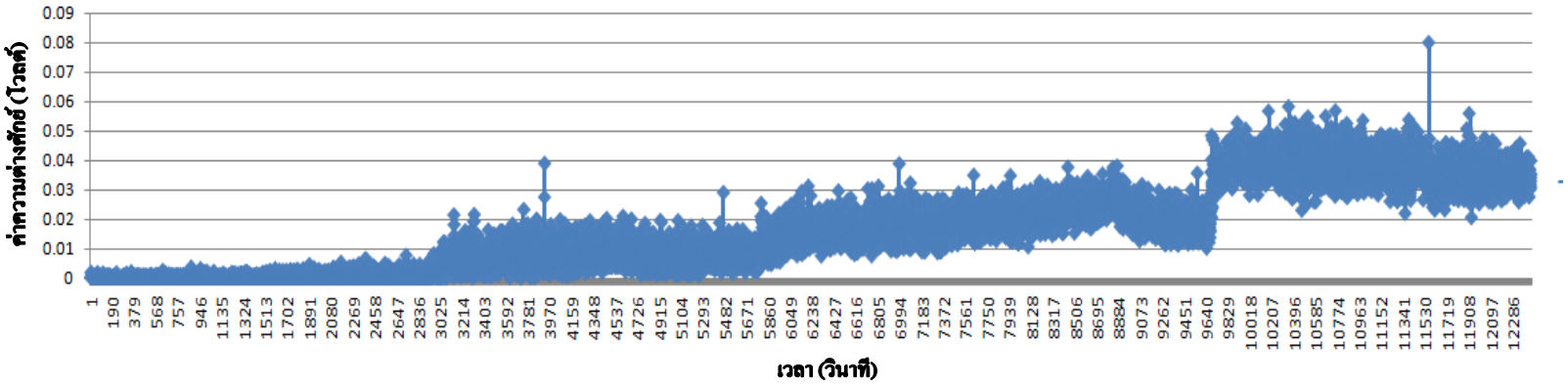
กราฟแสดงค่าความต่างศักย์เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์



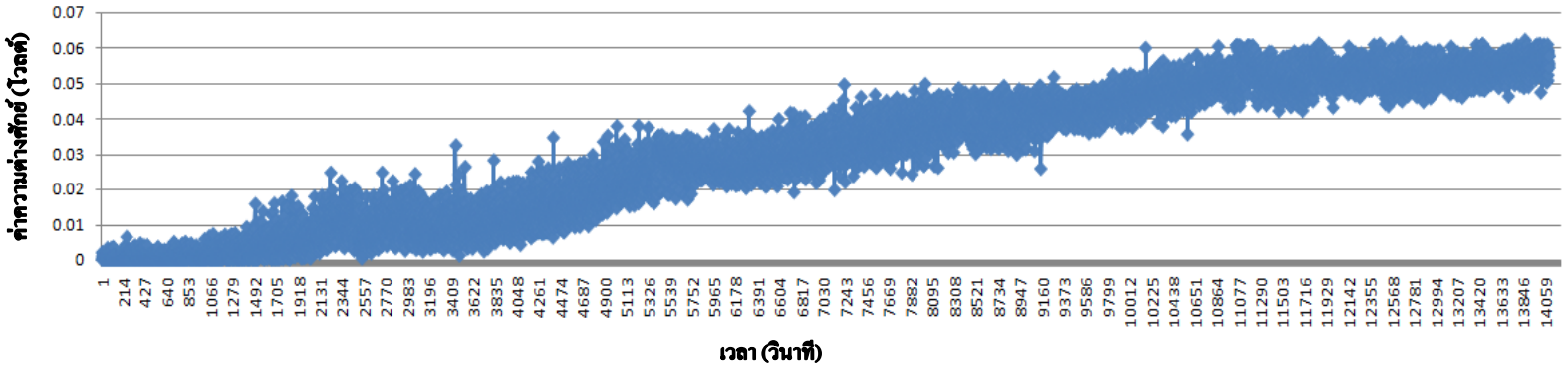
ภาพที่ ค.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความต่างศักย์กับเวลา เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง เดินระบบต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน เก็บค่าความต่างศักย์ทุก 15 วินาที



ภาพที่ ค.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความต่างศักย์กับเวลา เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง เดินระบบต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน เก็บค่าความต่างศักยืทุก 15 วินาที



ภาพที่ ค.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความต่างศักย์กับเวลา เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 12 ชั่วโมง เดินระบบต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน เก็บค่าความต่างศักยืทุก 15 วินาที



ภาพที่ ค.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความต่างศักย์กับเวลา เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง ใช้อาหารคือน้ำเสียสังเคราะห์จากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง เดินระบบต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน เก็บค่าความต่างศักยืทุก 15 วินาที

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์ต่างๆในเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์

ตารางที่ ง.1 ตารางแสดงค่าซีโอดี เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง

วันที่	ค่าซีโอดี			ค่าซีโอดีเฉลี่ย (มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	4032	4224	4224	4160	110.9
1	3072	2496	2496	2688	332.6
2	2304	2304	2304	2304	0.0
3	2304	2400	2400	2368	55.4
4	2304	2304	2496	2368	110.9
5	2496	2496	2688	2560	110.9
6	2304	2304	2304	2304	0.0
7	2304	2304	2496	2368	110.9
8	2304	2304	2496	2368	110.9
9	2496	2160	2304	2320	168.6

ตารางที่ ง.2 ตารางแสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย ที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 36 ชั่วโมง

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย			ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย (กรัม)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	1.33	1.4	1.35	1.36	0.036
1	0.13	0.22	0.37	0.24	0.121
2	0.41	0.4	0.57	0.46	0.095
3	0.3	0.28	0.26	0.28	0.020
4	0.45	0.46	0.41	0.44	0.026
5	0.62	0.61	0.57	0.6	0.026
6	0.65	0.68	0.68	0.67	0.017
7	0.69	0.66	0.66	0.67	0.017
8	0.52	0.6	0.56	0.56	0.040
9	0.65	0.61	0.6	0.62	0.026

ตารางที่ ง.3 ตารางแสดงค่าซีโอดี เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง

วันที่	ค่าซีโอดี			ค่าซีโอดีเฉลี่ย (มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	4032	4128	4224	4128.00	96.00
1	2598.4	2505.6	2598.4	2567.47	53.58
2	2496	2304	2304	2368.00	110.85
3	2496	2688	2688	2624.00	110.85
4	2400	2592	2400	2464.00	110.85
5	2496	2496	2496	2496.00	0.00
6	2496	2496	2688	2560.00	110.85
7	2412.8	2598.4	2598.4	2536.53	107.16
8	2505.6	2320	2505.6	2443.73	107.16
9	2320	2320	2505.6	2381.87	107.16

ตารางที่ ง.4 ตารางแสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์ 24 ชั่วโมง

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย			ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย (กรัม)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	1.38	1.79	1.63	1.60	0.207
1	0.85	0.79	0.82	0.82	0.030
2	0.35	0.37	0.36	0.36	0.010
3	1.02	0.98	1.35	1.12	0.203
4	0.72	0.71	0.67	0.70	0.026
5	0.18	0.21	0.21	0.20	0.017
6	0.29	0.3	0.25	0.28	0.026
7	0.3	0.22	0.2	0.24	0.053
8	0.3	0.31	0.35	0.32	0.026
9	0.19	0.18	0.18	0.18	0.006

ตารางที่ ง.5 ตารางแสดงค่าซีโอดี เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 12 ชั่วโมง

วันที่	ค่าซีโอดี			ค่าซีโอดีเฉลี่ย (มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	4083.2	4268.8	4268.8	4206.93	107.16
1	3552	3552	3552	3552.00	0.00
2	2880	2880	2976	2912.00	55.43
3	2691.2	2691.2	2691.2	2691.20	0.00
4	2784	2784	2784	2784.00	0.00
5	2505.6	2691.2	2691.2	2629.33	107.16
6	2598.4	2784	2784	2722.13	107.16
7	1948.8	2412.2	2784	2381.67	418.44
8	2412.8	2598.4	2784	2598.40	185.60
9	2598.4	2784	2598.4	2660.27	107.16

ตารางที่ ง.6 ตารางแสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย เมื่อแปรผันระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 12 ชั่วโมง

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย			ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย (กรัม)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	1.32	1.36	1.1	1.26	0.140
1	0.62	0.47	0.41	0.5	0.108
2	0.24	0.24	0.3	0.26	0.035
3	0.05	0.12	0.25	0.14	0.101
4	0.15	0.2	0.25	0.2	0.050
5	0.25	0.3	0.23	0.26	0.036
6	0.21	0.21	0.18	0.2	0.017
7	0.12	0.23	0.07	0.14	0.082
8	0.12	0.09	0.15	0.12	0.030
9	0.25	0.2	0.21	0.22	0.026

ตารางที่ ง.7 ตารางแสดงค่าซีโอดี เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง และเดินระบบที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง

วันที่	ค่าซีโอดี			ค่าซีโอดีเฉลี่ย (มิลลิกรัมซีโอดีต่อลิตร)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	3398	3398	3398	3398.00	0.00
1	2076	2076	2076	2076.00	0.00
2	1434	1523	1434	1463.67	51.38
3	1075	1075	1075	1075.00	0.00
4	896	896	896	896.00	0.00
5	848	848	848	848.00	0.00

ตารางที่ ง.8 ตารางแสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง และเดินระบบที่ระยะเวลากักพักทางชลศาสตร์เท่ากับ 24 ชั่วโมง

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย			ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งแขวนลอย (กรัม)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	1.27	1.3	1.35	1.31	0.040
1	0.72	0.7	0.69	0.70	0.015
2	0.33	0.34	0.37	0.35	0.021
3	0.27	0.29	0.3	0.29	0.015
4	0.21	0.22	0.22	0.22	0.006
5	0.15	0.15	0.15	0.15	0.000

ภาคผนวก จ

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A1 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|ABBV01002500.1|  Candidate division TM7 single-cell isolate TM7a TM7a_contig_4584,
whole genome shotgun sequence
Length=1303

                                                    Sort alignments for this subject sequence by:
                                                      E value  Score  Percent identity
                                                      Query start position  Subject start position
 Score =  170 bits (188),  Expect = 1e-39
 Identities = 177/229 (77%), Gaps = 6/229 (3%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AGCCTGACCAACATGGTGAAACCCCGTCCCTCATGAAAATACaaaaaaaaTTAGCCGGGC  60
            |||||| ||||||| ||||||||| ||| ||  | ||||||||||||   |||||| ||
Sbjct  383  AGCCTGGCCAACATAGTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAA---TTAGCCAGGT  439

Query  61   GTGGTGCCGTGGTCGCGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGGTGAGGCAGACGAATCGCTTGA  120
            |||||| | ||  |  ||| ||||||||||||  ||||| ||| ||||  |||| ||||||
Sbjct  440  GTGGTGGCATGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGACGCAGGAGAATTGCTTGA  499

Query  121  ACCCCGGAGGCAGAGGTTACAGTGAGGCGAgggggggCCACCGTACTCCAGCCTGGGTGA  180
            |||| |||||  |||||| |||| || ||||    |||||| | ||||||||||||||||
Sbjct  500  ACCCGGGAGGTGGAGGTTGCAGTAAGCCGAGATCAGGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGA  559

Query  181  -CAGAGTGAGAGTGGGTCTCAAAAACTCAAACTATAAATA--AAATAAA  226
             ||||| |||| |   ||||| ||| | ||   |||||||  |||||||
Sbjct  560  CCAGAGCGAGACTCCATCTCAGAAAATAAATAAATAAATAATAAATAAA  608
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A2 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|ABBV01001721.1|  Candidate division TM7 single-cell isolate TM7a TM7a_contig_2687,
whole genome shotgun sequence
Length=1455

                                                    Sort alignments for this subject sequence by:
                                                      E value  Score  Percent identity
                                                      Query start position  Subject start position
 Score =  134 bits (148),  Expect = 1e-28
 Identities = 151/192 (79%), Gaps = 10/192 (5%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AATTAGCCGGG-CGTGGTGGCGGG-GTCTCCTAATCCCCGCTAGTCAGGGGGCTGAGGCA  58
            ||||||| ||| |||||||||||| | || | | |||| |||| ||||| ||||||||||
Sbjct  26   AATTAGCTGGGGCGTGGTGGCGGGCGCCTGC-AGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCA  84

Query  59   GAAGAATGCGCTTGAACCCGGGAGGCAGAGGTTACAGTGAGGCAGGGGGTGCGCCACAGT  118
              |||||  ||||||||| ||||||  |||||| |||||| || | |    |||||| |
Sbjct  85   AGAGAAT-TGCTTGAACCTGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGA-GCCGAGATCACGCCACTGC  142

Query  119  AGTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACTCTGTTTCaaa--aactaaaactaa--aaataa  174
            | |||| | | |||||||||| |||||||||| |||||  || ||||| |||  ||||||
Sbjct  143  ACTCCAACGT-GGTGACAGAGCGAGACTCTGTCTCAAAATAAATAAAAGTAAATAAATAA  201

Query  175  aataaaTGGGCA  186
            |  |||||||||
Sbjct  202  ATAAAATGGGCA  213
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A3 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|AFAD01000009.1|  Escherichia coli 2.4168 ctg1126004750225, whole genome shotgun
sequence
Length=2707

 Score =  286 bits (316),  Expect = 2e-74
 Identities = 188/204 (92%), Gaps = 3/204 (1%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    CCTTTGAGGGAGCTGCTACTT-TCGCAGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA-TGA  58
            |||||||| |||||| |||   |||| |||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  948  CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA  889

Query  59   GCGAGGAAGAGGAAGAGCTCTCAATACGCAAACCGCCTCTCTCCGTGCGTTGGCCGATTC  118
            ||||||||| |||||||| | ||||||||||||||||||| ||| ||||||||||||||
Sbjct  888  GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTC  829

Query  119  ATTAATGCAGCTGGCAAGACAGGTTTCCCGAC-GGAAAGCGGGCAGTGAGCGCATCGCAA  177
            |||||||||||||||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct  828  ATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA  769

Query  178  TTAATGTGAGTTATCTCACTCATT  201
            |||||||||||| ||||||||||
Sbjct  768  TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT  745
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A4 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|ACME01000067.1| Bacillus cereus BDRD-Cer4 contig00040, whole genome shotgun sequence
Length=131236

 Score =  129 bits (142),  Expect = 2e-27
 Identities = 88/98 (90%), Gaps = 2/98 (2%)
 Strand=Plus/Minus

Query  3      CAGCTTTCGAAAACAGGAGCAGATACGGTAATGATCGGGGAGCAACAGTTTGGTTTACGT  62
              || ||| ||||| |||||||||||| |||||||||||||| |||||| ||||||||||||||
Sbjct  53894  CAACTTGCGAAAGCAGGAGCAGATGCGGTAATGATCGGTGAGCAAAAGTTTGGTTTACGT  53835

Query  63     TAAGCAGGAGAATTTTCACGTGAAGATGTACAAAACAA  100
              | ||||||||| ||||||||||||||||||  |||||||
Sbjct  53834  TTAGCAGGAGAGTTTTCACGTGAAGATGT--AAAACAA  53799
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A5 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|AEZH01000008.1| Mycobacterium bovis BCG str. ATCC 35743 BCG_tice_contig008, whole
genome shotgun sequence
Length=221643

 Score = 41.0 bits (44),  Expect = 1.2
 Identities = 86/116 (74%), Gaps = 12/116 (10%)
 Strand=Plus/Plus

Query  80      CCCGGGGATCAATG-GAAAGTCC--GGGTGCCACGACA-GATA-TAGTCCCCCTTTTCGC  134
               ||||||  || ||| | ||||||  || |||||||||  |||  |||||| ||  ||||
Sbjct  210307  CCCGGG--TCGATGTGGAAGTCCTTGGTTGCCACGACGTGATGGTAGTCCGCCGCTTCGG  210364

Query  135     ACAGGTC-TCAAAGA-GGCGCGC-CCAGCGCGGCGCCACATATT-CCGCTCAGCGA  186
                |||||  ||   || ||||||  ||||||||||||||||   || |||| ||||||
Sbjct  210365  CCAGGTAGTCGCTGATGGCGCGGGCCAGCGCGGCGCCACCGGTTACCGC-CAGCGA  210419
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A6 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|AELF01000080.1| Mycobacterium tuberculosis CDC1551A cont1.80, whole genome shotgun
sequence
Length=37892

 Score =  158 bits (174),  Expect = 6e-36
 Identities = 168/211 (80%), Gaps = 12/211 (6%)
 Strand=Plus/Plus

Query  4      ATGAAAGTCCCC-CCGGGAGTACTGCCGCCGCAATGCGGTGGCCACGACGAGGAATAATC  62
              ||| |||||| | |||||||||| || | ||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  31285  ATGGAAGTCCGCGCCGGGAGTACCGCTGACGCAATGCGGTGGCCACGACGAGGAATAGTC  31344

Query  63     CGCGGT-CCGGAGAAGTGGTCCCCCGGCTCGAT-AGGAAGT-CTCGGTTGCCCCGCC--G  117
              ||  || |||||||||||||| ||||| |||||  |||||| || ||||||| || |  |
Sbjct  31345  CGGTGTGCCGGAGAAGTGGTCACCCGGGTCGATGTGGAAGTCCTTGGTTGCCACGACGTG  31404

Query  118    CAGATAGTCCGCCGCTTTGCCCACGTA-TCTCTGA-GGCGC-GCCCAGAGCGGTGCCACA  174
                | |||||||||||| | ||| ||| || |||| ||||| | |||| |||| |||||
Sbjct  31405  ATGGTAGTCCGCCGCTTCGGCCAGGTAGTCGCTGATGGCGCGGGCCAGCGCGGCGCCACC  31464

Query  175    GATTCCCGACAGAGAGTCA---TCGTAGAAG  202
              | || ||| ||| ||| ||   ||| |||||
Sbjct  31465  GGTTACCGCCAGCGAGCCACCCTCGCAGAAG  31495
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A7 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|AEXR01000013.1| Eggerthella sp. HGA1 contig00029, whole genome shotgun sequence
Length=218686

 Features in this part of subject sequence:
   B3/4 domain protein

 Score =  104 bits (114),  Expect = 1e-19
 Identities = 75/87 (86%), Gaps = 0/87 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  71     GCAAAAGATGCCATGATTTGCTCTCCTTCGCCTTCACTGCTCCTTCTAGACCGCGCTTCG  130
              ||||| |||||||||||| |||||||||| |||| |||||||||||| ||||| |||
Sbjct  14356  GCAAACGATGCCATGATTCGCTCTCCTTCGTCTTCCCTGCTCCTTCTAGTCCGCGTTTCA  14297

Query  131    TTGTAAATGACGACGTGCGAGACAGCG  157
              |||||   |||||||||||| || ||
Sbjct  14296  TTGTACCCGACGACGTGCGAGGCATCG  14270
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A8 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|AFXH01000122.1|  Klebsiella pneumoniae 1191100241 Contig122, whole genome shotgun
sequence
Length=287

                                                    Sort alignments for this subject sequence by:
                                                      E value  Score  Percent identity
                                                      Query start position  Subject start position
 Score = 78.8 bits (86),  Expect = 5e-12
 Identities = 80/100 (80%), Gaps = 6/100 (6%)
 Strand=Plus/Minus

Query  124  GCTCCTACGGGAAGCAGCAGTGGGG-ATTTTACACAATGGGCTCAAGCCTGA-ACAGCC-  180
            |||||||||||| |||||||||||| || || |||||||||| |||||||||  |||||
Sbjct  256  GCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA  197

Query  181  --GCGGGTGGGGGTAAGAAGTCCTTCGCGAAGAAAAGCAC  218
               || ||| | | |||||| |||||| |  | |||||||
Sbjct  196  TGCCGCGTGTGTG-AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCAC  158


 Score = 46.4 bits (50),  Expect = 0.028
 Identities = 30/33 (91%), Gaps = 0/33 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  94   GCCCTGGGCCGTGTCGGCAGTTCCAGTGTCGCT  126
            || |||| |||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  255  GCTCTGGACCGTGTCGTCAGTTCCAGTGTCGCT  287
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A9 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|AFQK01000047.1|  Klebsiella pneumoniae JH1 contig00085, whole genome shotgun sequence
Length=1712

                                                    Sort alignments for this subject sequence by:
                                                      E value  Score  Percent identity
                                                      Query start position  Subject start position
 Score =  300 bits (332),  Expect = 2e-78
 Identities = 184/196 (94%), Gaps = 0/196 (0%)
 Strand=Plus/Plus


Query  1     TATTAGCGCGTCGGAGGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTACTTCTGCGGGTAACGTCAATCG  60
             |||||| |||| | |  ||||||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct  1033  TATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCG  1092

Query  61    CCAAGGGTATTAACCTCAACGCCTTCCTCCCCGCTCAAAGTACTTTTCAACCCGAAGGCC  120
             ||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||| |||||| |||| ||||||||||||||
Sbjct  1093  CCAAGGTTATTAACCTTAACGCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCC  1152

Query  121   TTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1153  TTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACT  1212

Query  181   GCTGCCTCCCGTAGGA  196
             ||||||||||||||||
Sbjct  1213  GCTGCCTCCCGTAGGA  1228
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A10 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>gb|ACEX01000461.1| Streptomyces himastatinicus ATCC 53653 cont1.461, whole genome
shotgun sequence
Length=36071

 Score =  241 bits (266),  Expect = 1e-60
 Identities = 170/193 (88%), Gaps = 1/193 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  162   CGTGCACGTCACCGAAAGGCTGCCCCAGCCCATTCTGCTGGAATCCGTCGACGTGTTCCT  221
             ||||||||||||||||  ||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  5539  CGTGCACGTCACCGAGCGGCTGCCGCAGCCCATCCTGCTGGAATCCGTCGACGTGTTCCT  5598

Query  222   CACCCACGGCGGTTTCAACAGCATCCGTTAGTCCCTGCGCGCCCCCTACCCGCTGGGGGT  281
             |||||||||||| |||||||||||||||| |||| |||||| || ||  ||||||||  ||
Sbjct  5599  CACCCACGGCGGCTTCAACAGCATCCGTGAGTCGCTGCGCACCGCCACCCCGCTGGCCGT  5658

Query  282   CCTGCCGCAGTTCGGCGACCAGAACGGCAACACGCGTCGGGTGGAGGAGAAGGGACTCGG  341
             ||||||||||||||||||||| ||| |||| |||| ||||||||||||  ||| |||||
Sbjct  5659  CCTGCCGCAGTTCGGCGACCAGCACGCCAACGCGCGCCGGGTGGAGGAGCTGGGCCTCGG  5718

Query  342   ACGCCCAGGTCAC  354
              || ||| |||||
Sbjct  5719  CCG-CCACGTCAC  5730
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A11 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>ref|NC_015949.1| Caldicellulosiruptor lactoaceticus 6A chromosome, complete genome
Length=2674809

 Features in this part of subject sequence:
   hypothetical protein

 Score = 96.9 bits (106),  Expect = 2e-17
 Identities = 76/90 (84%), Gaps = 1/90 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  64       GCATGAAAAGATAGTTTAGGTCATATTGACCATAACAATGGAAAGTTGTATAAGCTAGGT  123
                ||||  |||||||||||| ||| |||| ||| ||||||||||||  || |||||| |||||
Sbjct  1053178  GCATTCAAAGATAGTTTTGGTAATATAGACGATAACAATGGAACCTTTTATAAGATAGGT  1053237

Query  124      TTAAAATCAAAGGAGTGAGAAGTTAGCTTC  153
                 |||||||||||||| |||||||  ||||||
Sbjct  1053238  ATAAAATCAAAGGAATGAGAAG-AAGCTTC  1053266
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A12 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>qb|ACMU01000144.1|  Bacillus mycoides DSM 2048 contig00387, whole genome shotgun
sequence
Length=7739

 Score =  215 bits (238),  Expect = 3e-53
 Identities = 144/162 (89%), Gaps = 10/162 (6%)
 Strand=Plus/Plus

Query  34    CGCTTGGAAAAAGCTTATACAACAGTTCCTCAAATTCTTCAAAAAGGATGCTGGCTATCC  93
             ||||||||||||||| |||| ||          | ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2197  CGCTTGGAAAAAGCCTATAAAA----------AGTTCTTCAAAAAGGATGCTGGCTATCC  2246

Query  94    CAAAATGAAAAGTTTTAAAGAATCTCGTTCTATTACTCTCTCTCAATTTGGTATGTTCAA  153
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||
Sbjct  2247  AAAAATGAAAAGTTTTAAAGAATCTCGTTCTATTACTCTTACTCAATTTGGTATGTTCAA  2306

Query  154   ATATACAAAGAAGGATGGTTCGTTGGTAACAAGCCGTCGTGT  195
             ||||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  2307  ATATAAAAAGAAGGATGGTTCGTTGGGAACAAGCCGTCGTGT  2348
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ V3 region ของแถบดีเอ็นเอ A13 ที่ตัดได้จากการทำดีจีจีอี

```
>qb|AFTC01000040.1| D Acinetobacter baumannii ABNIH4 contig00042, whole genome shotgun
sequence
Length=260986

 Features in this part of subject sequence:
   phosphogluconate dehydratase

 Score =  132 bits (146),  Expect = 2e-28
 Identities = 90/101 (89%), Gaps = 0/101 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  39      CCAAAGAAGACCCGGCTAAAAGCAACTTCGTTTTCTGCCTGATTTTCTGGTTGAGCAAAA  98
               ||||| ||  | |||| |||| ||||||||||||||||||||| |||||||||||||| |
Sbjct  197592  CCAAATAATTCACGGCCAAAACCAACTTCGTTTTCTGCCTGATGTTCTGGTTGAGCAACA  197533

Query  99      CGACGTGCCTGCCAAGTCTGCTCACCTAACTCAATATCGAG  139
                |||||| |||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct  197532  GGACGTGACTGCCAAGTCTGCTCATCTAACTCAATATCGAG  197492
```

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล นางสาวกุลธิดา นิเวศอนันต์กุล

วัน/เดือน/ปีเกิด 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528

สถานที่เกิด โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพฯ

ที่อยู่ปัจจุบัน 36/6 หมู่ 2 ถนนพุทธมณฑล สาย 1 แขวงบางระมาด เขตตลิ่งชัน กรุงเทพฯ 10170

ประวัติการศึกษา - ระดับประถมศึกษา

โรงเรียนศิษย์วัฒนา กรุงเทพฯ พ.ศ. 2539

-ระดับมัธยมศึกษา

โรงเรียนโพธิสารพิทยากร กรุงเทพฯ พ.ศ. 2545

-ระดับปริญญาตรี

มหาวิทยาลัยมหิดลคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา พ.ศ. 2550

- ระดับปริญญาโท

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม พ.ศ. 2554