

การคัดแยกแบบคีย์เวิร์ดที่ผลิตเอกซโพลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของเอกซโพลิแซ็กคาไรด์เพื่อ  
ประยุกต์เป็นสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ

นางสาวนุชจรินทร์ วรรณนิตย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION  
OF EXOPOLYSACCHARIDE FOR APPLICATION AS BIOFLOCCULANT

Miss Nutchalin Wannanitaya



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial  
Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และ ลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อประยุกต์เป็น สารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ
โดย	นางสาวนุชจรินทร์ วรรณนิตย์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุธา ขาวเจียร

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุธา ขาวเจียร)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

นุชจรินทร์ วรรณนิตย์ : การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อประยุกต์เป็นสารก่อกำจัดกลุ่มทางชีวภาพ ( ISOLATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FOR APPLICATION AS BIOFLOCCULANT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. สุธา ขาวเอียร, 107 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำเสียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้จำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต มี 5 ไอโซเลตที่สามารถสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง คือ RV1, MK8, CG11, MK10, MK11 และ RV1 สามารถสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณสูงสุด คือ 4.65, 4.17, 3.11, 2.63 และ 2.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) ที่มีซูโครส 4% w/v ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน พบว่า MK8 คือ *Klebsiella* sp. ส่วน CG11, MK10, MK11 และ RV1 คือ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ TGH10 211, AATZP และ Mardeille-P215 ตามลำดับ จากการศึกษาลักษณะสมบัติสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการละลายได้ปานกลาง ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จากการวิเคราะห์โดย HPLC พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่หลากหลาย คือ กลูโคส กาแลคโทส ไซโลส ไรโบส แรมโนส และมอนอแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ ซึ่งจัดเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ มีชนิดประจุทั้งที่เป็นกลางและประจุลบ ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ ความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์, ความเข้มข้นของ  $\text{CaCl}_2$ , ค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ในสารละลายอนุภาคคอลลอยด์ที่มีความเข้มข้น 4 g/L พบว่ามีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มสูงสุด คือ ที่ความเข้มข้นพอลิแซ็กคาไรด์ 1 mg/L (88.80%) ตกตะกอนร่วมกับ  $\text{CaCl}_2$  ที่ความเข้มข้น 7.5 g/L (82.99%) ที่ pH 7 (83.77%) อุณหภูมิ 40°C (79.61%) และหลังจากหาสภาวะที่เหมาะสม ผลการทดสอบการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์กับน้ำเสียภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มตกตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากไอโซเลต MK8, MK11, MK10, RV1 และ CG11 มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 48.27-53.06% ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้เหล่านี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบำบัดน้ำเสีย

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5672250323 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: EXOPOLYSACCHARIDE , BIOFLOCCULANTS / FLOCCULATION

NUTCHALIN WANNANITAYA: ISOLATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FOR APPLICATION AS BIOFLOCCULANT. ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRAPORN THANİYAVARN, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHA KHAODHIAR, Ph.D., 107 pp.

In the present study, thirty EPS producing bacteria isolated from municipal and industrial wastewater samples were cultured on modified Bromfield agar medium consisting of 4% (w/v) sucrose. Five isolates were characterized as high exopolysaccharide producer under aerobic condition at 30°C, 24 hours, including, RV1 (4.65g/L), MK8 (4.17 g/L), CG11 (3.11 g/L), MK10 (2.63 g/L) and MK11 (2.28 g/L). Morphological and physiological studies revealed these five bacteria as Gram negative bacteria. Taxonomic studies and 16S rDNA analysis identified isolate MK8 as *Klebsiella* sp., CG11, MK10, MK11 and RV1 as *K. pneumoniae* strain TGH10, 211, AATTZP and Marseille-P215, respectively. Chemical analysis of polysaccharides obtained demonstrated their similarity of partly water soluble and insoluble in organic solvents. Results from acid hydrolysis followed by HPLC analysis showed that they consisted of glucose, galactose, xylose, ribose, ramnose and other sugars, thus, they are heteropolysaccharide with neutral and negative charges. The effects of exopolysaccharide and CaCl<sub>2</sub> concentrations, pH and temperature on the flocculation activity were evaluated. The maximum flocculation activity was observed at an optimum exopolysaccharide concentration of 1 mg/L (88.80%), CaCl<sub>2</sub> of 7.5 g/L (82.99%), pH 7(83.77%) with strong thermal stability of 40°C (79.61%). After optimization, the exopolysaccharide produced (MK8, MK11, MK10, RV1 and CG11) were applied in wastewater from Chulalongkorn University and found that flocculating activity (turbidity removal) increased to the range of 48.27- 53.06% , therefore, this exopolysaccharide could be a good candidate for city wastewater treatment.

Department: Microbiology

Student's Signature .....

Field of Study: Microbiology and Microbial  
Technology

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

Academic Year: 2015



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ .....	3
1.3.1 คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งน้ำเสีย .....	3
1.3.2 ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	3
1.3.3 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิกัดพิกัดของอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก .....	3
1.3.4 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ .....	3
1.3.5 ประยุกต์ใช้ทางสิ่งแวดล้อม .....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม .....	4
2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide).....	4
2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์.....	6
2.3 การจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์.....	6
2.3.1 จำแนกตามแหล่งการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์.....	6
2.3.2 จำแนกตามชนิดของมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ .....	7

2.3.2.1 ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide).....	7
2.3.2.1.1 เดกซ์แทรน .....	8
2.3.2.1.2 พูลูลูแลน .....	8
2.3.2.1.3 เคอร์ดีแลน .....	9
2.3.2.1.4 ลีแวน.....	9
2.3.2.1.5 สเคลอโรกลูแคน .....	10
2.3.2.2 เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide).....	11
2.3.2.2.1 แชนแทน .....	11
2.3.2.2.2 อัลจินต.....	11
2.3.2.2.3 เจลแลน.....	12
2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรม .....	13
2.5 การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์เป็นสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพในการบำบัดน้ำเสีย .....	18
2.5.1 กระบวนการสร้างแกนและการรวมตะกอน (Coagulation and Flocculation).....	18
2.5.2 ปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อการเร่งการตกตะกอน.....	24
2.5.2.1 ความเข้มข้นของสารเร่งการก่อการจับกลุ่ม .....	24
2.5.2.2 ความเข้มข้นของไอออนโลหะ .....	25
2.5.2.3 ค่าความเป็นกรดต่าง .....	25
2.5.2.4 อุณหภูมิ .....	26
2.6 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ .....	26
ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	26
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง.....	28
3.1 อุปกรณ์.....	28



3.2 เคมีภัณฑ์.....	30
3.3 วิธีการทดลอง.....	32
3.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากน้ำเสีย .....	32
3.3.1.1 แหล่งเก็บตัวอย่างน้ำเสีย .....	32
3.3.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ .....	32
3.3.2 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้และคัดเลือก แบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในได้ปริมาณสูง .....	32
3.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ .....	32
3.3.2.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์.....	33
3.3.2.3 การสกัดแยกและการทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ในปริมาณสูง.....	33
3.3.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในงานวิจัย.....	33
3.3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น .....	33
3.3.3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว .....	34
3.3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิกสุน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของ แบคทีเรียที่คัดเลือกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA).....	34
3.3.4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา .....	34
3.3.4.2 การพิกสุน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยการ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) .....	34
3.3.5 การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์.....	35
3.3.5.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อศึกษาชนิดองค์ประกอบของ พอลิแซ็กคาไรด์.....	35
3.3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์ .....	35

3.3.5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid .....	35
3.3.5.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding.....	36
3.3.5.2.3 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test) .....	36
3.3.5.2.4 การวิเคราะห์หาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์.....	36
3.3.5.2.5 การทดสอบความสามารถในการตกตะกอน (flocculation).....	37
3.3.6 การประยุกต์ใช้ทางสิ่งแวดล้อม.....	38
3.3.6.1 การศึกษาประสิทธิภาพการจับกลุ่มของอนุภาคคอลลอยด์ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สภาวะต่างๆ .....	38
3.3.6.1.1 ความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต่างกัน .....	38
3.3.6.1.2 ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ต่างกัน .....	38
3.3.6.1.3 ค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน .....	39
3.3.6.1.4 อุณหภูมิที่ต่างกัน .....	39
3.3.6.2 การประยุกต์ใช้บำบัดตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งน้ำจริง .....	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	41
4.1 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ตัดแยกจากตัวอย่างน้ำเสีย ...	41
4.2 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก .....	42
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่คัดเลือก.....	44
4.4 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ .....	45
4.4.1 องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ .....	45
4.4.2 ปริมาณน้ำตาลและโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์ .....	48
4.4.2.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid .	48
4.4.2.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Protein Dry Binding ...	48

4.4.4 ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์.....	50
4.4.5 ความสามารถในการเร่งการจับกลุ่ม (flocculation).....	51
4.4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) .....	52
4.5 การประยุกต์ใช้ในการเร่งการจับกลุ่ม .....	53
4.5.1 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สภาวะต่าง ๆ .....	53
4.5.1.1 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต่างกัน .....	53
4.5.1.2 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ต่างกัน .....	56
4.5.1.3 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน .....	58
4.5.1.4 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่อุณหภูมิที่ต่างกัน .....	60
4.5.2 การประยุกต์ใช้ในการบำบัดตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งน้ำจริง.....	62
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	65
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	65
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	70
รายการอ้างอิง .....	72
ภาคผนวก.....	81
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	82
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	84
ภาคผนวก ค โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมอนอแซ็กคาไรด์โดยวิธี HPLC.....	85
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน .....	87
ภาคผนวก จ ข้อมูล.....	88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	107

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	ตารางจำแนกประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์ตามแหล่งสังเคราะห์และหน้าที่.....	7
ตารางที่ 2.2	การจำแนกชนิดพอลิแซ็กคาไรด์ตามลักษณะชนิดประจุไฟฟ้า.....	13
ตารางที่ 2.3	ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ แหล่งที่มา องค์ประกอบ คุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม.....	16
ตารางที่ 2.4	กลไกกระบวนการสร้างแกนตะกอนและการรวมตะกอน.....	21
ตารางที่ 2.5	การจำแนกประเภทและตัวอย่างของสารก่อการจับกลุ่ม.....	23
ตารางที่ 4.1	จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียแหล่งต่างๆ .....	41
ตารางที่ 4.2	ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย 5 ไอโซเลตที่เลือก.....	44
ตารางที่ 4.3	ชนิดมอโนแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต โดยการวิเคราะห์จากโครมาโทแกรมจาก HPLC .....	47
ตารางที่ 4.4	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือก 5 ไอโซเลต .....	48
ตารางที่ 4.5	ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างๆของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต .....	49
ตารางที่ 4.6	ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต.....	50
ตารางที่ 4.7	ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต .....	51
ตารางที่ 4.8	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลของ Genbank.....	52

**ตารางที่ 4.9** ประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลตที่สภาวะความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่างกัน..... 54

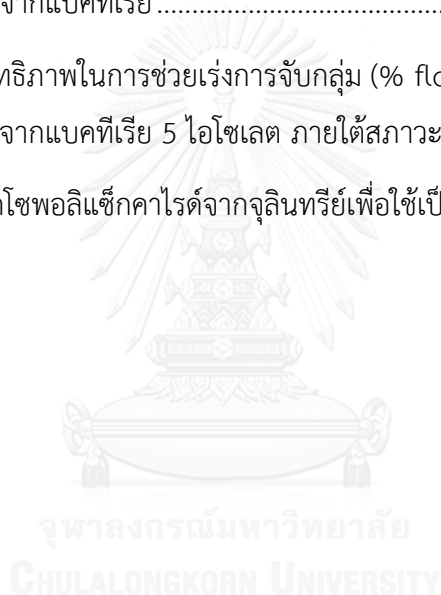
**ตารางที่ 4.10** ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย..... 57

**ตารางที่ 4.11** ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย..... 59

**ตารางที่ 4.12** ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย..... 61

**ตารางที่ 4.13** ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ..... 63

**ตารางที่ 5.1** การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นสารช่วยเร่งการจับกลุ่ม ..... 70



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 2 ชนิด .....	4
รูปที่ 2.2 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากสิ่งมีชีวิต .....	5
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเดกซ์แทรน .....	8
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของพุลลูแลน.....	9
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเคอร์ดีแลน.....	9
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของลีแวน.....	10
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของสเคลอโรกลูแคน .....	10
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของแซนแทน .....	11
รูปที่ 2.9 โครงสร้างของอัลจีเนต.....	12
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของเจลแลน.....	12
รูปที่ 2.11 ไดอะแกรมแสดงความสัมพันธ์ การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในด้านต่างๆ ตาม คุณลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์.....	14
รูปที่ 2.12 โมเดล Electrical Double Layer Theory.....	19
รูปที่ 3.1 (ก) สารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ (ข) สารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและแคลเซียม 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.....	37
รูปที่ 4.1 กราฟเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จากแบคทีเรียทั้งหมด 30 ไอโซเลต ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่มี 4% ซูโครส ภายหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง .....	42
รูปที่ 4.2 ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นเมือกเฝิมบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ที่มี 4%ซูโครส ภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) ไอโซเลต MK10 และ (ข) ไอโซเลต RV1.....	43
รูปที่ 4.3 ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต (ก) CG11 (ข) MK10 และ (ค) RV1.....	43

**รูปที่ 4.4** โครมาโทแกรมแสดงดังนี้ (ก-จ) คือ ชนิดมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของ  
 แבקทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต CG11, MK8, MK10, MK11 และ RV1 ตามลำดับ..... 46

**รูปที่ 4.5** ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดในแหล่งน้ำเสียภายใน  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทางการค้า อะลูมิเนียมซัลเฟต และเฟอร์  
 ริกคลอไรด์ ..... 63

**รูปที่ 4.6** ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดในแหล่งน้ำเสียภายใน  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทางการค้า อะลูมิเนียมซัลเฟต และเฟอร์  
 ริกคลอไรด์ ..... 64



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ประวัติความเป็นมา

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมมากขึ้น เนื่องจากกำลังประสบปัญหาภาวะการปนเปื้อนของสิ่งเจือปนต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัญหาส่วนใหญ่เกิดจากอิทธิพลของมนุษย์ ทั้งการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรและการขยายขนาดของโรงงานอุตสาหกรรมทำให้เกิดมลภาวะต่าง ๆ คือ มลภาวะทางน้ำ (water pollution) เป็นการพบสิ่งเจือปนที่อยู่ในน้ำทั้งในรูปแบบของของแข็ง สารแขวนลอย และสารละลาย โดยมีแหล่งกำเนิดมาจากแหล่งชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม หรือเกษตรกรรม ซึ่งเป็นน้ำเสียถูกปลดปล่อยระบายลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ เช่น น้ำเสียจากชีวิตประจำวันของมนุษย์ น้ำทิ้งปนเปื้อนจากโรงงานอุตสาหกรรม และน้ำที่ถูกชะล้างของผิวหน้าดินบริเวณแหล่งเพาะปลูกที่มีการสะสมของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชหรือปุ๋ยเคมี เป็นต้น ตะกอนขนาดเล็กหรืออนุภาคคอลลอยด์ในน้ำเสียเหล่านี้สามารถนำมาบำบัดได้โดยการใช้พอลิเมอร์เป็นตัวช่วยเร่งการจับกลุ่มให้เกิดการตกตะกอนในระยะเวลาอันสั้น พอลิเมอร์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปนั้น เป็นสารสังเคราะห์ที่ได้จากกระบวนการทางเคมี ซึ่งย่อยสลายได้ยาก เกิดสารตกค้างที่มีความเป็นพิษสูง บางชนิดก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อโรคอันตรายต่าง ๆ เช่น alum (aluminium sulfate) หรือสารส้ม พบการเกิดสารตกค้างของอะคริลามิเนียม ซึ่งเป็นพิษต่อระบบประสาทและก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Banks และคณะ, 2006; Campbell, 2002; Polizzi และคณะ, 2002) อะคริลาไมด์ (acrylamide) เป็นพอลิเมอร์ที่นิยมใช้กันแพร่หลายในการตกตะกอน ซึ่งเป็นพิษต่อระบบประสาทและมีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (human carcinogenic) (Ruden, 2004; Shih และคณะ, 2001) เป็นต้น จากข้อจำกัดนี้ การผลิตสารเร่งการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาจากธรรมชาติจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญทดแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์จากสารเคมี เพื่อลดมลภาวะที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อมนุษย์และระบบนิเวศ

พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีหน่วยย่อยของมอนอแซ็กคาไรด์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก สามารถแบ่งพอลิแซ็กคาไรด์ตามจำนวนชนิดของหน่วยที่ซ้ำกันในโมเลกุลได้เป็น 2 ประเภท คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยหน่วยซ้ำกันของมอนอแซ็กคาไรด์เพียงหนึ่งชนิดเท่านั้นมาเชื่อมต่อกัน และเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่ประกอบด้วยหน่วยซ้ำกันของมอนอแซ็กคาไรด์ต่างชนิดกันมาเชื่อมต่อกัน ไบโอพอลิเมอร์สามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช สัตว์ สาหร่ายและจุลินทรีย์ เป็นต้น (Venugopal, 2011) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์มีข้อดีกว่าสิ่งมีชีวิต



ชนิดอื่น เนื่องจากสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ง่าย ได้ผลผลิตปริมาณสูง ใช้ระยะเวลาสั้นกว่าการผลิตในสิ่งมีชีวิตอื่น นอกจากนี้ยังง่ายต่อการควบคุมภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยไม่ขึ้นต่อสภาวะดินฟ้าอากาศหรือฤดูกาล ขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์สามารถทำได้ง่าย (Khan และคณะ, 2007) พอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้ทั้งจากแบคทีเรีย รา และยีสต์ เช่น อัลจินेटที่ผลิตจาก *Azotobacter* sp. แซนแทนที่ผลิตจาก *Xanthomonas* sp. เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *Leuconostoc* sp. และเจแลนที่ผลิตจาก *Sphingomonas* sp. เป็นต้น (Clementi, 1997; Palaniraj และ Jayaraman, 2011; Wang และคณะ, 2006; Yang และคณะ, 2015) โดยพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้จะถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ในลักษณะของเมือกหรือแคปซูลซึ่งติดอยู่ภายนอกเซลล์เรียกว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide หรือ EPS) และเนื่องจากพอลิเมอร์ที่ได้จากจุลินทรีย์เหล่านี้มีความปลอดภัยสูง ไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลายได้ง่าย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันจึงนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมปิโตรเลียม และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น

สารช่วยเร่งการจับกลุ่ม (flocculating agent) เป็นสารที่ช่วยเร่งการจับกลุ่มของอนุภาคคอลลอยด์ขนาดเล็กที่ไม่สามารถตกตะกอนได้เองให้สามารถแยกตัวออกจากน้ำแล้วตกตะกอนลงได้ โดยทั่วไปสารช่วยเร่งการจับกลุ่มแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ สารช่วยเร่งการจับกลุ่มชนิดอนินทรีย์ (inorganic flocculant) เช่น อะลูมิเนียมซัลเฟต เฟอร์ริกคลอไรด์ หรือพอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ สารช่วยเร่งการจับกลุ่มชนิดอินทรีย์ (organic synthetic flocculant) เช่น อนุพันธ์ของพอลิอะคริลาไมด์ หรือพอลิเอทิลีนเอมีน และสารช่วยเร่งการจับกลุ่มที่ได้จากธรรมชาติ (natural flocculant หรือ bioflocculant) เช่น โซเดียมอัลจินेट ไคโตซาน และพอลิเมอร์ต่างๆที่ได้จากจุลินทรีย์ (extracellular biopolymer flocculant) เป็นต้น (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001; Shih และคณะ, 2001) จากข้อดีและสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์นั้น จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสีย โดยการนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาเป็นสารช่วยเร่งการจับกลุ่มทดแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ได้จากกระบวนการเคมี ซึ่งโมเลกุลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จะเป็นตัวช่วยจับอนุภาคคอลลอยด์ต่างๆให้รวมกลุ่มกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ และสามารถตกตะกอนแยกออกจากน้ำได้ Tenney และVerhoff (1973) พบว่าการสะสมของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สะสมอยู่ภายนอกเซลล์มีความสัมพันธ์กันกับการรวมกลุ่มของเซลล์ หลังจากนั้นก็มีอีกหลายงานวิจัยที่พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเป็นสารช่วยเร่งการจับกลุ่มที่ปลอดภัย ย่อยสลายได้ง่าย ไม่เป็นพิษหรือเป็นอันตรายต่อระบบนิเวศ ตัวอย่างงานวิจัยที่รายงานการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ คือ Li และคณะ (2010) ได้รายงานการแยก *Agrobacterium* sp. M-503 จากระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่า

สามารถสังเคราะห์สารช่วยเร่งการจับกลุ่มทางชีวภาพได้สูงสุด 14.9 กรัมต่อลิตร Wang และคณะ (2011) ได้รายงานการแยก *Bacillus thuringiensis* 27 จากดินทรายในทะเลทรายของประเทศจีน ซึ่งมีความสามารถในการเร่งการจับกลุ่มได้สูง 80.4% Patil และคณะ (2011) ได้รายงานว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์จาก *Azotobacter indicus* ATCC 9540 ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มสูง 92% และ Zhao และคณะ (2013) พบว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (MBF-5) ที่สังเคราะห์ได้จาก *K. pneumoniae* มีประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มตกตะกอนสูงถึง 98% เป็นต้น

## 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งน้ำเสีย และศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารช่วยเร่งการจับกลุ่มทางชีวภาพและสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียของพอลิแซ็กคาไรด์

## 1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

- 1.3.1 คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งน้ำเสีย
- 1.3.2 ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้
- 1.3.3 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิกัดพิกัดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก
- 1.3.4 ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์
- 1.3.5 ประยุกต์ใช้ทางสิ่งแวดล้อม

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

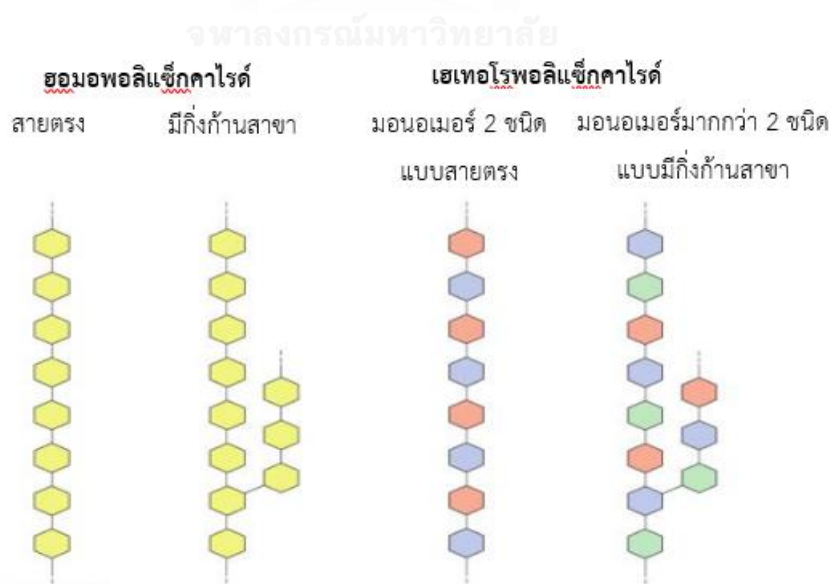
ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และทราบลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และนำมาประยุกต์ใช้ในการเร่งการจับกลุ่มเพื่อกำจัดสารแขวนลอยของแข็งออกจากของเหลว

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

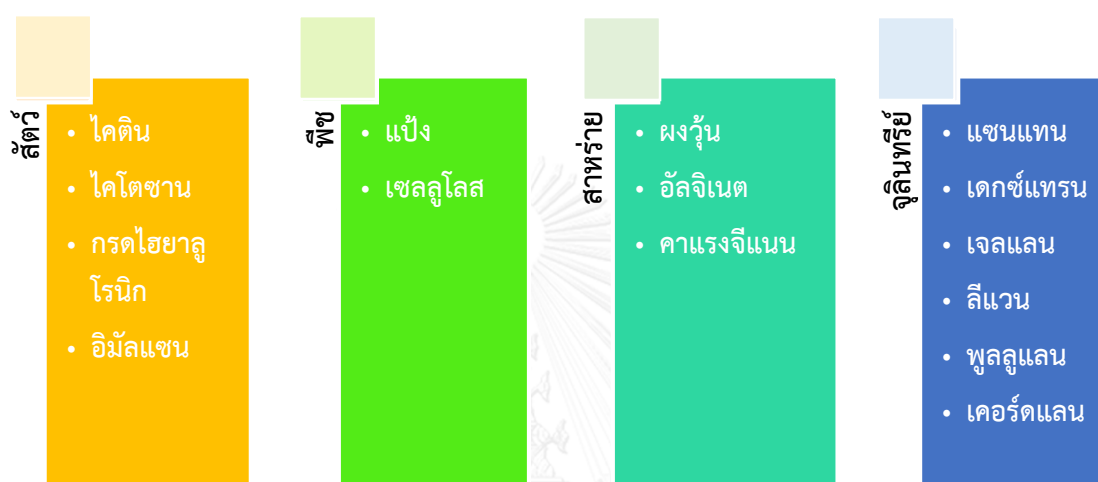
#### 2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวนหลายๆตัวของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือมอนอแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) และอนุพันธ์ของมอนอแซ็กคาไรด์มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง และมีรูปร่างทั้งแบบเป็นสายโซ่ตรง (linear) และแบบสายโซ่ที่มีกิ่งก้านสาขาแตกแยกออกมา (branched) หากวิเคราะห์ตามชนิดของมอนอแซ็กคาไรด์ พอลิแซ็กคาไรด์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ 1) ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของมอนอแซ็กคาไรด์เพียงหนึ่งชนิดมาเชื่อมต่อกัน 2) เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของมอนอแซ็กคาไรด์มากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไปมาเชื่อมต่อกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ เช่น กลูโคส (glucose) กาแลคโทส (galactose) ฟรุคโทส (fructose) แรมโนส (ramnose) แมนโนส (manmose) ไชโลส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) กรดกลูคิวโรนิก (glucuronuc acid) กรดกลูโรนิก (guluronic acid) และกรดแมนนูโรนิก (mannuronic acid) เป็นต้น (More และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 2 ชนิด  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Nelson และCox (2013)

ไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer) หรือพอลิแซ็กคาไรด์สังเคราะห์ได้จากเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ สาหร่าย และจุลินทรีย์ เป็นต้น (Venugopal, 2011) แสดงตัวอย่างดังในรูปที่ 2.2 โดยพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่มีบทบาทหน้าที่ทั้งที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างเซลล์ เช่น เซลลูโลส และไคติน หรือทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารและพลังงานสำรอง เช่น แป้ง และไกลโคเจน เป็นต้น (Wu และคณะ, 2016)



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากสิ่งมีชีวิต

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Cui (2005)  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์

สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำพวกจุลินทรีย์ เช่น สาหร่าย รา หรือแบคทีเรีย สามารถพบได้ทั้งในตะกอนดินหรือในแหล่งน้ำต่าง ๆ เช่น น้ำจืด น้ำทะเล น้ำพุร้อน น้ำบริเวณขั้วโลก หรือแม้แต่ในน้ำเสีย การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์มีข้อดีกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น คือ จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ พอลิแซ็กคาไรด์ได้ง่ายกว่า ได้ผลผลิตปริมาณสูง ใช้ระยะเวลารวดเร็วกว่าการสังเคราะห์ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น นอกจากนี้ยังง่ายต่อการควบคุมสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ โดยไม่ขึ้นต่อสภาพดินฟ้าอากาศและฤดูกาล กระบวนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ทำได้ง่าย (Khan และคณะ, 2007) การผลิตพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจทดแทนการผลิตจากแหล่งอื่น ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ในระดับโรงงานอุตสาหกรรมอยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น แซนแทน (*Xanthomonas* sp.) (Palaniraj และ Jayaraman, 2011) เดกซ์แทรน (*Leuconostoc* sp.) (Yang และคณะ, 2015) อัลจินेट (*Azotobacter* sp.) (Pena และคณะ, 2008) เจลแลน (*Sphingomonas* sp.) (Wang และคณะ, 2006) เป็นต้น

## 2.3 การจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์

### 2.3.1 จำแนกตามแหล่งการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถแบ่งได้ตามแหล่งการสังเคราะห์ของเซลล์ได้เป็น 3 ประเภท (Andhare และคณะ, 2014) ได้แก่ 1) พอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างภายในเซลล์ (intracellular polysaccharide) 2) พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้าง (structural polysaccharide) และ 3) พอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างภายนอกเซลล์ (exopolysaccharide, EPS) โดยในแต่ละประเภทรูปแบบนั้น จะทำหน้าที่แตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2.1 นอกจากนี้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกหลั่งปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์และมาสะสมอยู่ที่ผิวหน้าของเซลล์นั้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ 1) แคปซูล (capsule) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ยังคงเกาะสะสมติดอยู่ที่ผิวหน้าเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ 2) เมือก (slime) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นเมือกเหนียวที่เกาะกันอย่างหลวมๆภายนอกเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ในการปกป้องตัวเซลล์จากสิ่งรบกวนหรืออันตรายจากสภาพแวดล้อมต่าง ๆ โดยรอบเซลล์ เช่น การบุกรุกของโปรโตซัว การซึมผ่านของยาปฏิชีวนะหรือสารพิษและโลหะหนักต่าง ๆ เป็นต้น (Kumar และคณะ, 2007) นอกจากนี้เมื่อเซลล์ประสบปัญหาสภาวะความเครียดรุนแรง ทั้งอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ออสโมติก หรือการขาดแคลนสารอาหาร เซลล์ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรองได้จากเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

ตารางที่ 2.1 ตารางจำแนกประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์ตามแหล่งสังเคราะห์และหน้าที่

พอลิแซ็กคาไรด์	หน้าที่
1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างภายในเซลล์ (intracellular polysaccharide)	เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สะสมภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้กับเซลล์
2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้าง (structural polysaccharide)	เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของผนังเซลล์ เช่น ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide)
3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างภายนอกเซลล์ (exopolysaccharide, EPS)	เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งและปล่อยออกมาที่ด้านนอกของเซลล์เพื่อปกป้องตัวเซลล์จากสิ่งอันตรายรอบนอกเซลล์ และเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำรองให้เซลล์เมื่อประสบกับสภาวะแวดล้อมความเครียดรุนแรง

ที่มา : (Andhare และคณะ, 2014; Kumar และคณะ, 2007)

### 2.3.2 จำแนกตามชนิดของมोनอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ

ปัจจุบันมีพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นโดยจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีลักษณะโครงสร้างหรือคุณสมบัติที่แตกต่างกันมากขึ้น โดยสามารถแบ่งประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์ได้ตามชนิดของมोनอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท (More และคณะ, 2014) ดังนี้

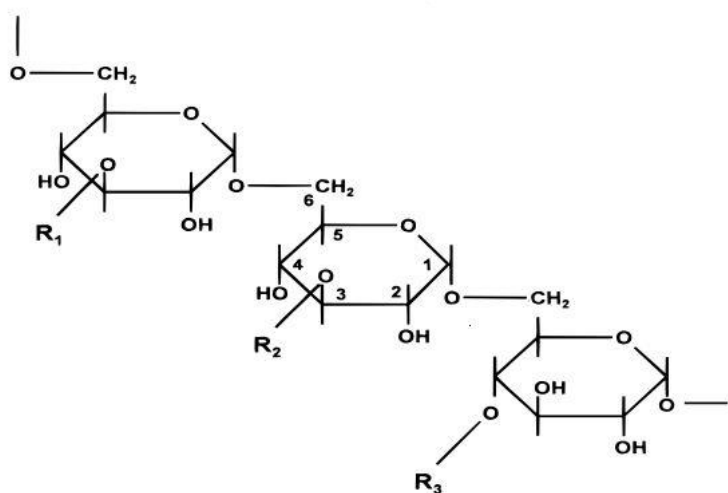
#### 2.3.2.1 ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide)

ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยมोनอแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อซ้ำ ๆ กัน (repeating unit) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Czaczyk และ Myszk, 2007) คือ 1) แอลฟา-ดี-กลูแคน ( $\alpha$ -D-glucan) 2) เบต้า-ดี-กลูแคน ( $\beta$ -D-glucan) และ 3) ฟรุคแทน (fructan) ตัวอย่างเช่น

เดกซ์แทรน (dextran) พูลลูแลน (pullulan) เคอร์ดีแลน (curdlan) ลีแวน (levan) สเคลอโรกลูแคน (scleroglucan) เป็นต้น

### 2.3.2.1.1 เดกซ์แทรน

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp. โดยประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,2  $\alpha$ -1,3  $\alpha$ -1,4  $\alpha$ -1,6 (More และคณะ, 2014) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.3

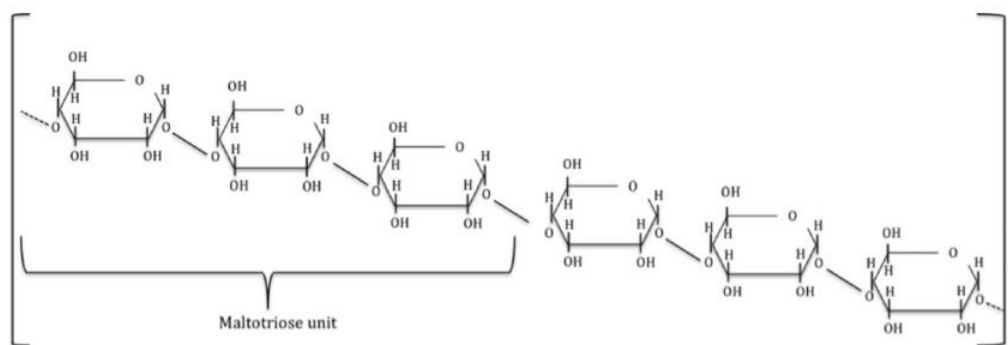


รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเดกซ์แทรน

ที่มา : Ioan และคณะ (2000)

### 2.3.2.1.2 พูลลูแลน

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลมอลโตไตรโอส (maltotriose) มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 (Khan และคณะ, 2007) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.4

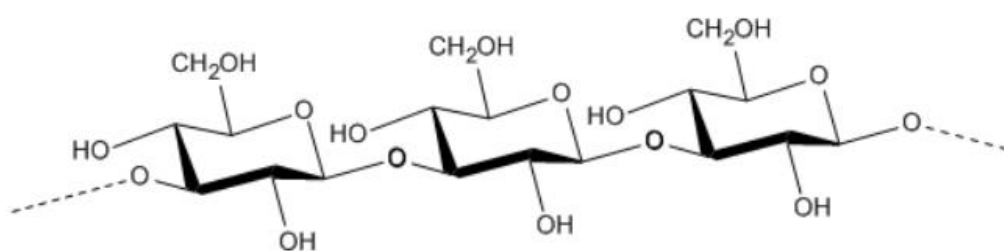


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของพุลลูแลน

ที่มา : Donot และคณะ (2012)

#### 2.3.2.1.3 เคอร์ติแลน

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถผลิตได้จาก *Alcaligenes faecalis* และ *Agrobacterium* sp. โดยมีโครงสร้างเป็นลักษณะเส้นตรง ไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,3 <More และคณะ, 2014> โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเคอร์ติแลน

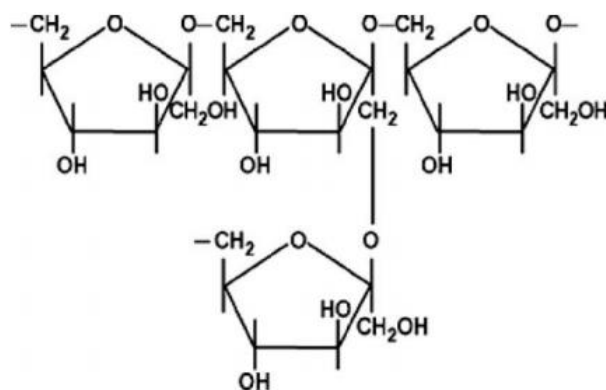
ที่มา : Vu และคณะ (2009)

#### 2.3.2.1.4 ลีแวน

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถผลิตได้จาก *Zymomonas mobilis* หรือ *Bacillus polymyxa* โดยมีโครงสร้างแบบแตกกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลฟรุกโตสมาเชื่อมต่อ



กันด้วยพันธะ  $\beta$ -2,6 (Abou-taleb และคณะ, 2015; Silbir และคณะ, 2014) โครงสร้างดังแสดงดังรูปที่ 2.6

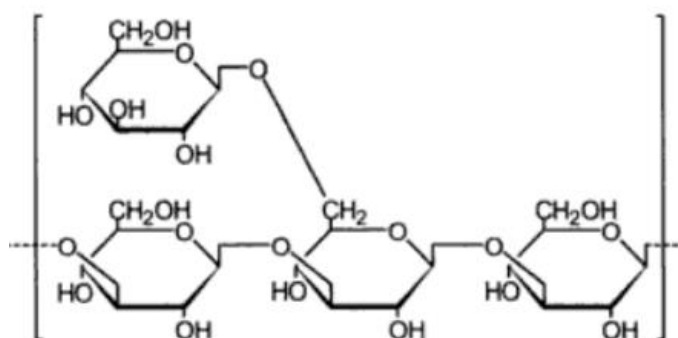


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของลิแวน

ที่มา : Manandhar และคณะ (2009)

#### 2.3.2.1.5 สเคลอโรกลูแคน

หรือเรียกอีกอย่างว่า ชิโซไฟแลน (schizophyllan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Sclerotium gluconicum* มีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านประกอบด้วย  $\beta$ -D-กลูโคไพราโนซิล ( $\beta$ -D-glucopyranosyl) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,3 เป็นสายหลักและพันธะ  $\beta$ -1,6 เป็นสายย่อย ดังแสดงในรูป 2.7 (Bluhm และคณะ, 1982; Rizk และคณะ, 1994; Smidsrod และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของสเคลอโรกลูแคน

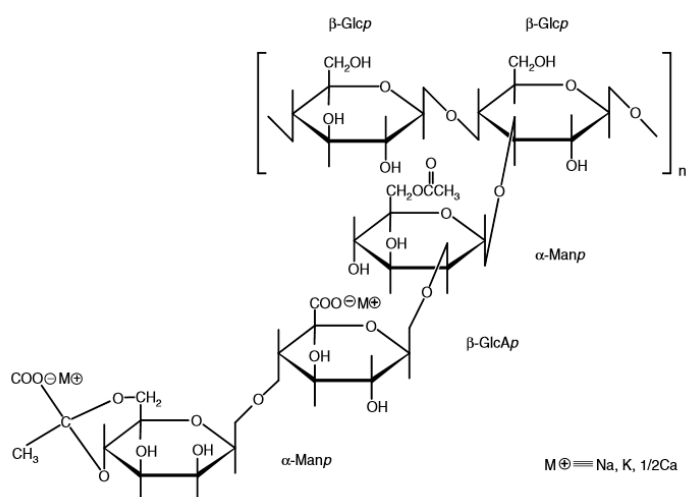
ที่มา : Smidsrod และคณะ (2008)

### 2.3.2.2 เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide)

เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์มากกว่า 2 ชนิดขึ้นไปมาเชื่อมต่อกัน ตัวอย่างเช่น แซนแทน (Xanthan) อัลจิเนต (Alginate) เจลแลน (Gellan) กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) เป็นต้น

#### 2.3.2.2.1 แซนแทน

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สามารถผลิตได้จากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* โครงสร้างประกอบด้วยกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 เป็นสายหลัก และมีสายย่อยประกอบด้วยหน่วยย่อยของ แมนโนส 2 หน่วย และกรดกลูโคโรนิก (Kumar และคณะ, 2007; Rehm, 2009) ดังแสดงในรูปที่ 2.8

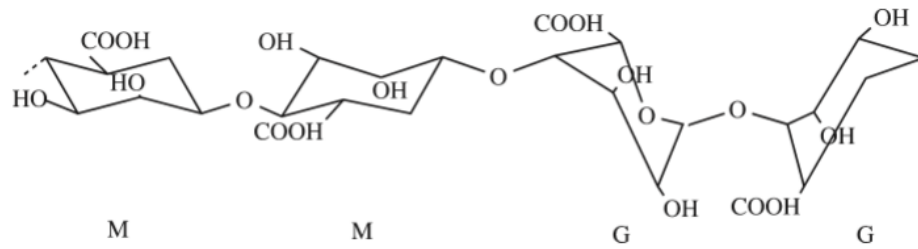


รูปที่ 2.8 โครงสร้างของแซนแทน

ที่มา : Cui (2005)

#### 2.3.2.2.2 อัลจิเนต

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Laminaria sp.*, *Macrocystis sp.*, *Lessonia sp.* และในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Azotobacter vinelandii* โดยมีโครงสร้างเป็นแบบเส้นตรง ประกอบด้วย กรดแมนนูโรนิก ( $\beta$ -D-mannuronic acid) และ กรดกลูโคโรนิก ( $\alpha$ -L-guluronic acid) ดังแสดงในรูปที่ 2.9 (Cui, 2005; Kumbar และคณะ, 2014)

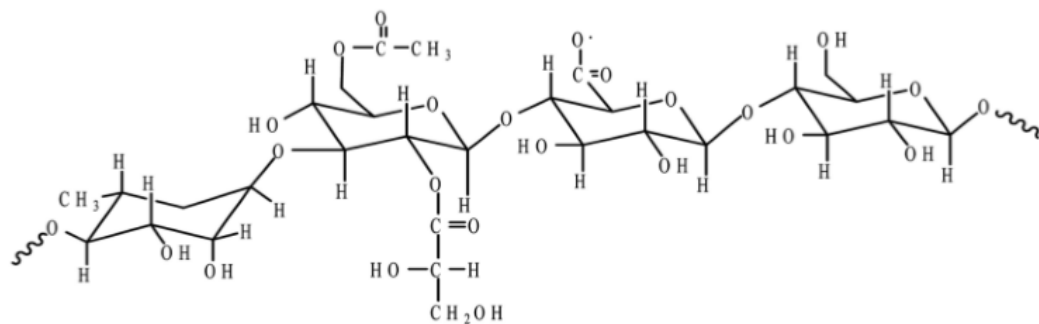


รูปที่ 2.9 โครงสร้างของอัลจิเนต

ที่มา : Kumbar และคณะ (2014)

### 2.3.2.2.3 เจลแลน

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas elodea* โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ซ้ำ ๆ กันของ เตตระแซ็กคาไรด์ และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ (1-3)- $\beta$ -กลูโคส, (1-4)- $\beta$ -L-แรมโนส, (1-4)- $\beta$ -D-กลูคิวโรนิก แอซิด และ (1-4)- $\beta$ -L-กลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 2.10 (Cui, 2005; Noda และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของเจลแลน

ที่มา : Khan และคณะ (2007)

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ได้ตามลักษณะชนิดประจุไฟฟ้าของอนุภาคพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.2

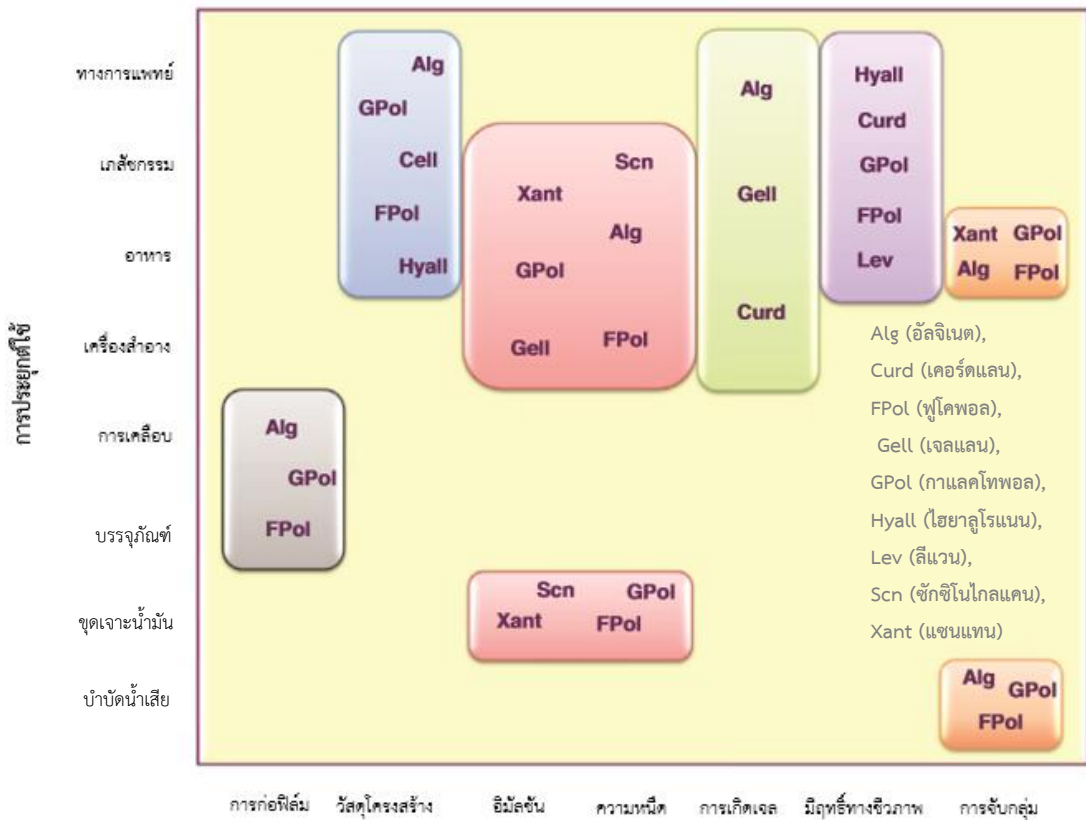
## ตารางที่ 2.2 การจำแนกชนิดพอลิแซ็กคาไรด์ตามลักษณะชนิดประจุไฟฟ้า

ชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์	ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์
1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นลบ (anionic polysaccharide)	เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกรดน้ำตาล (sugar acid) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของมอนอแซ็กคาไรด์ โมเลกุล ตัวอย่าง : แชนแทน และ อัลจิเนต
2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide)	เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย มอนอแซ็กคาไรด์เท่านั้น ตัวอย่าง : พูลูลูแลน เดกซ์แทรน เซลลูโลส และทีแวน
3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะประจุเป็นบวก (cationic polysaccharide)	เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกรดอะมิโนหรือ หมู่ $\text{NH}_3$ เชื่อมต่ออยู่ ตัวอย่าง : ไคโตซาน

ที่มา : (Cui, 2005)

## 2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรม

ปัจจุบันมีการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์กันอย่างกว้างขวาง และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์สามารถสังเคราะห์ได้จากหลากหลายแหล่ง ทั้ง พืช สาหร่าย และจุลินทรีย์ มีทางเลือกในการผลิตทางอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ ทั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หรือสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตได้ง่ายกว่า ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต้องการผลิตให้คงที่ โดยมีคุณลักษณะสมบัติที่หลากหลายของพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายแบบ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา อุตสาหกรรมปิโตรเลียม การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรือแม้แต่ในทางสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ไดอะแกรมแสดงความสัมพันธ์ การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในด้านต่างๆ

ตามคุณลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

ที่มา : Freitas และคณะ (2011)

ในแต่ละอุตสาหกรรม มีการนำคุณสมบัติหลากหลายแบบมาใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาปรับปรุงผลิตภัณฑ์ได้แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของตัวพอลิแซ็กคาไรด์ในแต่ละชนิดด้วย เช่น พอลิแซ็กคาไรด์พวกที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรคอลลอยด์หรือประเภทที่ชอบน้ำ (hydrocolloid) เมื่อละลายน้ำจะมีลักษณะที่ข้นหนืดและเหนียว (thickening agent) จึงนิยมนำไปใช้เป็นส่วนผสมของอาหารหลายชนิดเพื่อเพิ่มความหนืดในอาหาร หรือนำไปใช้เพิ่มเนื้อสัมผัสในตัวเครื่องสำอาง เช่น พวกซอสหรือซูปต่าง ๆ ครีมหรือโลชั่น เป็นต้น พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติการเป็นอิมัลชันและมีความเสถียรที่ดี (emulsifier, stabilizing agent) จะถูกนำมาใช้เพิ่มความคงตัวในส่วนผสมของอาหารด้วยเช่นกัน เช่น น้ำสลัด มายองเนส ไอศกรีม เป็นต้น คุณสมบัติประเภทการก่อเจล (gel-forming) การเกิดฟิล์ม (flim-forming) มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) หรือมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต (biocompatible) จะถูกนำมาใช้

ประโยชน์ในทางการแพทย์หรือทางเภสัชกรรม เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตวัสดุเทียมทดแทน (biomaterial) เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น ความคงตัว และสามารถเข้ากันได้กับมนุษย์ เช่น กระดูกหรือผิวหนังเทียม หรือใช้ผลิตเป็นวัสดุอุปกรณ์ เช่น แผ่นปิดแผลที่มีฤทธิ์ในการสมานแผลได้ เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมของแคปซูลยาต่าง ๆ ได้ เป็นต้น นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีบทบาทสำคัญในทางสิ่งแวดล้อมด้วย เช่น การนำคุณสมบัติการกักเก็บน้ำมาใช้ในการตกตะกอนในการบำบัดน้ำเสีย หรือคุณสมบัติในการดูดซับจับโลหะหนักที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ หรือสมบัติของของไหล มาใช้ในการเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม เป็นต้น (Freitas และคณะ, 2011)

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ แสดงดังในตารางที่ 2.3



**ตารางที่ 2.3** ตัวอย่างของพอลิแซ็กคาไรด์ แหล่งที่มา องค์ประกอบ คุณลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

ที่มา : Freitas และคณะ (2011)

พอลิแซ็กคาไรด์	องค์ประกอบ	แหล่งที่มา	ลักษณะคุณสมบัติ	การประยุกต์
แซนแทน	กลูโคส		เป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ	อุตสาหกรรมอาหาร
	แมนโนส	<i>Xanthanomonas</i> spp	มีความหนืดสูง และมีความเสถียรในช่วง pH และอุณหภูมิที่กว้าง	อุตสาหกรรมปิโตรเคมี
	กรดกลูคูโรนิก		ไม่มีประจุ เป็นสารคงตัว สมบัติเป็นของไหลแบบนิวโตเนียน (Newtonian fluid)	อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา อุตสาหกรรมเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทางเภสัช เช่น อุปกรณ์ขยายหลอดเลือด
เดกซ์แทรน	กลูโคส	<i>Leuconostoc</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.		อุตสาหกรรมอาหาร
	กรดกลูคูโรนิก	<i>Pseudomonas</i> spp.	เป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ	อุตสาหกรรมอาหาร
อัลจินต	กรดแมนนูโรคนิก	<i>Azotobacter</i> spp.	มีสมบัติก่อกอเจลได้	อุตสาหกรรมยา เช่น แผ่นปิดแผลสมานแผล
			มีสมบัติเกิดฟิล์มได้	อุตสาหกรรมอาหาร (เส้นใยอาหาร)
เซลูโลส		Alphaproteobacter	มีโครงสร้างเป็นผลึก	วัสดุทางการแพทย์ เช่น แผ่นสมานแผล
		Betaproteobacteria	มีความแข็งแรงสูง และไม่ละลายในน้ำ	หลอดเลือดเทียม
	กลูโคส	Gammaproteobacteria Gram-positive bacteria <i>Acetobacter</i> spp.	ตัวทำละลายส่วนใหญ่	

พอลิแซ็กคาไรด์	องค์ประกอบ	แหล่งที่มา	ลักษณะคุณสมบัติ	การประยุกต์
เคอร์ติแลน	กลูโคส	<i>Agrobacterium</i> spp.	มีสมบัติก่อเจลได้	อุตสาหกรรมอาหาร
		<i>Rhizobium</i> spp.	ไม่ละลายน้ำ	อุตสาหกรรมทางเภสัช
		<i>Cellulomonas</i> spp.	มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	ใช้การกำจัดโลหะหนัก
เจลแลน	กลูโคส		เป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ	อุตสาหกรรมอาหารและยา
	แรมโนส	<i>Sphingomonas</i> spp.	มีความเสถียรในช่วง pH ที่กว้าง	อุตสาหกรรมอาหารสัตว์
	กรดกลูคิวโรนิก อะซีเตต ไกลโคเลต		มีสมบัติก่อเจลได้	ใช้ในงานวิจัย เช่น ผงวุ้นและเจล
ไฮยาโลโรแนน	กรดคิวโรนิก	<i>Streptococcus</i> spp.	มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	ใช้ในทางการแพทย์
		<i>Pasteurella multocida</i>	ละลายน้ำได้ดี	
			เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต	
ดีแวน	ฟรุกโทส	<i>Alcaligenes viscosus</i>	มีความหนืดต่ำ ละลายน้ำได้ดี ก่อเจลได้	อุตสาหกรรมอาหาร
		<i>Zymomonas mobilis</i>	มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านการ	อุตสาหกรรมอาหารสัตว์
		<i>Bacillus subtilis</i>	อัปเดต้านเมร่ง	อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา



## 2.5 การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์เป็นสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพในการบำบัดน้ำเสีย

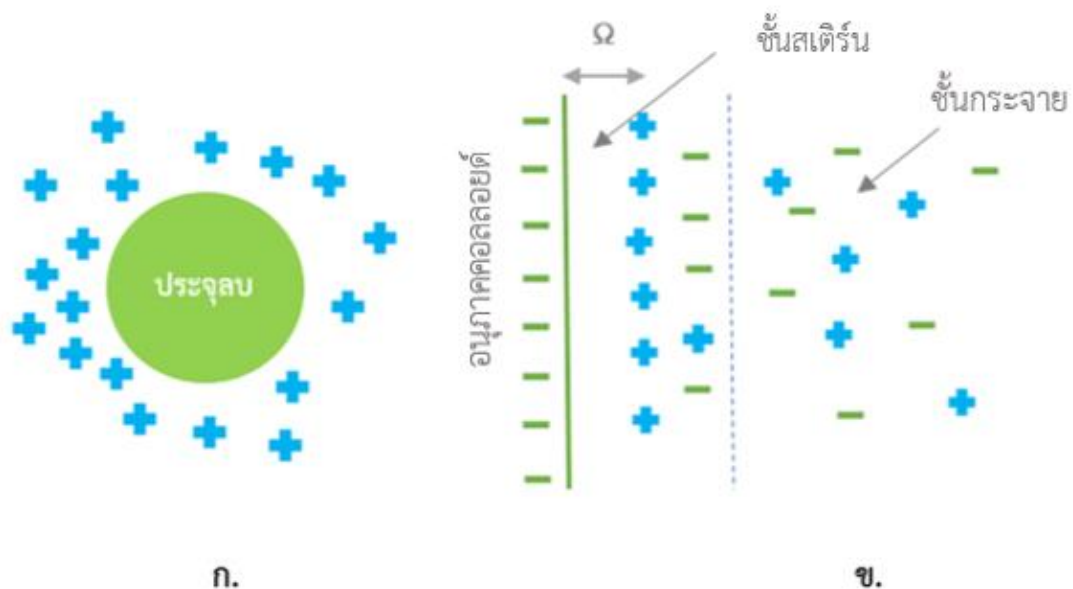
ปัจจุบันโลกกำลังประสบปัญหาภาวะเสื่อมโทรมของทรัพยากรธรรมชาติเพิ่มขึ้น มลภาวะทางน้ำ เป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเพิ่มความเสี่ยงต่อผู้อุปโภคบริโภค เนื่องมาจากการใช้น้ำในกิจกรรมประจำวันของมนุษย์และถูกปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ หรือเกิดจากการปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยปราศจากการบำบัดน้ำเสีย หรือเกิดจากการชะล้างหน้าดินทางการเกษตรที่มีการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชหรือยาฆ่าแมลงลงสู่แหล่งน้ำ เป็นต้น จากกระบวนการต่าง ๆ ของมนุษย์เหล่านี้ ทำให้แหล่งน้ำในธรรมชาติถูกเจือปนด้วยสิ่งสกปรกในรูปแบบต่าง ๆ มากมาย เช่น ของแข็ง สารประกอบโลหะหนัก เชื้อโรค และอนุภาคสารแขวนลอยหรือคอลลอยด์ขนาดเล็ก เป็นต้น

ในการบำบัดน้ำเสียนั้น จะใช้พอลิเมอร์เป็นสารช่วยเร่งการจับกลุ่มเพื่อตกตะกอนอนุภาคคอลลอยด์ขนาดเล็กที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ อนุภาคของคอลลอยด์นี้จะไปเพิ่มความขุ่นของน้ำมากขึ้นเนื่องจากจะไปบดบังลำแสงทำให้เกิดการกระเจิงของแสงได้ ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำที่ต้องใช้เป็นแหล่งพลังงานจากการสังเคราะห์แสง เช่น พืช สาหร่าย เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลต่อความรู้สึกของผู้อุปโภคบริโภคด้วย ความขุ่นของน้ำทำให้เกิดความรู้สึกว่ามีการปนเปื้อนของสิ่งอื่นอยู่ รู้สึกไม่ปลอดภัย ไม่ถูกสุขลักษณะอนามัย อาจมีสิ่งเจือปนที่เป็นสารอันตรายอยู่ก็เป็นได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องการกำจัดคอลลอยด์เหล่านี้ออกจากแหล่งน้ำ ซึ่งวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ คือ การเร่งการจับกลุ่มเพื่อชักนำให้เกิดการตกตะกอน

### 2.5.1 กระบวนการสร้างแกนและการรวมตะกอน (Coagulation and Flocculation)

อนุภาคคอลลอยด์ (colloidal particle) คือ อนุภาคขนาดเล็กขนาดตั้งแต่ 1 นาโนเมตรถึง 1 ไมโครเมตร ที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวและไม่สามารถตกตะกอนได้เองในเวลาจำกัด (Liss และคณะ, 2005) อนุภาคคอลลอยด์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ ประเภทที่ชอบน้ำ (lyophilic colloid) เช่น โพรตีน สารประเภท detergent เช่น สบู่ เป็นต้น ส่วนประเภทที่ไม่ชอบน้ำ (lyophobic colloid) เช่น อนุภาคของดิน เป็นต้น นอกจากนี้อนุภาคคอลลอยด์ยังมีคุณสมบัติทางไฟฟ้า มีทั้งที่เป็นประจุบวกหรือลบ แต่ในทางสิ่งแวดล้อมมักพบอนุภาคเป็นลบหรืออนุภาคประเภทที่ไม่ชอบน้ำเป็นส่วนใหญ่ อนุภาคคอลลอยด์เมื่ออยู่ในน้ำจะมีประจุของตัวเอง และเมื่ออนุภาคที่มีประจุชนิดเดียวกันอยู่ใกล้กัน ทำให้เกิดแรงผลักกันระหว่างอนุภาคซึ่งมากกว่าแรงดูดระหว่างอนุภาค ทำให้อนุภาคคอลลอยด์มีเสถียรภาพสูงมีค่าศักย์ไฟฟ้าสูงและสามารถแขวนลอยในน้ำได้เป็นเวลานาน (Verwey และ Overbeek, 1948; มั่นสิน ตันจุลเวศม์, 2542)

ตามทฤษฎีคุณสมบัติทางไฟฟ้าของอนุภาคคอลลอยด์ (Electric Double Layer Theory) คือประจุลบของอนุภาคคอลลอยด์สามารถดึงดูดประจุตรงกันข้ามให้เข้าใกล้ผิวของอนุภาคได้ โดยประจุตรงกันข้ามจะมีความหนาแน่นที่สุดที่บริเวณใกล้พื้นผิวอนุภาค ดังแสดงในรูป 2.12 (ก) และลดลงตามระยะห่างจากผิวของอนุภาค ส่วนค่าศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคจะสูงสุดที่ผิวของอนุภาคและลดลงจนกลายเป็นศูนย์เมื่อไม่มีศักย์ไฟฟ้าอยู่ในตำแหน่งนั้นเลย และตามทฤษฎี double layer มีช่องว่างระหว่างผิวอนุภาคกับจุดศูนย์กลางของประจุตรงกันข้ามที่อยู่ใกล้สุดที่เรียกว่า โห้หม โดยมีส่วนชั้นบาง ๆ ขวางกันอยู่ เรียกชั้นบางด้านในนี้ว่า ชั้นสเตอร์น (stern layer) และในช่วงด้านนอกของชั้นสเตอร์นไปจนถึงตำแหน่งที่ไม่มีศักย์ไฟฟ้า เรียกว่า ชั้นกระจาย (diffuse layer) ดังแสดงในรูป 2.12 (ข) ค่าศักย์ไฟฟ้าที่สามารถวัดได้เรียกว่า ซีตาโพเทนเชียล (Zetapotential,  $Z_p$ ) เมื่ออนุภาคคอลลอยด์มีแรงผลักรหว่างอนุภาคสูง แสดงว่ามีความเสถียรภาพสูง มีศักย์ไฟฟ้าสูง อนุภาคคอลลอยด์จะแขวนลอยไม่ตกตะกอน แต่ในทางกลับกัน หากแรงผลักรหว่างอนุภาคต่ำ ความเสถียรต่ำ มีศักย์ไฟฟ้าต่ำ จะทำให้อนุภาคคอลลอยด์สามารถเคลื่อนตัวเข้าใกล้กัน และรวมตัวกันเป็นฟล็อกขนาดใหญ่ นำไปสู่การตกตะกอนได้ง่ายขึ้น (มันสิน ตันฑุลเวศม์, 2542)



รูปที่ 2.12 โมเดล Electrical Double Layer Theory

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก มันสิน ตันฑุลเวศม์ (2542)

โดยปกติอนุภาคคอลลอยด์มีความหนาแน่นสูงกว่าน้ำ ทำให้สามารถตกตะกอนได้เองโดยแรงโน้มถ่วงหรือแรงดึงดูดของโลกแต่ต้องใช้ระยะเวลาเวลานาน (Brostow และคณะ, 2009) ดังนั้นในการกำจัดอนุภาคคอลลอยด์ในของเหลวในระยะเวลาอันสั้นนั้น ยังสามารถกำจัดได้โดยใช้วิธีการทำลายเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์ (destabilization) โดยการเติมสารเคมีที่มีประจุตรงกันข้ามกับคอลลอยด์หรือประจุเป็นบวกลงในน้ำ ทำให้เกิดการสะเทินกันของประจุ ทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคคอลลอยด์ลดลง หรือทำให้ค่าความเป็นประจุของอนุภาคคอลลอยด์เป็นกลาง ส่งผลให้แรงผลักระหว่างอนุภาคลดลง อนุภาคเคลื่อนตัวใกล้ชิดกันมากขึ้น เกิดการรวมกลุ่มกันอย่างหลวมๆ เป็นแกนตะกอนขนาดใหญ่ขึ้นได้ เรียกตะกอนที่เกิดขึ้นว่า ฟล็อก (floc) และเรียกสารเคมีที่เติมลงไปนั้นว่า สารโคแอกกูแลนต์ (coagulant) กระบวนการสร้างแกนตะกอนที่เกิดขึ้นนี้คือ โคแอกกูเลชัน (coagulation) ซึ่งมีกลไกทำลายเสถียรภาพ 4 แบบ คือ การลดความหนาของชั้นกระจาย (diffuse layer) การดูดติดและทำลายประจุไฟฟ้าของอนุภาค (adsorption and charge neutralization) การใช้ผลึกอินทรีย์เพิ่มน้ำหนักและขนาดอนุภาค (sweep coagulation) และ การใช้พอลิเมอร์เป็นสะพานเชื่อม (polymer bridging) ดังแสดงในตาราง 2.5

ภายหลังจากขั้นตอนการทำลายเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ กระบวนการเกิดฟล็อกกูเลชัน (flocculation) ซึ่งเป็นการทำให้อนุภาคคอลลอยด์สามารถเคลื่อนที่มาสัมผัสกันและจับเกาะติดรวมกลุ่มกันเป็นฟล็อกและชักนำให้เกิดการตกตะกอนขึ้น (Moss และ Dymond, 1978) โดยใช้สารที่มีมวลโมเลกุลสูงหรือมีขนาดใหญ่มาสร้างสะพานเชื่อมจับกับอนุภาคคอลลอยด์หลายๆอนุภาคให้มีน้ำหนักมากขึ้น เรียกสารนี้ว่า สารก่อการจับกลุ่ม (flocculants) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ 1) สารก่อการจับกลุ่มชนิดอนินทรีย์ (inorganic flocculant) 2) สารก่อการจับกลุ่มชนิดอินทรีย์ (organic flocculant) ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ แบบไม่มีประจุ (non-ionic) แบบมีประจุเป็นบวก (cationic) และแบบมีประจุเป็นลบ (anionic) และ 3) สารก่อการจับกลุ่มที่ได้จากธรรมชาติ (natural flocculant, bioflocculant) ตัวอย่างแสดงดังในตาราง 2.5 (Brostow และคณะ, 2009; Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001; Shih และคณะ, 2001; Takagi และ Kadowaki, 1985; Toeda และ Kurane, 1991) และในการเกิดกระบวนการฟล็อกกูเลชันอย่างสมบูรณ์นั้น จะต้องมีการสร้างสัมผัสหรือการกระทบกันของอนุภาคคอลลอยด์ต่างๆ มีหลายวิธีคือ 1) การสร้างสัมผัสแบบออร์โธไคเนติก (Orthokinetic Flocculation) 2) การสร้างสัมผัสแบบเพอริไคเนติก (Perikinetic Flocculation) 3) การสร้างสัมผัสจากการตกตะกอน (Sedimentation) 4) การสร้างสัมผัสโดยการกรองสัมผัส (Contact Filtration) และ 5) การสร้างสัมผัสโดยใช้ฟล็อกเป็นเป้าสัมผัส ดังแสดงในตาราง 2.4

ตารางที่ 2.4 กลไกกระบวนการสร้างแกนตะกอนและการรวมตะกอน

ขั้นตอนการตกตะกอน	กลไก
<b>1. การสร้างแกนตะกอน (coagulation)</b> มีกลไก 4 แบบ ดังนี้	เป็นขั้นตอนการทำลายเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์
1.1 การลดความหนาของชั้นกระจาย (diffuse Layer)	เป็นการเพิ่มประจุตรงกันข้ามกับคอลลอยด์ลงไปในพื้นที่กระจายของผิวอนุภาคมากขึ้น เพื่อให้ค่าศักย์ไฟฟ้าของผิวนอกสุดลดลง
1.2 การดูดติดและทำลายประจุไฟฟ้าของอนุภาคคอลลอยด์ (adsorption and charge neutralization)	เป็นการใส่สารเคมีที่มีประจุตรงกันข้ามกับคอลลอยด์และดูดติดกับผิวอนุภาค ทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าของคอลลอยด์ลดลง
1.3 การใช้ผลึกอินทรีย์เพิ่มน้ำหนักและขนาดอนุภาคคอลลอยด์ (sweep coagulation)	เป็นการเติมสารประกอบของเกลือโลหะบางชนิดปริมาณมากเกินไปให้เกิดการสร้างผลึกและคอลลอยด์สามารถมาจับเกาะได้
1.4 การใช้สารพอลิเมอร์เป็นสะพานเชื่อม (polymer bridging)	เป็นการใส่พอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ลงในน้ำ ทำให้เกิดการแตกตัวของอไอออนของพอลิเมอร์จำนวนมากและมาจับกับอไอออนของอนุภาคคอลลอยด์ และเนื่องจากพอลิเมอร์คลายตัวเป็นสายยาว ทำให้สามารถเชื่อมจับกับคอลลอยด์อื่น ๆ ได้อีก ทำให้เกิดการรวมตัวจับกลุ่มของอนุภาคและมีน้ำหนักสูงตกตะกอนได้
<b>2. การรวมตะกอนหรือการก่อการจับกลุ่ม (flocculation) มีหลายวิธี ดังนี้</b>	เป็นการทำให้อนุภาคคอลลอยด์เคลื่อนที่มาสัมผัสกันและเกาะจับติดกันจนเป็นกลุ่มรวมกันและตกตะกอนลงได้
2.1 การสร้างสัมผัสแบบออร์โธไคเนติก (orthokinetic flocculation)	เป็นการกวนน้ำให้มีการเคลื่อนที่ที่ความเร็วแตกต่างกัน ทำให้อนุภาคมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่เท่ากัน จึงเกิดการสัมผัสขึ้นได้ โดยต้องเป็นการกวนช้า เพื่อไม่ให้ฟล็อกที่เกิดแตกหลุดออกจากกัน ใช้กับอนุภาคขนาดใหญ่กว่า 0.1-1 ไมครอน ความเข้มข้นมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ต่อ)

ขั้นตอนการตกตะกอน	กลไก
2.2 การสร้างสัมผัสมแบบเพอริโคเนติก (perikinetetic Flocculation)	เป็นการสร้างสัมผัสมโดยใช้ความร้อน อนุภาคคอลลอยด์จะเคลื่อนที่สัมผัสมกันจากการถูกชนด้วยการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำ เรียกรการเคลื่อนที่แบบนี้ว่า แบบบราวเนียน (Brownian Motion) ใช้กับอนุภาคขนาดเล็กกว่า 0.1-1 ไมครอน
2.3 การสร้างสัมผัสมจากการตกตะกอน (sedimentation)	เป็นการสัมผัสมกันโดยเกิดจากการตกตะกอนของอนุภาคหลายขนาดที่ไม่เท่ากัน ซึ่งกระบวนการก่อการจับกลุ่มจะเกิดขึ้นพร้อมกันกับการตกตะกอน สามารถวิธีนี้กับอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 ไมครอน และมีความเข้มข้นมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
2.4 การสร้างสัมผัสมโดยการกรองสัมผัสม (contact Filtration)	เป็นการทำให้อนุภาคเคลื่อนที่มาใกล้กันมากขึ้นโดยใช้เครื่องกรองเข้ามาช่วยเพิ่มอัตราการสัมผัสมของอนุภาค ชั้นกรองมีหลายชนิด เช่น กรวด ทราย ถ่านแอนทราไซต์ เป็นต้น สามารถใช้ได้กับอนุภาคขนาดตั้งแต่ 0.1-5 ไมครอน และมีความเข้มข้นต่ำ ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
2.5 การสร้างสัมผัสมโดยใช้ฟล็อกเป็นเป้าสัมผัสม	เป็นการใช้ฟล็อกที่เกิดขึ้นแล้วมาเป็นเป้าสัมผัสมให้กับอนุภาคคอลลอยด์ใหม่ได้จับเกาะ ทำได้ 2 วิธี คือ 1) การทำให้อนุภาคคอลลอยด์มาเคลื่อนที่ผ่านชั้นสลัดจ์ที่เกิดจากฟล็อก (sludge blanke) 2) การนำฟล็อกที่เกิดขึ้นแล้วมาผสมกับอนุภาคใหม่ แล้วทำการกวนช้าเพื่อเพิ่มสัมผัสม วิธีนี้ใช้กับอนุภาคช่วงขนาด 0.1-5 ไมครอน และมีความเข้มข้นต่ำ

ตารางที่ 2.5 การจำแนกประเภทและตัวอย่างของสารก่อการจับกลุ่ม

ประเภทสารก่อการจับกลุ่ม	ตัวอย่างพอลิเมอร์
1. สารก่อการจับกลุ่มชนิดอนินทรีย์ (inorganic flocculant)	อลูมิเนียมซัลเฟต (aluminium sulfate) พอลิอลูมิเนียมคลอไรด์ (polyaluminium chloride, PAC) เฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate)
2. สารก่อการจับกลุ่มชนิดอินทรีย์ (organic synthetic flocculant) แบ่งได้เป็น กลุ่ม คือ 3	
2.1 ไม่มีประจุ (non-ionic)	พอลิอะคริลามายด์ (polyacrylamide ,PAM) พอลิเอทิลีนออกไซด์ (polyethylene oxide , PEO)
2.2 ประจุเป็นบวก (cationic)	พอลิไดอะริลไดเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (polydiallyldimethy ammonium chloride, polyDADMAC)
2.3 ประจุเป็นลบ (anionic)	กรดพอลิอะคริลิก (polyacrylic acid) กรดพอลิสไตรีนซัลโฟนิก (polystyrene sulfonic acid, PSSA)
3. สารก่อการจับกลุ่มที่ได้จากธรรมชาติ (natural flocculant, bioflocculant)	อัลจิเนต ,โคโตซาน ,เจลาติน เซลลูโลสเดกซ์แทรน ,

ที่มา : (Brostow และคณะ, 2009; Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001; Shih และคณะ, 2001; Takagi และ Kadowaki, 1985; Toeda และ Kurane, 1991)

สารก่อการจับกลุ่มทางเคมีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการบำบัดน้ำเสีย หรือการผลิตน้ำประปา เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและราคาต่ำ (Kurane และคณะ, 1986; Nakamura และคณะ, 1976; Takagi และ Kadowaki, 1985) แต่เนื่องจากมีรายงาน ว่า พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีส่วนใหญ่นั้น ย่อยสลายในธรรมชาติได้ยาก เกิดสารตกค้างที่มีความเป็นพิษสูง หากเกิดการสะสมจะก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพและชักนำให้เกิดโรคร้ายแรงหลายชนิด เช่น โรคมัลไซเมอร์ หรือ

โรคมะเร็ง เป็นต้น Polizzi และคณะ (2002) และ Banks และคณะ (2006) ได้รายงานการสะสมสารตกค้างของอะลูมิเนียมจากอะลูมิเนียมซัลเฟต หรือสารส้ม พบว่าอะลูมิเนียมมีความเป็นพิษต่อระบบประสาท ทำให้เป็นสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) Shih และคณะ (2001) ได้รายงานความเป็นพิษของ อะคริลาไมด์ พบว่ามีความเป็นพิษต่อระบบประสาทและมีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (carcinogenic) นอกจากนี้ ในการบำบัดนั้น เมื่อสารเคมีและคอลลอยด์ตกตะกอนลงมาจะเกิดสารตกค้างด้วย จึงจำเป็นต้องกำจัดสารเคมีที่ปนเปื้อนมากับตะกอนนั้น นั้นเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการบำบัด จากข้อจำกัดนี้ ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เข้ามามีบทบาทสำคัญในการจับกลุ่มตกตะกอนทดแทนพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากสารเคมี โดยสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพที่สนใจนั้นเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ทั้งสาหร่าย รา และแบคทีเรีย เป็นต้น (Kurane และคณะ, 1986; Nakamura และคณะ, 1976; Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) และเมื่อเปรียบเทียบพอลิเมอร์ทั้งสอง สารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพ มีข้อดีมากกว่า คือ สามารถย่อยสลายได้ง่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่มีความเป็นพิษตกค้างและไม่เป็นอันตรายทั้งต่อคนและสัตว์ ไม่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมลภาวะปนเปื้อนในแหล่งน้ำ มีความปลอดภัยต่อระบบนิเวศ (Nie และคณะ, 2011) โดยในปัจจุบันสารก่อการจับกลุ่มทางชีวภาพถูกใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยการใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ เช่น น้ำในแม่น้ำทั่วไป น้ำจากโรงงานเบียร์ หรือจากโรงงานที่ผลิตเครื่องตีประเภทแก้วเหลือง และโรงงานผลิตกระดาษ เป็นต้น (Gong และคณะ, 2008)

## 2.5.2 ปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อการเร่งการตกตะกอน

กลไกในการเกิดกระบวนการเร่งการตกตะกอน เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของสารช่วยเร่งการก่อการจับกลุ่ม ความเข้มข้นของประจุบวก ขนาดอนุภาค ค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิ ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดสภาวะการเร่งกระบวนการตกตะกอนที่แตกต่างกัน

### 2.5.2.1 ความเข้มข้นของสารเร่งการก่อการจับกลุ่ม

ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มจะสูงหรือจะต่ำ ขึ้นอยู่กับการใช้ความเข้มข้นของสารช่วยเร่งการจับกลุ่มทางชีวภาพที่เหมาะสมด้วย หากความเข้มข้นของสารช่วยเร่งการจับกลุ่มไม่เหมาะสม จะไปทำให้กลไกการสร้างสะพานเชื่อมจับกันระหว่างสารช่วยเร่งจับกลุ่มกับระบบคอลลอยด์เกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ และหากใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไป ก็จะไปรบกวนและทำลายเสถียรภาพของประจุในระบบคอลลอยด์ของสารละลายได้ ดังนั้นการเกิดกระบวนการฟล็อกกูเลชันกับสารช่วยเร่งการจับกลุ่มที่มี

มวลโมเลกุลสูงที่ความเข้มข้นต่ำ จึงมีผลให้ความสัมพันธ์ในการดูดซับที่เหมาะสมกว่า สะพานที่เชื่อมจับกันมีเสถียรภาพและมีความแข็งแรงมากกว่า ทำให้ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มจึงสูงกว่าการใช้กระบวนการจับกลุ่มกับสารช่วยเร่งการจับกลุ่มที่มีขนาดเล็กหรือมวลโมเลกุลต่ำ (Liu และคณะ, 2010; Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) ตัวอย่างเช่น Liu และคณะ (2010) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพการก่อการจับกลุ่มของ ฟลือกูแลนที่ที่ได้จาก *C. daeguense* พบว่าในช่วงความเข้มข้นของฟลือกูแลนตั้งแต่ 0.3-8.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพการเร่งการจับกลุ่มได้สูง 90% และสูงสุดได้ถึง 96.9% ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้น

#### 2.5.2.2 ความเข้มข้นของไอออนโลหะ

เนื่องจากความเข้มข้นของประจุบวกของโลหะมีบทบาทสำคัญในการทำลายเสถียรภาพของระบบคอลลอยด์ โดยการทำให้ประจุลบบนพื้นผิวอนุภาคคอลลอยด์เป็นกลาง (He และคณะ, 2010; Wu และ Ye, 2007; Yim และคณะ, 2007) และยังเป็นตัวกลางที่ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมจับกันระหว่างอนุภาคและพอลิแซ็กคาไรด์ (Higgins และ Novak, 1997) ดังนั้นปริมาณของประจุบวกจึงส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่ม นอกจากนี้ หากเติมไอออนโลหะมากเกินไป จะทำให้เป็นการเพิ่มมลภาวะในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในกระบวนการกำจัดออกหลังการบำบัด Salehizadeh และ Yan (2014) ได้รายงานว่าการเติม  $\text{CaCl}_2$  ลงไป เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเร่งการจับกลุ่มร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดี โดยพอลิแซ็กคาไรด์นี้สามารถผลิตได้จาก *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* และ *Yersinia* เป็นต้น (More และคณะ, 2012; Subramanian และคณะ, 2010)

#### 2.5.2.3 ค่าความเป็นกรดต่าง

ค่าความเป็นกรดต่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่ม (Yokoi และคณะ, 1995; Yokoi และคณะ, 2002) Ji และคณะ (2010) ได้รายงานว่าการเติมเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* มีประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มสูงในช่วงค่าความเป็นกรดต่างที่กว้าง (pH 2-12) นอกจากนี้ (Ugbenyen และ Okoh, 2014) มีรายงานว่าไบโอฟลือกูแลนที่ได้จาก *Cobetia* sp. และ *Bacillus* sp. จะแอดทิฟในช่วงค่าความเป็นกรดต่างในช่วงกว้าง (pH 3-10) โดยจะมีประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มสูงสุดที่ pH 8 เป็นต้น



#### 2.5.2.4 อุณหภูมิ

โครงสร้างหลักของพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต ซึ่งโดยปกติจะค่อนข้างทนความร้อน (Takagi และ Kadowaki, 1985) Ugbenyen และ Okoh (2014) เคยรายงานว่า ภายหลังจากการสัมผัสความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา 25 นาที ของพอลิเมอร์ที่ได้จาก *Cobetia* sp., *Bacillus* sp. ยังคงมีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มอยู่ถึง 87% ในขณะที่เคยมีรายงานพบว่า สารช่วยเร่งการจับกลุ่มที่ได้จาก *Bacillus* sp., *Nocardia amarae*, *Streptomyces griseus* ไม่สามารถทนความร้อนได้ และมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-40°C โดยอุณหภูมิที่ทำให้มีฟล็อกกูเลชันมีประสิทธิภาพสูงสุด คือ 30 °C (Shimofuruya และคณะ, 1996; Takeda และคณะ, 1992; Yokoi และคณะ, 1995; Yokoi และคณะ, 2002) ซึ่งจะเห็นได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำให้ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มได้ดีนั้น อยู่ในช่วงอุณหภูมิที่หลากหลายตั้งแต่ 4-95°C (More และคณะ, 2014)

## 2.6 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

การวิเคราะห์ HPLC เป็นการตรวจวัดคุณภาพทั้งทางเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) โดยเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) ของมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์กับสารมาตรฐาน เพื่อตรวจดูว่าเป็นมอนอแซ็กคาไรด์ชนิดใด นอกจากนี้ยังเป็นการตรวจวัดในเชิงปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ซึ่งเป็นการวัดความสูงของของพีคกับสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณความเข้มข้นแล้ว หรือสามารถเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้วกับตัวอย่างสารที่นำมาวิเคราะห์ได้ (Skoog และคณะ, 2007) HPLC ถูกใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบต่างๆที่อยู่ในตัวอย่าง โดยในการวิเคราะห์นั้น ประกอบไปด้วยสองเฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) นั่นคือ คอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดย HPLC จะใช้ตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่พาสารละลายตัวอย่างให้เคลื่อนผ่านตัวคอลัมน์ จากนั้นสารตัวอย่างจะดูดซับกับคอลัมน์ หากสารตัวอย่างมีการดูดซับได้ดี จะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ช้า สารตัวอย่างที่ดูดซับได้น้อยกว่าจะใช้เวลาสั้นกว่า ทำให้เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาได้เร็วกว่า ในการแยกชนิดของสารประกอบนี้นั้น จึงใช้ความแตกต่างของความเร็วหรือระยะเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของสารมาช่วยแยก สารที่แยกออกมาจะถูกวัดสัญญาณโดยตัววัดสัญญาณโครมาโทแกรม และแสดงผลออกมาในรูปของพีคของกราฟเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (Lindsay, 1991)

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อคัดแยกแบคทีเรียในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก แหล่งน้ำเสียและศึกษาคุณสมบัติเป็นตัวช่วยเร่งการจับกลุ่มทางชีวภาพและสภาวะที่เหมาะสมต่อ ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย



### บทที่ 3

#### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์

1. Arm flask บริษัท PYREX
2. กระดาษกรอง Whatman บริษัท General Electric (GE)
3. กระดาษวัดความเป็นกรด-ด่าง บริษัท Merck, Germany
4. กระบอกกีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร บริษัท Nipro (ประเทศไทย) จำกัด
5. กระบอกเซนตริฟิวจ์ บริษัท NALGENE , USA
6. กระบอกตวง บริษัท PYREX
7. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF20 บริษัท Olympus, Japan
8. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท EXELO
9. ขวดรูปหมัพู่ บริษัท PYREX
10. คิวเวตต์ บริษัท PYREX
11. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 204 และ AG 285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
12. เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S และ AG 6002-S บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
13. เครื่องเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก รุ่น Spectrafuge บริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
14. เครื่องเซนตริฟิวจ์ชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
15. เครื่องเซนตริฟิวจ์ตั้งโต๊ะ รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich Zerifugen, Germany
16. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 และ ES-315 บริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 บริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
17. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท SciEific Industries Inc., USA
18. เครื่องระเหิดแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
19. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys บริษัท Thermo Spectronic, USA
20. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส รุ่น SevenEasy บริษัท Toledo Co., Ltd., Switzerland

21. งานเลี้ยงเชื้อแก้ว บริษัท PYREX
22. งานเลี้ยงเชื้อพลาสติก บริษัท Hycon
23. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124 บริษัท International Scific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่นHVB 120S บริษัท Boss Scific Associate L.P, Thailand
24. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo Electric, Japan
25. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็ง 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo Electric, Japan
26. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็ง -80 องศาเซลเซียส บริษัท Forma SciEific, USA
27. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ รุ่น INE 500 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
28. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
29. โถดูดความชื้น (dessicator)
30. ปีกเกอร์ บริษัท PYREX
31. ปิเปตแก้วขนาด 5, 10 มิลลิลิตร บริษัท HBG, Germany
32. ปิเปตทึบ ขนาด 10-200 ไมโครลิตร, 1, 5, 10 มิลลิลิตร บริษัท Axygen SciEific, USA
33. พาราฟิล์ม บริษัท American national can
34. ไมโครปิเปต ขนาด 20, 200, 1000, 5000 และ 10000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
35. หลอดทดลอง บริษัท PYREX
36. หลอดทดลองฝาเกลียว PYREX
37. หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูกรอง 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 บริษัท Gat Asia, Ltd., Hong Kong

### 3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany
2. กรดฟอสฟอริก บริษัท Mallinckrodt chemical, USA
3. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
4. กลีเซอรอล บริษัท Merck, Germany
5. กลูโคส บริษัท Merck, Germany
6. กัวกัม บริษัท Success chemical, Thailand
7. กาแลคโทส บริษัท Difco, USA
8. เกลือ ตราปรุรงทิพย์ บริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด ประเทศไทย
9. คูแมสซีบลู จี 250 บริษัท Sigma Chemical Co., USA
10. ซูโครส (น้ำตาลทรายขาว) บริษัท น้ำตาลมิตรผล ประเทศไทย
11. เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride)
12. แชนแทนกัม บริษัท Sigma Chemical Co., USA
13. โซเดียมอะซิเตต บริษัท บริษัท Merck, Germany
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany
15. โซโลส บริษัท Difco, USA
16. ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
17. ทรีปโตน บริษัท Difco Laboratories, USA
18. โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
19. โปรตีนเอสเปปโตน เบอร์ 3 บริษัท Becton, Dickinson and Company, USA
20. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
21. ฟรุคโตส บริษัท Fluka, Switzerland
22. ฟีนอล บริษัท Merck, Germany
23. เมทานอล บริษัท Merck, Germany
24. แมกนีเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
25. แมงกานีสซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
26. แมนโนส บริษัท Sigma Chemical Co., Ltd., USA และบริษัท Fluka, Switzerland
27. แรมโนส บริษัท Difco, USA
28. ไรโบส บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
29. สารสกัดจาก (beef extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand

30. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Biospringer, France
31. อะซีโตน บริษัท Merck, Germany
32. อะราบีโนส บริษัท Fluka, Switzerland
33. เอทานอล บริษัท Lacscan Asia, Co., Ltd., Thailand
34. เอ็น-บิวทานอล บริษัท Merck, Germany
35. แอมโมเนียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
36. ไอโซโพรพานอล บริษัท Merck, Germany



### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากน้ำเสีย

##### 3.3.1.1 แหล่งเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบริเวณพื้นที่ต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของเซลล์และใช้เป็นสารตั้งต้นเริ่มต้นในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ ได้แก่ ตลาดสดห้วยขวาง บ่อพักโรงอาหารจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บ่อพักตะกอนโรงงานขนนมจันทน์ บ่อรวมโรงงานผลิตไซรัปและน้ำผึ้งสวนจิตรลดา โดยเก็บตัวอย่างน้ำเสียทั้งหมดใส่ในขวดคูแวนที่ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาคัดแยกแบคทีเรีย

##### 3.3.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้

นำตัวอย่างน้ำเสียมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl แล้วนำมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็งตามสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนีที่มีเมือกเยิ้มและมีความหนืดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

3.3.2 การผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในได้ปริมาณสูง

##### 3.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์จากข้อ 3.3.1.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) ที่มีซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 6.5 บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.8-1.0 เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

### 3.3.2.2 การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) ที่มีซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 6.5 บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

### 3.3.2.3 การสกัดแยกและการทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ในปริมาณสูง

นำเซลล์เพาะเลี้ยงจากข้อ 3.3.2.2 มาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ตามวิธีดัดแปลงของ Gniewosz และSynowiec (2011) โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกตะกอนโปรตีนและเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอลที่สภาวะเย็น ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาละลายน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์อีกครั้งด้วย 95% เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 3 เท่าของส่วนใส ตั้งทิ้งข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยด้วยเครื่องระเหิดที่อุณหภูมิต่ำ หลังจากนั้นเก็บในเดซิเคเตอร์เพื่อให้น้ำหนักคงที่ ติดตามผลการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เปรียบเทียบกับแต่ละเชื้อโดยนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง รายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร จากนั้นคัดเลือก 5 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตได้สูงสุดมาศึกษาสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย และทดสอบคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องในการตกตะกอนของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

### 3.3.3 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในงานวิจัย

#### 3.3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.1.2 มาซัดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแบบเอียงตามสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์



### 3.3.3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.1.2 มาซิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวตามสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันแบบเหลว ที่มีกลีเซอรอล 15% และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในระดับสูง นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน

#### 3.3.4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.1.2 มาซิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งตามสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนี และย้อมแกรมเซลล์แบคทีเรียเพื่อตรวจสอบการติดสีแกรมของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 3.3.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA โดยใช้บริการของบริษัทมาโครเจนโดยใช้ไพรเมอร์ คือ 785F (5' –GGATTAGATACCCTGGTA- 3') และ 907R (5' –CCGTC AATTCMTTTRAGTTT- 3') เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว นำข้อมูลที่ได้มาปรับแนวลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor version 5.0.9 (Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University) และนำมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน

GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### 3.3.5 การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2.3 มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่าง ๆ ของพอลิแซ็กคาไรด์ และทดสอบคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คือ ความสามารถในการละลายของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในตัวทำละลายต่าง ๆ ชนิดประจุของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในการจับสารโมเลกุลต่าง ๆ ให้แยกออกจากน้ำ และความสามารถในการเป็นตัวเร่งตกตะกอนของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นต้น

#### 3.3.5.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อศึกษาชนิดองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์จากข้อ 3.3.2.3 ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผ่านความร้อนในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้มีค่าเท่ากับ 7 จากนั้นกรองส่วนน้ำใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน นำสารละลายใส่ที่ได้ส่งวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโทกราฟี ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์

##### 3.3.5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956) นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ 0.1 มิลลิกรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่น จากนั้นนำตัวอย่างที่ต้องการมา 1 มิลลิลิตรมาเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5% (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที และนำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ น้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ค)

3.3.5.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976) นำตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม นำสารละลาย พอลิแซ็กคาไรด์ 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง ทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่น จากนั้นเติมสารละลาย Coomassie blue (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานที่ใช้โบทินซีรัมแอลบูมิน (BSA) (ภาคผนวก ค)

3.3.5.2.3 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

ทดสอบความสามารถในการละลาย (Collins และคณะ, 1973) นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ จากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์จากข้อ 3.3.2.3 มาละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่าง ๆ ได้แก่ เมทานอล อะซิโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องโดยเครื่องผสมสาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม สังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์

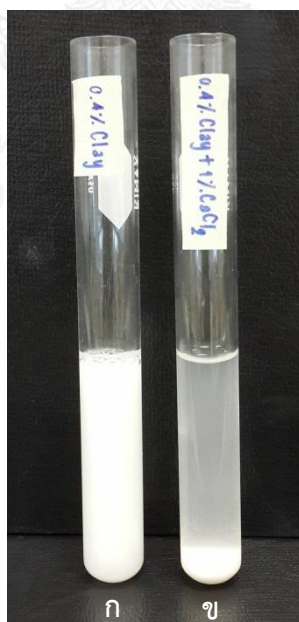
3.3.5.2.4 การวิเคราะห์หาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

วิเคราะห์หาชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ (Ueda และคณะ, 1981) นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์จากข้อ 3.3.2.3 ที่ผลิตได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล เติมสารละลายซีทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ Cetylpyridinium Chloride (CPC) ที่มีความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตตะกอนใน สารละลาย ถ้าพบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประจุลบ แต่หากไม่มีตะกอนให้นำมา ทดสอบต่อว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประจุเป็นกลาง โดยการตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% จะเกิดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์อีกครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.3.5.2.5 การทดสอบความสามารถในการตกตะกอน (flocculation)

ทดสอบความสามารถในการตกตะกอน (Auhim และ Odaa, 2013) เตรียมสารละลายดินขาว (kaolin clay) ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 และเตรียมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ โดยนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์จากข้อ 3.3.2.3 ที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากนั้นผสมกันในหลอดทดลอง ดังนี้ สารละลายดินขาว 9 มิลลิลิตร สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องโดยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับแซนแทนและอัลจินต และเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและดินขาว 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ ดังสูตรการคำนวณต่อไปนี้

$$\% \text{การกำจัดอนุภาคคอลลอยด์} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{550}^{\text{(ก่อนจับกลุ่ม)}} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{550}^{\text{(หลังจับกลุ่ม)}})}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{550}^{\text{(ก่อนจับกลุ่ม)}}} \times 100$$



**รูปที่ 3.1** (ก) สารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ (ข) สารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและแคลเซียม 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

### 3.3.6 การประยุกต์ใช้ทางสิ่งแวดล้อม

3.3.6.1 การศึกษาประสิทธิภาพการจับกลุ่มของอนุภาคคอลลอยด์ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สภาวะต่างๆ

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์จากข้อ 3.3.2.3 ที่มีลักษณะสมบัติต่างๆที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5 เช่น มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้ มีชนิดประจุที่เหมาะสมต่อการจับกลุ่มอนุภาคคอลลอยด์ และมีสมบัติในการเร่งการจับกลุ่มได้ เป็นต้น มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆที่มีผลต่อกลไกการจับรวมกลุ่มตกตะกอนของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คือ ความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิ เป็นต้น

#### 3.3.6.1.1 ความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต่างกัน

เตรียมสารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 และเตรียมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.001-15 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาผสมกันในหลอดทดลองดังนี้ สารละลายดินขาว 9 มิลลิลิตร สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องโดยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับแซนแทนและอัลจินต เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและดินขาว 0.4% จากนั้นนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่ม

#### 3.3.6.1.2 ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ต่างกัน

เตรียมสารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 และเตรียมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.3.6.1.1 จากนั้นผสมกันในหลอดทดลองดังนี้ สารละลายดินขาว 9 มิลลิลิตร สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1-12.5 กรัมต่อลิตร ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องโดยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และ

เปรียบเทียบกับแซนแทนและอัลจินเต เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและดินขาว 0.4% จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่ม

#### 3.3.6.1.3 ค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน

เตรียมสารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเตรียมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.3.6.1.1 จากนั้นผสมกันในหลอดทดลองดังนี้ สารละลายดินขาว 9 มิลลิลิตร สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.6.1.2 ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3, 5, 7, 9 และ 11 ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องโดยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับแซนแทนและอัลจินเต เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและดินขาว 0.4% จากนั้นนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่ม

#### 3.3.6.1.4 อุณหภูมิที่ต่างกัน

เตรียมสารละลายดินขาวในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.6.1.3 และเตรียมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.3.6.1.1 จากนั้นผสมกันในหลอดทดลองดังนี้ สารละลายดินขาว 9 มิลลิลิตร สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.6.1.2 ผสมให้เข้ากันที่ช่วงอุณหภูมิที่ต่างกันคือ 20, 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียสโดยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับแซนแทนและอัลจินเต เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและดินขาว 0.4% จากนั้นนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่ม

#### 3.3.6.2 การประยุกต์ใช้บำบัดตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งน้ำจริง

ทดลองประสิทธิภาพในการจับกลุ่มโดยใช้น้ำเสียจริงจากบ่อน้ำทิ้งภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่มีลักษณะเป็นตะกอนขุ่นแขวนลอยอยู่ในน้ำ โดยวัดค่าความขุ่น และค่าความเป็นกรดต่างของน้ำเสีย จากนั้นเติมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ปรับสภาวะค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.6.1 ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

550 นาโนเมตร จากนั้นนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มของอนุภาคคอลลอยด์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับน้ำเสียเริ่มต้นก่อนการจับกลุ่มและประสิทธิภาพในการจับกลุ่มกับพอลิเมอร์ที่เป็นสารเคมีที่ใช้ในทางการค้า ได้แก่ อะลูมิเนียมซัลเฟต (ALUM) และเฟอร์ริกคลอไรด์



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 แבקที่เรียที่มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ค้ดแยกจากตัวอย่างน้ำเสีย

จากการค้ดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างน้ำเสีย ตลาดสดห้วยขวาง บ่อพักตะกอนโรงงานขนมจีนหมัก บ่อรวมโรงงานผลิตไซรับน้ำผึ้งและผลไม้ กระทบจากสวนจิตรลดา รวมทั้งหมด 3 แหล่ง โดยค้ดแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งตาม สูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) ที่มีซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร หลังการบ่ม 24 ชั่วโมง สังเกตและค้ดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มบน ผิวหน้าอาหาร ตัวอย่างแสดงในรูปที่ 4.2 ผลการทดลองพบแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มทั้งหมด 30 ไอโซเลต โดยตัวอย่างน้ำเสียจากตลาดสดห้วยขวางพบแบคทีเรียลักษณะที่ต้องการจำนวน 13 ไอโซเลต จากโรงงานขนมจีนหมักพบแบคทีเรียลักษณะที่ต้องการจำนวน 2 ไอโซเลต โรงงานผลิตไซรัป และผลิตน้ำผึ้งของสวนจิตรลดาพบแบคทีเรียลักษณะที่ต้องการจำนวน 15 ไอโซเลต ผลการค้ดแยก แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งต่างๆแสดงในตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มที่ค้ดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย แหล่งต่างๆ

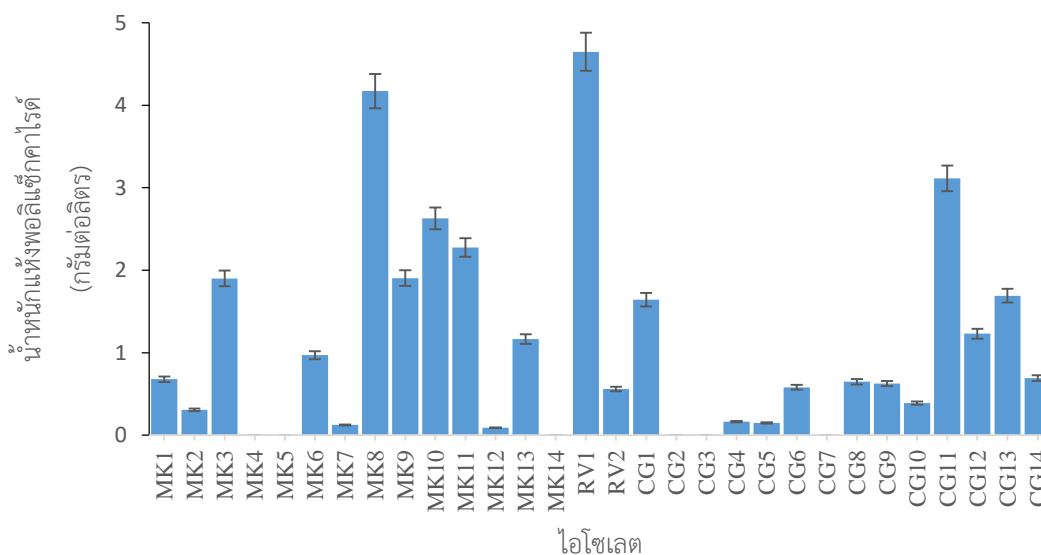
แหล่งที่มา	จำนวนไอโซเลตแบคทีเรีย ที่เป็นเมือกเยิ้ม	รหัสเชื้อ
ตลาดสด (ห้วยขวาง)	14	MK1-MK14
โรงงานขนมจีนหมัก	2	RV1-RV2
โรงงานผลิตไซรับน้ำผึ้งและผลไม้ กระทบ (สวนจิตรลดา)	14	CG1-CG14



#### 4.2 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ในการทดสอบหาประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกนั้น ทำโดยการนำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวของสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) ที่มี 4 % ของซูโครส โดยนำน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมาเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดเวลานำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ออกตามวิธีในข้อ 3.3.2.3 และนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง โดยมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จะมีหลายลักษณะ คือ เป็นผงละเอียด เป็นก้อนขนาดเล็ก และเป็นแผ่นบาง ดังแสดงในรูปที่ 4.3

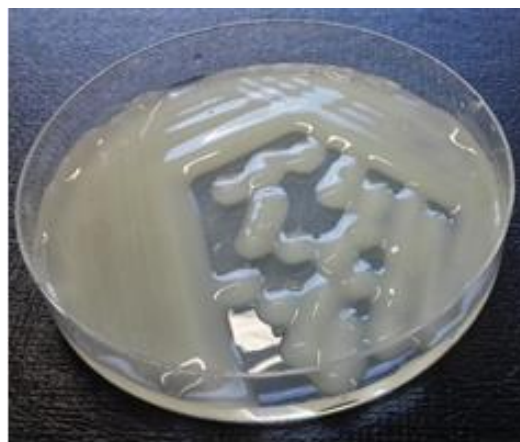
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้งหมด 30 ไอโซเลตที่เป็นเมือกเยิ้ม นั้น พบว่า RV1 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ 4.65 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ MK8, CG11, MK9 และ MK11 สามารถผลิตได้ 4.17, 3.11, 2.63 และ 2.28 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนไอโซเลตอื่นๆ สามารถสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณน้อย อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.0001-1.90 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.1



**รูปที่ 4.1** กราฟเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จากแบคทีเรียทั้งหมด 30 ไอโซเลต ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่มี 4% ซูโครส ภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.2 ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นเมือกเยิ้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มี 4%ซูโครส ภายหลังจากการป้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) ไอโซเลต MK10 และ (ข) ไอโซเลต RV1



(ก)



(ข)




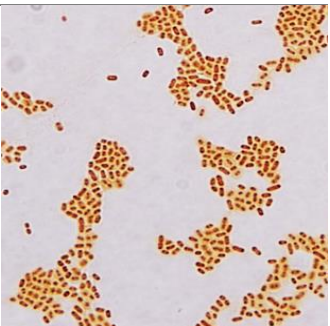
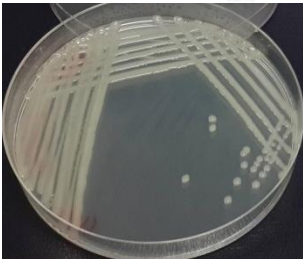
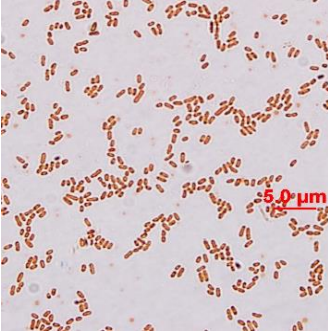


(ค)

รูปที่ 4.3 ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต (ก) CG11 (ข) MK10 และ (ค) RV1


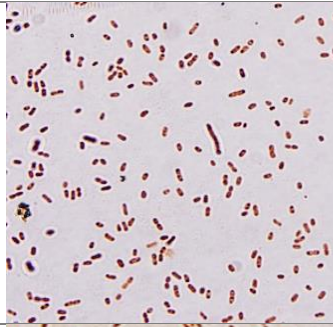
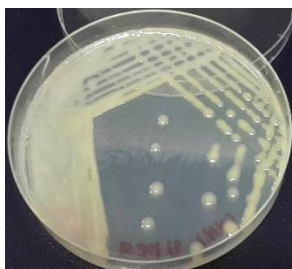
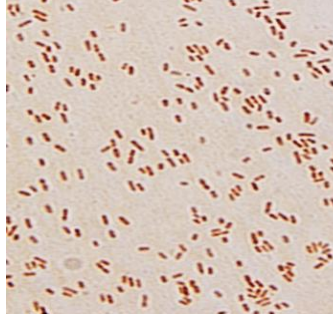
### 4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูงสุด 5 ไอโซเลต คือ RV1, MK8, CG11, MK10 และ MK11 มาทดสอบสมบัติทางสรีรวิทยา พบว่าจากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตนั้นมีโคโลนีลักษณะกลม สีครีม และเป็นเมือกเยิ้ม ติดสีย้อมแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแบบแท่งสั้น ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรีย 5 ไอโซเลตที่เลือก

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA	แกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	รูปร่างได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า
CG11	กลม สีครีม มีเมือกเยิ้ม 	ลบ	แท่งสั้น	
MK8	กลม สีครีม มีเมือกเยิ้ม 	ลบ	แท่งสั้น	
MK10	กลม สีครีม มีเมือกเยิ้ม 	ลบ	แท่งสั้น	

(ต่อ)

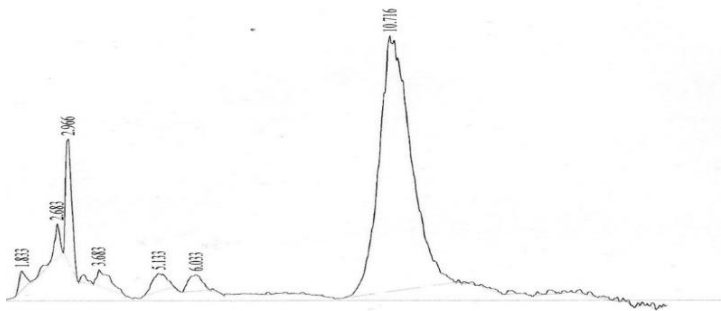
ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA	แกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า
MK11	กลม สีครีม มีเมือกเยิ้ม 	ลบ	แท่งสั้น	
RV1	กลม สีครีม มีเมือกเยิ้ม 	ลบ	แท่งสั้น	

#### 4.4 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

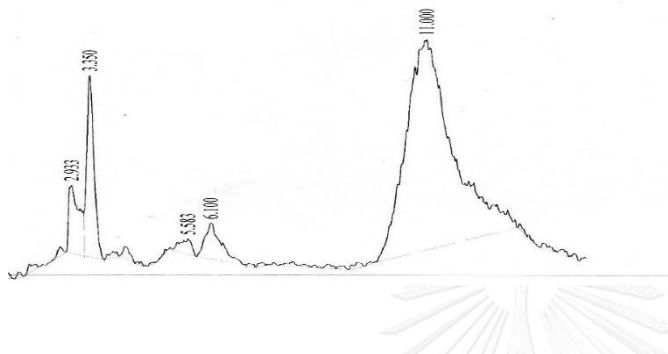
##### 4.4.1 องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

ในการหาชนิดของมอนอแซ็กคาไรด์ของพอลิแซ็กคาไรด์ ทำโดยการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต คือ RV1, MK8, CG11, MK10 และ MK11 ด้วยกรดซัลฟูริก จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 แล้วกรองส่วนใสผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำไปส่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี สภาวะตามหัวข้อ 3.3.5.1 โดยเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกมาจากตัวคอลัมน์จะถูกแสดงผลในรูปของโครมาโทแกรม จากนั้นนำผลโครมาโทแกรมของตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับชนิดมอนอแซ็กคาไรด์จากสารละลายมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.3

จากผลการวิเคราะห์พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต จัดเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากไอโซเลต RV1, MK8, CG11, MK10 และ MK11 มีมอนอแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบด้วย คือ กาแลคโทส ไซโลส ไรโบส แรมโนส และมอนอแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3



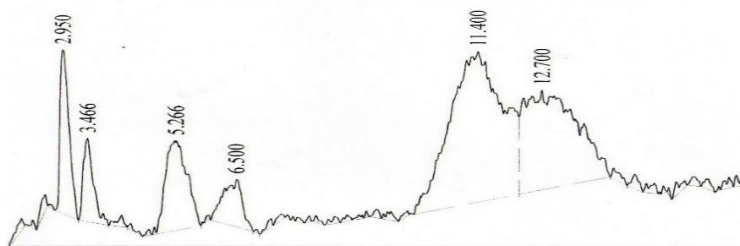
(ก) CG11



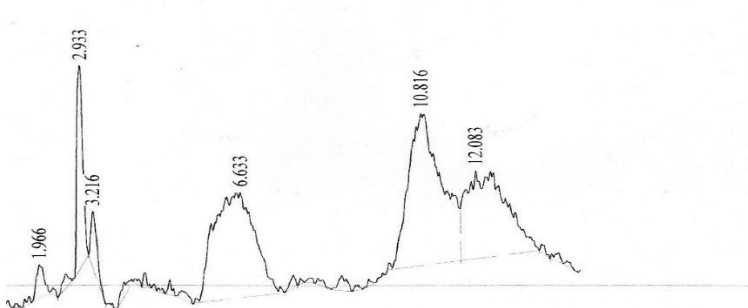
(ข) MK8



(ค) MK10



(ง) MK11



(จ) RV1

**รูปที่ 4.4** โครมาโทแกรมแสดงดังนี้ (ก-จ) คือ ชนิดมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของแบคทีเรีย ทั้ง 5 ไอโซเลต CG11, MK8, MK10, MK11 และ RV1 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ชนิดมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต โดยการวิเคราะห์จากโครมาโทแกรมจาก HPLC

ไอโซเลต	ชนิดมอนอแซ็กคาไรด์
CG11	กลูโคส
	แรมโนส
	มอนอแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ
MK8	กลูโคส
	แรมโนส
	มอนอแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ
MK10	กลูโคส
	ไรโบส
	มอนอแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ
MK11	กลูโคส
	ไซโลส
	แรมโนส
	มอนอแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ
RV1	กลูโคส
	กาแลคโทส
	ไซโลส

#### 4.4.2 ปริมาณน้ำตาลและโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์

##### 4.4.2.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid

วิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 5 ไอโซเลต คือ RV1, MK8, CG11, MK10 และ MK11 มาทดสอบตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตหรือน้ำตาลค่อนข้างสูง คือ MK8, MK11 และ CG11 โดยมีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 76.57, 76.31 และ 74.84 % (w/w) ตามลำดับ และไอโซเลต RV1 และ MK10 มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 52.75 และ 43.69 % (w/w) ตามลำดับ ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.4

##### 4.4.2.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Protein Dry Binding

วิเคราะห์โดยการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 5 ไอโซเลต คือ RV1, MK8, CG11, MK10 และ MK11 มาทดสอบตามวิธีของ Bradford (1976) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างต่ำ โดย MK8, MK11, MK10, CG11 และ RV1 มีปริมาณโปรตีน 0.34, 0.40, 0.47, 0.51 และ 1.53 % (w/w) ตามลำดับ ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือก 5 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (% w/w)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (% w/w)
CG11	74.84 ±0.030	0.51 ±0.003
MK8	76.57 ±0.010	0.34 ±0.003
MK10	43.69 ±0.030	0.47 ±0.002
MK11	76.31 ±0.016	0.40 ±0.004
RV1	52.75 ±0.014	1.53 ±0.002

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.4.3 ความสามารถในการละลายของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

ทดสอบความสามารถในการละลายโดยการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 5 ไอโซเลต คือ RV1, MK8, CG11, MK10 และ MK11 ที่มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาทดสอบการละลายในตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล พบว่า CG11, MK10, MK11 และ RV1 มีความสามารถในการละลายในน้ำได้ในระดับปานกลาง และ MK8 สามารถละลายได้ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแซนแทน ที่อุณหภูมิห้อง และทั้ง 5 ชนิดไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอื่นๆ โดยผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างๆของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างๆที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง				
	น้ำกลั่น	เมทานอล	อะซีโตน	ไอโซโพรพานอล	n-บิวทานอล
CG11	++	-	-	-	-
MK8	+	-	-	-	-
MK10	++	-	-	-	-
MK11	++	-	-	-	-
RV1	++	-	-	-	-
แซนแทน	+++	-	-	-	-

**หมายเหตุ :** ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์แทนด้วยเครื่องหมาย (+)  
 - ไม่ละลายน้ำ เกิดตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด  
 + ละลายได้ต่ำ เกิดตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดมาก  
 ++ ละลายได้ปานกลาง ยังมีตะกอนเหลืออยู่เล็กน้อย  
 +++ ละลายได้ดี ไม่เกิดตะกอนหลงเหลืออยู่



#### 4.4.4 ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

ทดสอบชนิดประจุโดยการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 5 ไอโซเลต คือ RV1, MK8, CG11, MK10 และ MK11 ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาเติมสารละลายเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ลงไป จากการทดลองพบว่า จากพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ไอโซเลต พบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก 3 ไอโซเลต คือ MK10, RV1 และ CG11 เกิดตะกอนสีขาวของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแขนแทนซึ่งเกิดเป็นตะกอนสีขาวเหมือนกัน แสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์กลุ่มนี้มีประจุเป็นลบ ในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากอีก 2 ไอโซเลต คือ MK8 และ MK11 ไม่เกิดตะกอนสีขาว แสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง ดังแสดงในตารางที่ 4.6

**ตารางที่ 4.6** ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์
CG11	ลบ
MK8	กลาง
MK10	ลบ
MK11	กลาง
RV1	ลบ
แขนแทน	ลบ

#### 4.4.5 ความสามารถในการเร่งการจับกลุ่ม (flocculation)

ทดสอบความสามารถในการเร่งการจับกลุ่มโดยการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 5 ไอโซเลต คือ RV1, MK8, CG11, MK10 และ MK11 ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาทดสอบการจับกลุ่มเพื่อก่อตะกอนของดินขาวร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1% จากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น MK10, MK11, RV1, MK8 และ CG11 มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มค่อนข้างสูง คือ 86.70, 85.27, 84.06, 82.22 และ 72.42% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแซนแทนและอัลจิเนต และจากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต MK10, MK11 และ RV1 มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตาราง 4.7

**ตารางที่ 4.7** ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต

พอลิแซ็กคาไรด์	% flocculating activity
ดินขาว + CaCl <sub>2</sub>	84.12 <sup>bcd</sup> ±1.33
CG11	72.42 <sup>a</sup> ±0.88
MK8	82.22 <sup>b</sup> ±1.06
MK10	86.70 <sup>d</sup> ±0.97
MK11	85.27 <sup>cd</sup> ±0.42
RV1	84.06 <sup>bcd</sup> ±0.93
แซนแทน	72.75 <sup>a</sup> ±0.94
อัลจิเนต	82.70 <sup>bc</sup> ±1.43

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

นำแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตที่คัดเลือก คือ CG11, MK8, MK10, MK11 และ RV1 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA ที่บริษัทมาโครเจน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้โปรแกรม Blast N พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ 5 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยจากผลการวิเคราะห์พบว่า MK8 มีความคล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Klebsiella* sp. (KR190424.1) 99% ส่วนไอโซเลต CG11 เหมือนกับแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ TGH10 (CP012744.1) 100% ไอโซเลต MK10, MK11 และ RV1 มีความคล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ 211 (KM077044.1) 99%, AATZP (CP014755.1) 99% และ Mardeille-P215 (LT558819.1) 98% ตามลำดับ และ ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.8

**ตารางที่ 4.8** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลของ Genbank

ไอโซเลต	แบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียง	Accession No.	Sequencing identity (%)
CG11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain TGH10	CP012744.1	100%
MK8	<i>Klebsiella</i> sp.	KR190424.1	99%
MK10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 211	KM077044.1	99%
MK11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain AATZP	CP014755.1	99%
RV1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain Marseille-P215	LT558819.1	98%

## 4.5 การประยุกต์ใช้ในการเร่งการจับกลุ่ม

### 4.5.1 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สภาวะต่าง ๆ

#### 4.5.1.1 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต่างกัน

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกคัดเลือกทั้ง 5 ไอโซเลต คือ CG11, MK8, MK10, MK11 และ RV1 ที่มีความเข้มข้นต่างกัน มาทดสอบหาความสามารถในการจับกลุ่มเพื่อก่อตะกอนของดินขาวร่วมกับ แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1% ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.9

จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.001-15 กรัมต่อลิตรนั้นอยู่ในช่วง 0.13-89.29 % โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นช่วง 0.001-0.1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสารละลายดินขาวที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรที่มีแคลเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียวจาก 83.94% เป็นอยู่ในช่วง 85.98-89.29% และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ในช่วงตั้งแต่ 0.001-0.1 กรัมต่อลิตร จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันในทางสถิติ และมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % กับช่วงความเข้มข้น 0.5-15 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจากกลุ่มความเข้มข้นช่วง 0.001-0.1 กรัมต่อลิตร จึงเลือกความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต่ำที่สุดที่ทำให้มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มค่อนข้างสูงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.001 กรัมต่อลิตร (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแซนแทนและอัลจินेटพบว่า ที่ความเข้มข้นเดียวกันนั้นพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มใกล้เคียงกัน

**ตารางที่ 4.9** ประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลตที่สามารถความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่างกัน

% flocculating activity									
ดินขาว + 1%CaCl <sub>2</sub>	83.94 <sup>de</sup> ±0.63								
พอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	CG11	MK8	MK10	MK11	RV1	แซนแทน	อัลจิเนต		
0.001	87.23 <sup>def</sup> ±0.19	87.83 <sup>gh</sup> ±0.39	88.80 <sup>f</sup> ±0.05	86.09 <sup>ef</sup> ±0.03	82.82 <sup>cd</sup> ±0.19	88.73 <sup>f</sup> ±0.25	87.68 <sup>d</sup> ±0.27		
0.005	89.29 <sup>f</sup> ±0.42	87.58 <sup>gh</sup> ±0.63	87.62 <sup>ef</sup> ±0.34	86.10 <sup>ef</sup> ±0.33	88.15 <sup>fs</sup> ±0.13	87.70 <sup>f</sup> ±0.39	85.70 <sup>bc</sup> ±0.71		
0.010	89.05 <sup>f</sup> ±0.14	89.24 <sup>h</sup> ±0.32	88.02 <sup>f</sup> ±0.49	86.31 <sup>f</sup> ±1.09	89.20 <sup>g</sup> ±0.28	87.75 <sup>f</sup> ±0.15	87.84 <sup>d</sup> ±0.37		
0.025	89.00 <sup>ef</sup> ±0.11	87.62 <sup>gh</sup> ±0.93	87.99 <sup>f</sup> ±0.17	86.31 <sup>f</sup> ±0.86	88.33 <sup>fs</sup> ±0.20	88.09 <sup>f</sup> ±0.35	88.55 <sup>d</sup> ±0.26		
0.050	87.74 <sup>e</sup> ±0.27	87.84 <sup>gh</sup> ±0.32	88.82 <sup>f</sup> ±0.12	86.88 <sup>ef</sup> ±0.11	88.50 <sup>fs</sup> ±0.70	87.26 <sup>f</sup> ±0.67	87.58 <sup>d</sup> ±0.04		
0.100	87.98 <sup>f</sup> ±0.40	86.99 <sup>fs</sup> ±0.69	88.51 <sup>f</sup> ±0.32	85.98 <sup>ef</sup> ±0.48	86.47 <sup>e</sup> ±0.63	86.87 <sup>f</sup> ±0.45	87.59 <sup>d</sup> ±0.19		
0.500	83.09 <sup>d</sup> ±0.73	86.09 <sup>ef</sup> ±0.44	87.34 <sup>ef</sup> ±0.83	83.95 <sup>e</sup> ±0.52	86.72 <sup>e</sup> ±0.68	81.56 <sup>d</sup> ±0.46	87.19 <sup>cd</sup> ±0.56		
1	83.63 <sup>de</sup> ±0.46	84.54 <sup>de</sup> ±0.43	86.20 <sup>e</sup> ±0.72	80.07 <sup>d</sup> ±0.56	86.96 <sup>ef</sup> ±0.36	78.45 <sup>c</sup> ±0.37	87.28 <sup>cd</sup> ±0.48		

(ต่อ)

% flocculating activity									
พอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	CG11	MK8	MK10	MK11	RV1	แซนแทน	อัลจินเนต		
5	51.14 <sup>c</sup> ±4.73	72.05 <sup>c</sup> ±0.38	82.22 <sup>c</sup> ±0.24	50.70 <sup>c</sup> ±1.61	81.98 <sup>b</sup> ±0.68	10.95 <sup>b</sup> ±1.75	84.66 <sup>ab</sup> ±0.42		
10	30.60 <sup>b</sup> ±1.24	48.15 <sup>b</sup> ±0.98	77.24 <sup>b</sup> ±0.25	29.09 <sup>b</sup> ±1.45	76.75 <sup>b</sup> ±0.13	0.35 <sup>a</sup> ±0.06	75.42 <sup>ab</sup> ±0.30		
15	11.33 <sup>a</sup> ±1.49	40.55 <sup>a</sup> ±0.35	67.07 <sup>a</sup> ±1.25	7.24 <sup>a</sup> ±0.76	70.55 <sup>a</sup> ±0.28	0.13 <sup>ab</sup> ±1.47	84.24 <sup>ab</sup> ±1.47		

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, ... ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.5.1.2 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ต่างกัน

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกคัดเลือกทั้ง 5 ไอโซเลต คือ CG11 MK8, MK10, MK11 และ RV1 ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 4.5.1.1 คือ 0.001 กรัมต่อลิตร มาทดสอบหาความสามารถในการจับกลุ่มเพื่อก่อตะกอนของดินขาวร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.10

จากการทดลองหาประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-12.5 กรัมต่อลิตร พบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มอยู่ในช่วง 0-87.56 % โดยแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสารละลายดินขาวที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรที่มีแคลเซียมคลอไรด์ คืออยู่ในช่วง 72.68-82.99 % และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ดังนั้นจึงเลือกเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมของแคลเซียมคลอไรด์ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแซนแทนและอัลจินตพบว่า ที่ความเข้มข้นเดียวกันนั้น พอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มใกล้เคียงกัน

**ตารางที่ 4.10** ค่าประสิทธิภาพในการช่วยแรงการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ที่ภาวะความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน

CaCl <sub>2</sub> (g/L)	% flocculating activity									
	ดินขาว + CaCl <sub>2</sub>	CG11	MK8	MK10	MK11	RV1	แซนแทน	อัลจิเนต		
0.1	0.03 <sup>a</sup> ±0.12	-0.01 <sup>a</sup> ±0.06	0.03 <sup>a</sup> ±0.03	-0.01 <sup>a</sup> ±0.06	0.09 <sup>a</sup> ±0.06	0.36 <sup>a</sup> ±0.11	0.16 <sup>a</sup> ±0.14	0.08 <sup>a</sup> ±0.11		
0.5	0.29 <sup>a</sup> ±0.02	0.16 <sup>a</sup> ±0.07	0.16 <sup>a</sup> ±0.07	0.09 <sup>a</sup> ±0.14	0.19 <sup>a</sup> ±0.08	0.69 <sup>a</sup> ±0.02	0.24 <sup>a</sup> ±0.07	0.11 <sup>a</sup> ±0.06		
1	0.31 <sup>a</sup> ±0.06	0.24 <sup>a</sup> ±0.07	0.35 <sup>a</sup> ±0.05	0.31 <sup>a</sup> ±0.05	0.40 <sup>a</sup> ±0.08	0.73 <sup>a</sup> ±0.10	0.37 <sup>a</sup> ±0.02	0.33 <sup>a</sup> ±0.06		
2.5	31.43 <sup>f</sup> ±0.79	20.45 <sup>cd</sup> ±1.82	19.46 <sup>bc</sup> ±2.65	14.97 <sup>b</sup> ±1.61	15.75 <sup>b</sup> ±0.74	21.41 <sup>cd</sup> ±1.72	24.76 <sup>de</sup> ±0.66	27.30 <sup>ef</sup> ±1.62		
5	71.46 <sup>s</sup> ±0.90	75.06 <sup>si</sup> ±1.32	72.68 <sup>s</sup> ±3.73	72.84 <sup>s</sup> ±2.24	79.38 <sup>hk</sup> ±0.65	74.72 <sup>gh</sup> ±2.55	75.43 <sup>si</sup> ±0.56	74.83 <sup>gh</sup> ±1.95		
7.5	78.31 <sup>hj</sup> ±0.74	82.99 <sup>io</sup> ±0.33	81.43 <sup>jm</sup> ±1.07	79.53 <sup>ik</sup> ±1.93	80.86 <sup>l</sup> ±2.85	82.27 <sup>hn</sup> ±2.27	81.47 <sup>im</sup> ±0.72	84.46 <sup>lo</sup>		
10	85.38 <sup>lo</sup> ±0.70	85.18 <sup>lo</sup> ±1.04	85.09 <sup>lo</sup> ±0.22	83.75 <sup>ko</sup> ±1.18	85.66 <sup>m-o</sup> ±0.78	86.31 <sup>no</sup> ±1.08	86.45 <sup>no</sup> ±0.40	86.27 <sup>no</sup> ±0.28		
12.5	86.22 <sup>no</sup> ±0.75	87.03 <sup>o</sup> ±0.28	86.07 <sup>no</sup> ±1.04	84.94 <sup>lo</sup> ±0.42	87.56 <sup>o</sup> ±0.75	86.59 <sup>no</sup> ±0.74	87.25 <sup>o</sup> ±0.98	86.31 <sup>no</sup> ±0.32		

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b,... ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์จากความเข้มข้น 95



#### 4.5.1.3 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกคัดเลือกทั้ง 5 ไอโซเลต คือ CG11 MK8, MK10, MK11 และ RV1 ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 4.5.1.1 และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.1.2 มาทดสอบหาความสามารถในการจับกลุ่มเพื่อก่อตะกอนของดินขาวภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.11

จากการทดลองหาประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน คือ 3, 5, 7, 9 และ 11 พบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มอยู่ในช่วง 64.05-90.39 % จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่ 7 อยู่ในช่วง 77.12-83.77% ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อเทียบกับสารละลายดินขาวที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ดังนั้นค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่ทำให้ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มเพิ่มขึ้นเท่ากับ 7 และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแซนแทนและอัลจินेटพบว่า ที่ภายใต้สภาวะเดียวกันนั้นมีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้มีความใกล้เคียงกัน

**ตารางที่ 4.11** ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ที่ภาวะค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกัน

pH	% flocculating activity									
	ดินขาว + CaCl <sub>2</sub>	CG11	MK8	MK10	MK11	RV1	แซนแทน	อัลจินเต		
3	84.11 <sup>lm</sup> ±0.10	82.91 <sup>hl</sup> ±1.13	84.92 <sup>jo</sup> ±0.86	83.78 <sup>il</sup> ±0.65	83.36 <sup>il</sup> ±0.81	82.02 <sup>sl</sup> ±1.66	85.37 <sup>io</sup> ±0.91	80.62 <sup>sk</sup> ±1.47		
5	70.50 <sup>bc</sup> ±0.68	74.38 <sup>bf</sup> ±1.19	68.65 <sup>ab</sup> ±0.97	64.05 <sup>a</sup> ±1.12	70.10 <sup>b</sup> ±0.86	73.16 <sup>be</sup> ±1.91	73.54 <sup>be</sup> ±0.96	72.34 <sup>bd</sup> ±1.11		
7	76.39 <sup>cs</sup> ±0.73	77.28 <sup>ds</sup> ±0.96	79.93 <sup>fi</sup> ±0.93	83.77 <sup>il</sup> ±0.73	77.12 <sup>ds</sup> ±0.91	78.55 <sup>ei</sup> ±1.07	82.44 <sup>hl</sup> ±0.99	76.65 <sup>fj</sup> ±1.63		
9	85.26 <sup>o</sup> ±1.04	86.83 <sup>lo</sup> ±0.62	84.52 <sup>jo</sup> ±0.62	83.85 <sup>il</sup> ±0.96	83.88 <sup>il</sup> ±1.29	87.34 <sup>lo</sup> ±0.43	85.88 <sup>ko</sup> ±1.13	83.99 <sup>lm</sup> ±1.39		
11	89.99 <sup>no</sup> ±0.99	90.00 <sup>no</sup> ±0.69	90.39 <sup>o</sup> ±0.29	90.31 <sup>o</sup> ±0.65	90.02 <sup>no</sup> ±0.28	90.31 <sup>o</sup> ±0.38	89.89 <sup>mo</sup> ±1.05	90.15 <sup>o</sup> ±0.60		

**หมายเหตุ :** ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b,... ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญของพอลิแซ็กคาไรด์ ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

#### 4.5.1.4 ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่อุณหภูมิที่ต่างกัน

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกคัดเลือกทั้ง 5 ไอโซเลต คือ CG11 MK8, , MK10, MK11 และ RV1 ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 4.5.1.1 และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.1.2 ภายใต้สภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.1.3 มาทดสอบหาความสามารถในการจับกลุ่มเพื่อก่อตะกอนของดินขาวภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิที่ต่างกัน ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.12

จากการทดลองหาประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตร ที่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 และอุณหภูมิที่ต่างกัน คือ 20, 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มอยู่ในช่วง 72.58-90.20 % จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าที่อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสอยู่ในช่วง 78.15-79.6 % ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อเทียบกับสารละลายดินขาวที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรที่มีแคลเซียมคลอไรด์ และเนื่องจากที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสมีความใกล้เคียงกันกับอุณหภูมิประเทศไทยปัจจุบัน ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มเพิ่มขึ้นคือ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแซนแทนและอัลจินตพบว่า ที่ภายใต้สภาวะเดียวกันนั้นมีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้มีความใกล้เคียงกัน

**ตารางที่ 4.12** ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ที่ภาวะที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	% flocculating activity									
	ดินขาว + 1%CaCl <sub>2</sub>	CG11	MK8	MK10	MK11	RV1	แซนแทน	อัลจิเนต		
20	74.51 <sup>a-c</sup> ±0.87	72.58 <sup>a</sup> ±0.94	77.52 <sup>c-e</sup> ±0.33	78.34 <sup>c-s</sup> ±1.17	76.48 <sup>a-d</sup> ±0.67	72.78 <sup>ab</sup> ±0.84	77.90 <sup>c-e</sup> ±0.78	74.48 <sup>a-c</sup> ±1.48		
40	76.14 <sup>a-d</sup> ±0.57	78.15 <sup>c-f</sup> ±0.22	78.17 <sup>c-f</sup> ±0.80	79.61 <sup>d-j</sup> ±0.58	78.61 <sup>c-h</sup> ±0.74	78.69 <sup>c-i</sup> ±0.36	78.63 <sup>c-h</sup> ±0.04	76.95 <sup>b-d</sup> ±1.08		
60	81.62 <sup>e-j</sup> ±0.51	82.59 <sup>h-j</sup> ±0.64	82.34 <sup>f-j</sup> ±0.44	82.91 <sup>j</sup> ±0.08	82.88 <sup>j</sup> ±0.50	83.50 <sup>j</sup> ±0.40	82.47 <sup>g</sup> ±0.61	83.43 <sup>j</sup> ±0.04		
80	88.22 <sup>k</sup> ±0.16	88.80 <sup>k</sup> ±0.63	89.10 <sup>k</sup> ±0.83	89.14 <sup>k</sup> ±0.09	90.20 <sup>k</sup> ±0.27	89.21 <sup>k</sup> ±0.24	89.12 <sup>k</sup> ±0.54	88.97 <sup>k</sup> ±0.62		

**หมายเหตุ :** ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b,... ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.5.2 การประยุกต์ใช้ในการบำบัดตัวอย่างน้ำเสียจากแหล่งน้ำจริง

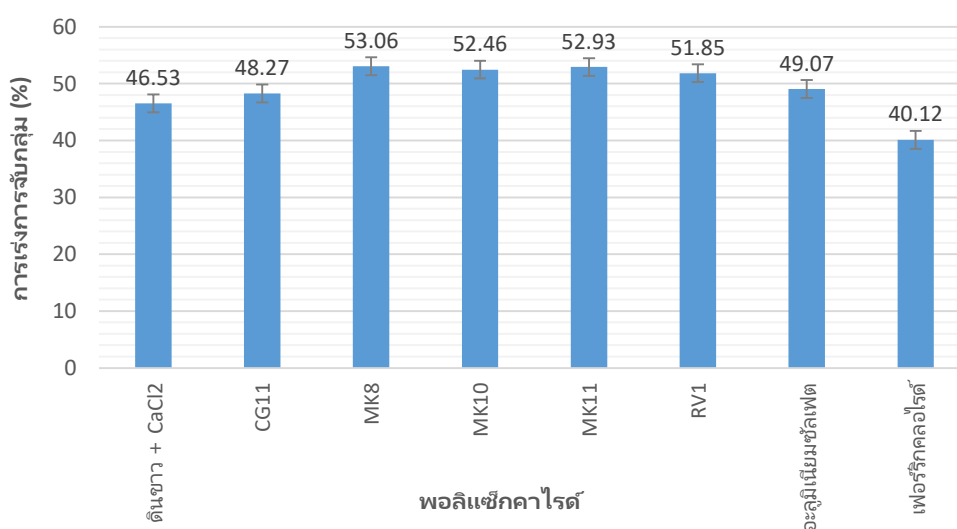
นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกคัดเลือกทั้ง 5 ไอโซเลต คือ CG11 MK8, , MK10, MK11 และ RV1 ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 4.5.1.1 และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.1.2 ภายใต้สภาวะความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.1.3 และ 4.5.1.4 ตามลำดับ มาทดสอบประสิทธิภาพในการจับกลุ่มก่อตะกอนในตัวอย่างน้ำเสียจริง ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.13 และรูปที่ 4.13-4.14

จากการทดลองหาประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดที่มีความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตร ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 5 ไอโซเลตร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 48.27-53.06% โดยพอลิแซ็กคาไรด์ MK8 มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นสูงสุด คือ 53.06% รองลงมาคือ MK10, MK11, RV1 และ CG11 อยู่ในช่วง 48.27-52.93% เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่มีแคลเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว พบว่าทั้ง 5 ชนิดมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทางเคมีที่ใช้ในการเร่งการจับกลุ่มในทางการค้าที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอะลูมิเนียมซัลเฟตและเฟอร์ริกคลอไรด์ที่ภายใต้สภาวะเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าประสิทธิภาพในการจับกลุ่มตกตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์และสารเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์ร่วมกับแคลเซียมสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

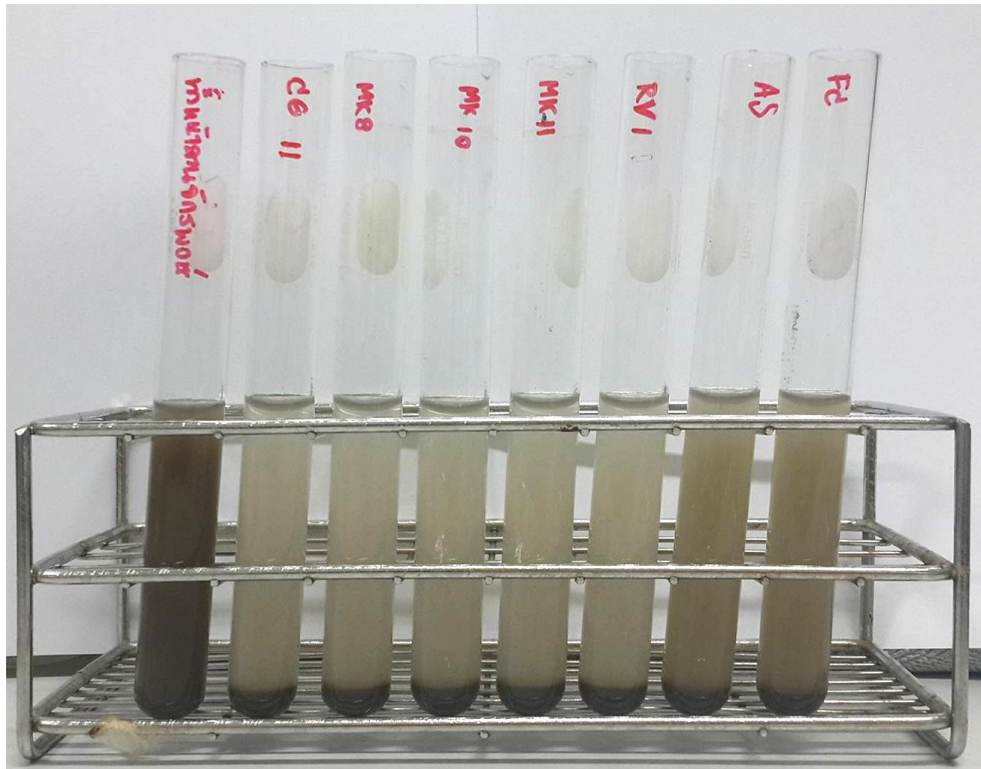
ตารางที่ 4.13 ค่าประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการจับกลุ่ม (% flocculating activity) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

พอลิเมอร์	% flocculating activity
น้ำเสีย + CaCl <sub>2</sub>	46.53 <sup>b</sup> ±0.92
CG11	48.27 <sup>bc</sup> ±0.15
MK8	53.06 <sup>f</sup> ±0.67
MK10	52.46 <sup>ef</sup> ±0.81
MK11	52.93 <sup>ef</sup> ±0.52
RV1	51.85 <sup>de</sup> ±0.98
อะลูมิเนียมซัลเฟต	49.07 <sup>cd</sup> ±1.01
เฟอร์ริกคลอไรด์	40.12 <sup>a</sup> ±0.74

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
a, b... ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าแตกต่างกันของข้อมูล  
อย่างมีนัยสำคัญของพอลิแซ็กคาไรด์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95



รูปที่ 4.5 ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดในแหล่งน้ำเสียภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทางการค้า อะลูมิเนียมซัลเฟต และเฟอร์ริกคลอไรด์



รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดในแหล่งน้ำเสียภายใน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทางการค้า อะลูมิเนียมซัลเฟต และเฟอร์ริก คลอไรด์

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

พอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด มีลักษณะสมบัติหลายแบบ จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายด้าน ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาทางแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำเสียที่คาดว่าจะมีการใช้น้ำตาลหรือแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น น้ำเสียจากตลาดสด โรงงานขนมจีนหมัก โรงงานผลิตไซรัป น้ำผึ้งและผลไม้กระป๋อง เป็นต้น จากการเก็บตัวอย่างน้ำเสียทั้งหมดจำนวน 35 ตัวอย่าง ซึ่งนำมาคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์บนอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Bromfield ร่วมกับวิธีของ Tallgren และคณะ (1999) ที่มีซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้แบคทีเรียทั้งหมด 30 ไอโซเลต จากการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ มี 5 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง โดยพบว่า *K. pneumoniae* RV1 มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด เท่ากับ 4.65 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *Klebsiella* sp. MK8, *K. pneumoniae* CG11, MK10 และ MK11 ซึ่งสามารถผลิตได้เท่ากับ 4.17, 3.11, 2.63 และ 2.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลายงานวิจัยพบว่า *Klebsiella* sp. สายพันธุ์ S11, *K. pneumoniae* สายพันธุ์ H12 และ *K. mobilis* มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณน้อย ซึ่งอยู่ในช่วง 0.973-3.0 กรัมต่อลิตร (Dermlim และคณะ, 1999; Nakata และ Kurane, 1999; Wang และคณะ, 2007) และเมื่อนำ 5 ไอโซเลตมาศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยา พบว่าไอโซเลตทั้ง 5 มีลักษณะเป็นเมือกเฝิ้มเหนียว ย้อมติดสีแกรมลบ และเมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต MK8 มีความคล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* sp. ส่วนไอโซเลต CG11, MK10, MK11 และ RV1 มีความคล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ TGH10, 211, AATZP และ Mardeille-P215 ตามลำดับ

แบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* spp. จัดอยู่ในแฟมิลี *Enterobacteriaceae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนิมีลักษณะกลม สีครีมและเป็นเมือกเฝิ้ม *K. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์หนึ่งที่ได้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต เช่น ในแหล่งน้ำทั่วไป น้ำเสีย ดิน ฟีซ มนุษย์และสัตว์ เป็นต้น โดยแบคทีเรียจะสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในรูปของแคปซูล (Podschun และ Ullmann, 1998) จากหลายงานวิจัยได้ศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย *Klebsiella* spp. ซึ่งพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีมอดูลแซ็กคาไรด์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ เป็นชนิดเฮเทอโรพอลิ



แซ็กคาไรด์ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จาก *Klebsiella* sp. MK8, *K. pneumoniae* RV1, , CG11, MK10 และ MK11 เป็นแบบชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมอนอแซ็กคาไรด์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ คือ กลูโคส กาแลคโทส ไซโลส ไรโบส แรมโนส และมอนอแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nakata และKurane (1999) พบว่า *K. pneumoniae* สายพันธุ์ H12 ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ด้วยกันหลายชนิด คือ กาแลคโทส กลูโคส กรดกาแลคทูโรนิก กรดกลูควิโรนิก และแมนโนส และงานวิจัยของ Nie และคณะ (2011) พบว่า *K. pneumoniae* สายพันธุ์ NY1 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นชนิดเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเช่นกัน ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส กาแลคโทส และควิโนโวส

จากการศึกษาคุณสมบัติโดยทั่วไปของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งทางกายภาพและทางเคมี พบว่าเมื่อพอลิแซ็กคาไรด์ต่างชนิดกัน คุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ก็แตกต่างกันด้วย ดังนั้นคุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการตัดสินใจเลือกใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆที่เหมาะสม จากการศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก *Klebsiella* sp. MK8, *K. pneumoniae* MK11 และ CG11 มีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูง คืออยู่ในช่วง 74.84-76.57 % (w/w) ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์จาก *K. pneumoniae* MK10 และ RV1 มีปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 43.69-51.93 % (w/w) และปริมาณโปรตีนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากทั้ง 5 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 0.34-1.53 % (w/w) พบว่ามีปริมาณโปรตีนปนเปื้อนอยู่เพียงเล็กน้อย โดยปริมาณโปรตีนแสดงถึงความบริสุทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดแยกได้

จากการศึกษาความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ในตัวทำละลายต่างๆที่อุณหภูมิห้อง พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถละลายน้ำได้ปานกลาง และไม่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ ที่ทดสอบ คือ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และก-บิวทานอล โดยเมื่อหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของพอลิแซ็กคาไรด์สร้างพันธะจับกับไฮโดรเจน (H<sup>+</sup>) ของน้ำ ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์สามารถละลายน้ำได้ แต่เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้หมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น จึงเกิดการตกผลึกของพอลิแซ็กคาไรด์ คุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายนั้นจึงขึ้นอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์ (James, 1986) นอกจากนี้เมื่อทดสอบชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า *Klebsiella* sp. MK8 และ *K. pneumoniae* MK11 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง ส่วน *K. pneumoniae* CG11, MK10 และ RV1 เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นลบ

คุณสมบัติในการเร่งการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นบทบาทสำคัญในการเร่งการจับกลุ่มของอนุภาคคอลลอยด์ จากการทดสอบคุณสมบัติการเร่งการจับกลุ่มเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากทั้ง 5 สายพันธุ์ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ 0.5 กรัมต่อ

ลิตร *K. pneumoniae* MK10 และ MK11 มีประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มร่วมกับแคลเซียมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งอยู่ในช่วง 85.27-86.70% ส่วน *Klebsiella* sp. MK8, *K. pneumoniae* CG11, และ RV1 มีประสิทธิภาพต่ำกว่าชุดควบคุมที่มีแคลเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว

ในการเกิดกระบวนการเร่งการจับกลุ่มที่ดื้อขึ้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่ม โดยภายใต้สภาวะที่มีความเหมาะสมจะมีบทบาทสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆที่สมบูรณ์ เช่น ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์หรือไบโอฟลิคกิวแลนต์ ความเข้มข้นของโลหะไอออนบวก ค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิ เป็นต้น (More และคณะ, 2014; Salehizadeh และ Yan, 2014) จากการทดลองหาประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มภายใต้สภาวะที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก *Klebsiella* sp. MK8, *K. pneumoniae* MK10, CG11 และ MK11 ที่ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มเพิ่มขึ้นจาก 83.94% เป็นอยู่ในช่วง 86.09-88.80% ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์จาก *K. pneumoniae* RV1 นั้นมีประสิทธิภาพเป็น 88.15% ที่ความเข้มข้น 0.005 กรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมที่ทำให้ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มสูง อยู่ในช่วง 0.001-0.005 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดเป็นพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ สามารถสร้างสะพานเชื่อมจับที่แข็งแรง ทำให้การใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำก็ให้ประสิทธิภาพการเร่งการจับกลุ่มที่ค่อนข้างสูง (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าหากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้มีความเข้มข้นต่ำเกินไป กลไกการสร้างสะพานเชื่อมจับในระบบอนุภาคคอลลอยด์จะเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ และหากใช้สูงเกินไป จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของประจุและทำให้ระบบคอลลอยด์ของสารละลายเกิดความไม่เสถียร ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มจึงต่ำลง (Li Fan และ Cheng, 2010; Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ไบโอฟลิเมอร์ช่วยในการจับกลุ่ม ซึ่งพบว่า มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง (89.7-96.9%) ที่ช่วงความเข้มข้นของไบโอฟลิเมอร์ต่ำ (0.5-3 mg/L) (Elkady และคณะ, 2011; Liu และคณะ, 2010; Yim และคณะ, 2007)

นอกจากความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์แล้ว ความเข้มข้นของไอออนบวกก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยไอออนบวกจะอยู่ในขั้นตอนการสร้างแกนตะกอนโดยการทำลายความเสถียรของอนุภาคคอลลอยด์ในระบบ ซึ่งประจุบวกจะไปสะเทินประจุลบที่ผิวอนุภาคคอลลอยด์ให้เป็นกลางเพื่อลดแรงผลักระหว่างอนุภาคและเพิ่มสัมผัสนในการเชื่อมจับกับพอลิแซ็กคาไรด์ให้ง่ายต่อการตกตะกอนได้เร็วขึ้น (He และคณะ, 2010; Wu และ Ye, 2007; Yim และคณะ, 2007) มีหลายงานวิจัยพบว่า การใส่แคลเซียมคลอไรด์ลงไปช่วยทำให้ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มได้สูง โดยความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์แตกต่างกันตามแต่ละชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ (Auhim และ Odaa, 2013; Gomaa, 2012;

Luvuyo และคณะ, 2013; Ntsaluba และคณะ, 2011) และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่แตกต่างกันนั้น พบว่าแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร ทำให้การจับกลุ่มร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 ชนิดมีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในช่วง 79.53-80.86 % แต่หากเติมไอออนบวกของแคลเซียมคลอไรด์ลงไปเกินความจำเป็น จะเป็นต้นเหตุของปัญหาในการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และยังเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในกระบวนการมากขึ้น (Aljuboori และคณะ, 2013) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 7.5 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น

ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเร่งการจับกลุ่ม (Yokoi และคณะ, 1995; Yokoi และคณะ, 2002) โดยจากการทดสอบประสิทธิภาพการจับกลุ่มภายใต้สภาวะที่ค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายดินขาวที่มีความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรที่มีแคลเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 ทำให้มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มเพิ่มสูงขึ้น เป็นอยู่ในช่วง 77.12-83.77% ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับกลุ่ม โดยพบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่ทำให้ประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์สูงนั้น ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์ด้วย (Kurane และคณะ, 1991; More และคณะ, 2014; Nakamura และคณะ, 1976; Wang และคณะ, 2013; Yokoi และคณะ, 1995)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการจับกลุ่มภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการจับกลุ่มกับสารละลายดินขาวที่มีความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรที่มีแคลเซียมคลอไรด์อย่างเดียวนั้น พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนั้น มีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มสูงขึ้นเป็นอยู่ในช่วง 78.15-79.61% ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่มีความใกล้เคียงกับอุณหภูมิของประเทศไทย จัดเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถใช้กันได้ทั่วไป สามารถบำบัดได้ตามธรรมชาติโดยไม่ต้องใช้แหล่งพลังงานความร้อนเพิ่มในกระบวนการบำบัด ทำให้ไม่สิ้นเปลืองพลังงานและค่าใช้จ่ายในกระบวนการ และนอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส โดยยังคงมีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มสูงขึ้นเล็กน้อยอยู่ในช่วง 88.80-90.20% จากหลายงานวิจัยมีรายงานว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถทนความร้อนได้สูงอยู่ในช่วง 80-100 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลานาน 15-25 นาที และยังคงมีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มลดลงเพียงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 87-90% ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมที่ใช้ความร้อนสูงใน

กระบวนการบำบัดได้ (Aljuboori และคณะ, 2013; Gao และคณะ, 2009; Ugbenyen และ Okoh, 2014; Wang และคณะ, 2013)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ในแหล่งน้ำเสียภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่า ในกระบวนการจับกลุ่มโดยใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นของ 0.001 กรัมต่อลิตร (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดต่างเป็นกลาง ณ อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเสียที่มีแคลเซียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว พบว่าประสิทธิภาพการจับกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากไอโซเลตทั้ง 5 มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 48.27-53.06% และเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีมาตรฐานที่ใช้ในทางการค้าภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า *Klebsiella* sp. MK8, *K. pneumoniae* MK11, MK10 และ RV1 มีประสิทธิภาพสูงกว่าเล็กน้อย

หลายงานวิจัยศึกษาการประยุกต์ใช้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตและสกัดแยกได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียโดยอาศัยกระบวนการเร่งการจับกลุ่มทางชีวภาพ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ถูกใช้กันอย่างกว้างขวางในการกำจัดอนุภาคคอลลอยด์และเพิ่มคุณภาพของน้ำ โดยนำมาใช้เป็นตัวช่วยเร่งการจับกลุ่มทดแทนพอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีในการบำบัดด้วย (Aljuboori และคณะ, 2013; Buthelezi และคณะ, 2009; Li และคณะ, 2009; Ma และคณะ, 2008; More และคณะ, 2014; Nontembiso และคณะ, 2011) เช่น Nie และคณะ (2011) ได้รายงานการผลิตไบโอพอลิเมอร์ที่ได้จาก *K. pneumoniae* สายพันธุ์ NY1 มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากเทศบาล ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุภาคคอลลอยด์ได้ 72% Auhim และ Odaa (2013) ได้ศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Azotobacter chroococcum* และใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากแม่น้ำ พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุภาคคอลลอยด์ได้สูง 81% นอกจากนี้ Ugbenyen และ Okoh (2014) ได้รายงานการใช้ไบโอพอลิเมอร์ที่ได้จาก *Cobetia* sp. และ *Bacillus* sp. ในการบำบัดน้ำเสียจากแม่น้ำ โรงงานผลิตเบียร์ และนม พบว่ามีประสิทธิภาพในการจับกลุ่มสูงถึง 99, 90.2 และ 78.8% และจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ไบโอพอลิเมอร์หรือพอลิแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียเป็นตัวช่วยเร่งการจับกลุ่มทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียได้เมื่อเทียบกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ทางเคมี โดยตะกอนฟล็อกที่เกิดขึ้นเมื่อนำไปกรองเพื่อกำจัดออกจากแหล่งน้ำแล้ว ยังสามารถนำมาหมუნเวียนใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ได้อีกด้วย

**ตารางที่ 5.1** การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นสารช่วยเร่งการจับกลุ่ม

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความเข้มข้น ของ EPS	ความเข้มข้น ของ CaCl <sub>2</sub>	pH	อุณหภูมิ (°C)	% FA	อ้างอิง
<i>K. pneumoniae</i> CG11	1 mg/L	7.5 g/L	5	40	78.15	
<i>Klebsiella</i> sp. MK8	1 mg/L	7.5 g/L	7	20-40	78.17	
<i>K. pneumoniae</i> MK10	1 mg/L	7.5 g/L	7	20-40	79.61	
<i>K. pneumoniae</i> MK11	1 mg/L	7.5 g/L	7	20-40	78.61	
<i>K. pneumoniae</i> RV1	5 mg/L	7.5 g/L	5-7	40	78.69	
<i>Aeromonas</i> sp. (N11)	1 mg/L	-	3-5	-	92.40	(Li และคณะ, 2007)
<i>Azotobacter</i> <i>indicus</i> (ATCC 9540)	10 mg/L	10 mg/L	5-10	-	92	(Patil และ คณะ, 2011)
<i>K. pneumonia</i> (MBF-5)	54.38 mg/L	-	3.32	26.14	98.5	(Zhao และ คณะ, 2013)
<i>Pseudoalteromona</i> <i>ssp.</i> SM9913	10 mg/L	4.55 mmol/L	5-8	5-15	49.3	(Li และคณะ, 2008)
<i>Staphylococcus</i> <i>cohnii</i> sp.	0.1 mg/L	10 mg/L	7	-	70.3	(Wong และ คณะ, 2012)

\* %FA = % flocculating agent

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษารูปแบบการเจริญและการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรีย *Klebsiella* sp. MK8, *K. pneumoniae* MK11, MK10 และ RV1 เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิต และหาระยะเวลาที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด

2. ควรศึกษาการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น โดยใช้สารอาหารที่เหมาะสม อาจใช้น้ำเสียหรือแหล่งคาร์บอนที่ราคาถูก เพื่อใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในระดับที่ขนาดใหญ่ขึ้น

รวมถึงการศึกษาคุณลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มเติม เช่น หาน้ำหนักมวโมเลกุล เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ด้านต่างๆ หรือต่อยอดใช้ในอุตสาหกรรมได้

3. คว้าศึกษาด้านพันธุกรรมของเชื้อ *K. pneumoniae* เพื่อตัดต่อยีนหรือลำดับเบสที่ชักนำก่อให้เกิดโรคหรือไม่ให้ทำงานได้ และพัฒนาปรับปรุงยีนให้มีการกลายพันธุ์เพื่อใช้เพิ่มผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้



## รายการอ้างอิง

- Abou-taleb, K. A., Abdel-Monem, M. O., Yassin, M. H. & Draz, A. A. (2015). Production, purification and characterization of levan polymer from *Bacillus lentus* V8 strain. *British Microbiology Research Journal*. **5**, 22-32.
- Aljuboori, A. H. R., Idris, A., Abdullah, N. & Mohamad, R. (2013). Production and characterization of a bioflocculant produced by *Aspergillus flavus*. *Bioresource Technology*. **127**, 489-493.
- Andhare, P., Chauhan, K., Dave, M. & Pathak, H. (2014). Microbial exopolysaccharides: Advances in applications and future prospects. *Microbial Biotechnology*. 1-25.
- Auhim, H. S. & Odaa, N. H. (2013). Optimization of flocculation conditions of exopolysaccharide bioflocculant from *Azotobacter chroococcum* and its potential for river water treatment. *Journal of Microbiology Biotechnology Research*. **3**, 93-99.
- Banks, W. A., Niehoff, M. L., Drago, D. & Zatta, P. (2006). Aluminum complexing enhances amyloid beta protein penetration of blood-brain barrier. *Brain Research*. **1116**, 215-221.
- Banks, W. A., Niehoff, M. L., Drago, D. & Zatta, P. (2006). Aluminum complexing enhances amyloid  $\beta$  protein penetration of blood-brain barrier. *Brain Research*. **1116**, 215-221.
- Bluhm, T. L., Deslandes, Y., Marchessault, R. H., Pérez, S. & Rinaudo, M. (1982). Solid-state and solution conformation of scleroglucan. *Carbohydrate Research*. **100**, 117-130.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.
- Brostow, W., Lobland, H. H., Pal, S. & Singh, R. P. (2009). Polymeric flocculants for wastewater and industrial effluent treatment. *Journal of Materials Education*. **31**, 157-166.

- Buthelezi, S., Olaniran, A. & Pillay, B. (2009). Turbidity and microbial load removal from river water using bioflocculants from indigenous bacteria isolated from wastewater in South Africa. *African Journal of Biotechnology*. **8(14)**, 3261-3266.
- Campbell, A. (2002). The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **17 Suppl 2**, 17-20.
- Clementi, F. (1997). Alginate production by *Azotobacter Vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*. **17**, 327-361.
- Collins, E. A., Bares, J. & Billmeyer, F. W. (1973). Experiments in polymer science. Vol. 12. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Cui, S. W. (2005). Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications. United states of America: CRC Press.
- Czaczyk, K. & Myszka, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*. **16**, 799-806.
- Dermlim, W., Prasertsan, P. & Doelle, H. (1999). Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **52**, 698-703.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C. & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*. **87**, 951-962.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. **28**, 350-356.
- Elkady, M., Farag, S., Zaki, S., Abu-Elreesh, G. & Abd-El-Haleem, D. (2011). *Bacillus mojavensis* strain 32A, a bioflocculant-producing bacterium isolated from an Egyptian salt production pond. *Bioresource Technology*. **102**, 8143-8151.
- Freitas, F., Alves, V. D. & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*. **29**, 388-398.



- Gao, Q., Zhu, X. H., Mu, J., Zhang, Y. & Dong, X. W. (2009). Using ruditapes philippinarum conglutination mud to produce bioflocculant and its applications in wastewater treatment. *Bioresource Technology*. **100**, 4996-5001.
- Gniewosz, M. & Synowiec, A. (2011). Antibacterial activity of pullulan films containing thymol. *Flavour and Fragrance Journal*. **26**, 389-395.
- Gomaa, E. Z. (2012). Production and characteristics of a heavy metals removing bioflocculant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Polish Journal of Microbiology*. **61**, 281-289.
- Gong, W. X. *et al.* (2008). Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technology*. **99**, 4668-4674.
- He, J. *et al.* (2010). Characteristics and flocculating mechanism of a novel bioflocculant HBF-3 produced by deep-sea bacterium mutant *Halomonas* sp. V3a'. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **26**, 1135-1141.
- Higgins, M. J. & Novak, J. T. (1997). Dewatering and settling of activated sludges: The case for using cation analysis. *Water Environment Research*. **69**, 225-232.
- Ioan, C. E., Aberle, T. & Burchard, W. (2000). Structure properties of dextran. 2. Dilute solution. *Macromolecules*. **33**, 5730-5739.
- James, K. C. (1986). *Drugs and the pharmaceutical sciences : Solubility and related properties*. Vol. 28. New York: Marcel Dekker.
- Ji, B. *et al.* (2010). Flocculation properties of a bioflocculant produced by *Bacillus licheniformis*. *Water Science and Technology*. **62**, 1907-1913.
- Kambourova, M. *et al.* (2009). Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydrate Polymers*. **77**, 338-343.
- Khan, T., Park, J. K. & Kwon, J. H. (2007). Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **24**, 816-826.
- Kumar, A. S., Mody, K. & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides-a perception. *Journal of Basic Microbiology*. **47**, 103-117.
- Kumbar, S., Laurencin, C. & Deng, M. (2014). *Natural and synthetic biomedical polymers*. Oxford: Elsevier.

- Kurane, R., Hatakeyama, S. & Tsugeno, H. (1991). Correlation between flocculant production and morphological changes in *Rhodococcus erythropolis* S-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **72**, 498-500.
- Kurane, R., Takeda, K. & Suzuki, T. (1986). Screening for and characteristics of microbial flocculants. *Agricultural and Biological Chemistry*. **50**, 2301-2307.
- Li Fan, L. & Cheng, W. (2010). Characteristics and culture conditions of a bioflocculant produced by *Penicillium* sp. *Biomedical and Environmental Sciences*. **23**, 213-218.
- Li, Q., Liu, H. L., Qi, Q. S., Wang, F. S. & Zhang, Y. Z. (2010). Isolation and characterization of temperature and alkaline stable bioflocculant from *Agrobacterium* sp. M-503. *New Biotechnology*. **27**, 789-794.
- Li, W., Zhou, W., Zhang, Y., Wang, J. & Zhu, X. (2008). Flocculation behavior and mechanism of an exopolysaccharide from the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Bioresource Technology*. **99**, 6893-6899.
- Li, X. *et al.* (2007). Screening and characterization of a bioflocculant produced by *Aeromonas* sp. *Biomedical and environmental sciences*. **20**, 274.
- Li, Z. *et al.* (2009). Production of a novel bioflocculant by *Bacillus licheniformis* X14 and its application to low temperature drinking water treatment. *Bioresource Technology*. **100**, 3650-3656.
- Lindsay, S. (1991). High performance liquid chromatography: Analytical chemistry by open learning. Singapore: Johan Wiley and Sons.
- Liss, S. N., Leppard, G. G., Milligan, T. G. & Droppo, I. G. (2005). Flocculation in natural and engineered environmental systems. Boca Raton: CRC Press.
- Liu, W., Wang, K., Li, B., Yuan, H. & Yang, J. (2010). Production and characterization of an intracellular bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 cultured in low nutrition medium. *Bioresource Technology*. **101**, 1044-1048.
- Luvuyo, N., Nwodo, U. U., Mabinya, L. V. & Okoh, A. I. (2013). Studies on bioflocculant production by a mixed culture of *Methylobacterium* sp. Obi and *Actinobacterium* sp. Mayor. *BMC Biotechnology*. **13**, 1-7.

- Ma, F., Zheng, L. & Chi, Y. (2008). Applications of biological flocculants (BFs) for coagulation treatment in water purification: turbidity elimination. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. **22**, 321-326.
- Manandhar, S., Vidhate, S. & D'Souza, N. (2009). Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers. *Carbohydrate Polymers*. **78**, 794-798.
- More, T., Yan, S., John, R., Tyagi, R. & Surampalli, R. (2012). Biochemical diversity of the bacterial strains and their biopolymer producing capabilities in wastewater sludge. *Bioresource Technology*. **121**, 304-311.
- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D. & Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*. **144**, 1-25.
- Moss, N. & Dymond, B. (1978). Flocculation: theory and application. *Mine and Quarry Journal*. **7**, 57-61.
- Nakamura, J., Miyashiro, S. & Hirose, Y. (1976). Conditions for production of microbial cell flocculant by *Aspergillus sojae* AJ7002. *Agricultural and Biological Chemistry*. **40**, 1341-1347.
- Nakamura, J., Miyashiro, S. & Hirose, Y. (1976). Screening, isolation, and some properties of microbial cell flocculants. *Agricultural and Biological Chemistry*. **40**, 377-383.
- Nakata, K. & Kurane, R. (1999). Production of an extracellular polysaccharide bioflocculant by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **63**, 2064-2068.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2013). CourseSmart International E-Book for Principles of Biochemistry. Palgrave Macmillan.
- Nie, M. *et al.* (2011). Production of a novel bioflocculant MNXY1 by *Klebsiella pneumoniae* strain NY1 and application in precipitation of cyanobacteria and municipal wastewater treatment. *Journal of Applied Microbiology*. **111**, 547-558.
- Noda, S. *et al.* (2008). Molecular structures of gellan gum imaged with atomic force microscopy in relation to the rheological behavior in aqueous systems. 1. Gellan gum with various acyl contents in the presence and absence of potassium. *Food Hydrocolloids*. **22**, 1148-1159.

- Nontembiso, P., Sekelwa, C., Leonard, M. V. & Anthony, O. I. (2011). Assessment of bioflocculant production by *Bacillus* sp. Gilbert, a marine bacterium isolated from the bottom sediment of Algoa Bay. *Marine Drugs*. **9**, 1232-1242.
- Ntsaluba, L., Agundiade, O., Mabinya, L. & Okoh, A. (2011). Studies on bioflocculant production by *Methylobacterium* sp. Obi isolated from a freshwater environment in South Africa. *African Journal of Microbiology Research*. **5**, 4533-4540.
- Palaniraj, A. & Jayaraman, V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*. **106**, 1-12.
- Patil, S. V. *et al.* (2011). Studies on characterization of bioflocculant exopolysaccharide of *Azotobacter indicus* and its potential for wastewater treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **163**, 463-472.
- Pena, C., Millan, M. & Galindo, E. (2008). Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks. *Process Biochemistry*. **43**, 775-778.
- Podschun, R. & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. **11**, 589-603.
- Polizzi, S. *et al.* (2002). Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*. **23**, 761-774.
- Polizzi, S. *et al.* (2002). Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and alzheimer's disease. *NeuroToxicology*. **23**, 761-774.
- Rehm, B. H. D. (2009). In microbial production of biopolymers and polymer precursors: Applications and perspectives. United Kingdom: Caister Academic Press.
- Rizk, S. *et al.* (1994). Physico-chemical characterization and tableting properties of scleroglucan. *International Journal of Pharmaceutics*. **112**, 125-131.
- Ruden, C. (2004). Acrylamide and cancer risk- expert risk assessments and the public debate. *Food and Chemical Toxicology*. **42**, 335-349.
- Salehizadeh, H. & Shojaosadati, S. A. (2001). Extracellular biopolymeric flocculants. Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. **19**, 371-385.

- Salehizadeh, H. & Shojaosadati, S. A. (2001). Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology advances*. **19**, 371-385.
- Salehizadeh, H. & Yan, N. (2014). Recent advances in extracellular biopolymer flocculants. *Biotechnology Advances*. **32**, 1506-1522.
- Shih, I. L., Van, Y. T., Yeh, L. C., Lin, H. G. & Chang, Y. N. (2001). Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresource Technology*. **78**, 267-272.
- Shimofuruya, H. *et al.* (1996). The production of flocculating substance (s) by *Streptomyces griseus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **60**, 498-500.
- Silbir, S., Dağbağlı, S., Yegin, S., Baysal, T. & Goksungur, Y. (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydrate Polymers*. **99**, 454-461.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2007). Principles of instrumental analysis. 6 edn, United States of America: David Harris.
- Smidsrod, O., Moe, S. & Moe, S. T. (2008). Biopolymer chemistry. 1 edn, Trondheim: Tapir Academic Press.
- Subramanian, S. B., Yan, S., Tyagi, R. & Surampalli, R. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: Isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering. *Water Research*. **44**, 2253-2266.
- Takagi, H. & Kadowaki, K. (1985). Flocculant production by *Paecilomyces* sp. taxonomic studies and culture conditions for production. *Agricultural and Biological Chemistry*. **49**, 3151-3157.
- Takeda, M., Koizumi, J. I., Matsuoka, H. & Hikuma, M. (1992). Factors affecting the activity of a protein bioflocculant produced by *Nocardia amarae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **74**, 408-409.
- Tallgren, A. H. *et al.* (1999). Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 862-864.

- Tenney, M. W. & Verhoff, F. H. (1973). Chemical and autoflocculation of microorganisms in biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. **15**, 1045-1073.
- Toeda, K. & Kurane, R. (1991). Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. *Agricultural and Biological Chemistry*. **55**, 2793-2799.
- Ueda, S., Momii, F., Osajima, K. & Ito, K. (1981). Extracellular polysaccharide produced by strain No. 626 of *Aeromonas hydrophila*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **45**, 1977-1981.
- Ugbenyen, A. & Okoh, A. (2014). Characteristics of a bioflocculant produced by a consortium of *Cobetia* and *Bacillus* species and its application in the treatment of wastewaters. *Water SA*. **40**, 139-144.
- Venugopal, V. (2011). Marine Polysaccharide: Food Applications.
- Venugopal, V. (2011). Marine polysaccharides: Food applications. United States of America: CRC Press.
- Verwey, E. J. W. & Overbeek, J. T. G. (1948). Theory of the stability of lyophobic colloids. Amsterdam: Elsevier.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*. **14**, 2535-2554.
- Wang, L., Ma, F., Lee, D. J., Wang, A. & Ren, N. (2013). Bioflocculants from hydrolysates of corn stover using isolated strain *Ochrobactium ciceri* W2. *Bioresource Technology*. **145**, 259-263.
- Wang, S. G. *et al.* (2007). Production of a novel bioflocculant by culture of *Klebsiella mobilis* using dairy wastewater. *Biochemical Engineering Journal*. **36**, 81-86.
- Wang, X. *et al.* (2006). Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium. *Applied Environmental Microbiology*. **72**, 3367-3374.
- Wang, Z. *et al.* (2011). Optimization of the production of exopolysaccharides by *Bacillus thuringiensis* 27 in sand biological soil crusts and its bioflocculant activity. *African Journal of Microbiology Research*. **5**, 2359-2366.

- Wong, Y. S., Ong, S. A., Teng, T. T., Aminah, L. N. & Kumaran, K. (2012). Production of bioflocculant by *Staphylococcus cohnii* ssp. from palm oil mill effluent (POME). *Water, Air, & Soil Pollution*. **223**, 3775-3781.
- Wu, J., Shi, S., Wang, H. & Wang, S. (2016). Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review. *Carbohydrate Polymers*. **144**, 474-494.
- Wu, J. Y. & Ye, H. F. (2007). Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. *Process Biochemistry*. **42**, 1114-1123.
- Yang, Y. *et al.* (2015). Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut. *Carbohydrate Polymers*. **133**, 365-372.
- Yim, J. H., Kim, S. J., Ahn, S. H. & Lee, H. K. (2007). Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. *Bioresource Technology*. **98**, 361-367.
- Yokoi, H., Natsuda, O., Hirose, J., Hayashi, S. & Takasaki, Y. (1995). Characteristics of a biopolymer flocculant produced by *Bacillus* sp. PY-90. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **79**, 378-380.
- Yokoi, H., Obita, T., Hirose, J., Hayashi, S. & Takasaki, Y. (2002). Flocculation properties of pectin in various suspensions. *Bioresource Technology*. **84**, 287-290.
- Zhao, H., Liu, H. & Zhou, J. (2013). Characterization of a bioflocculant MBF-5 by *Klebsiella pneumoniae* and its application in *Acanthamoeba* cysts removal. *Bioresource Technology*. **137**, 226-232.
- มันสิน ตัณฑุลเวศม์. (2542). วิศวกรรมสารประปา. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.





**ภาคผนวก ก**  
**สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสูตรดัดแปลงจากอาหารสูตรของ Bromfield รวมกับวิธีของ (Tallgren และคณะ, 1999)**

ซูโครส (sucrose)	40 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	9.0 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	3.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.0 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [ $(NH_4)_2SO_4$ ]	1.0 กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0 กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**2. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสูตรดัดแปลงจากอาหารสูตรของ Bromfield รวมกับวิธีของ (Tallgren และคณะ, 1999)**

ซูโครส (sucrose)	40 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	9.0 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	3.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.0 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [ $(NH_4)_2SO_4$ ]	1.0 กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0 ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**3. อาหาร Nutrient broth**

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0 กรัม
เพปโตน (peptone)	5.0 กรัม

วุ้นผง (agar)	15.0 กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0 ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	6.8
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที	



**ภาคผนวก ข**  
**สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

**1. สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร**

ฟีนอล	5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

**2. สารละลายคูแมสซีบลู**

ชั่งสารละลายคูแมสซีบลู จี 250 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดฟอสฟอริก 85% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

**3. สารละลายกรดซัลฟูริก (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ความเข้มข้น 1 โมลาร์**

กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

**4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 10 โมลาร์**

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

**5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล**

โซเดียมคลอไรด์	0.004 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

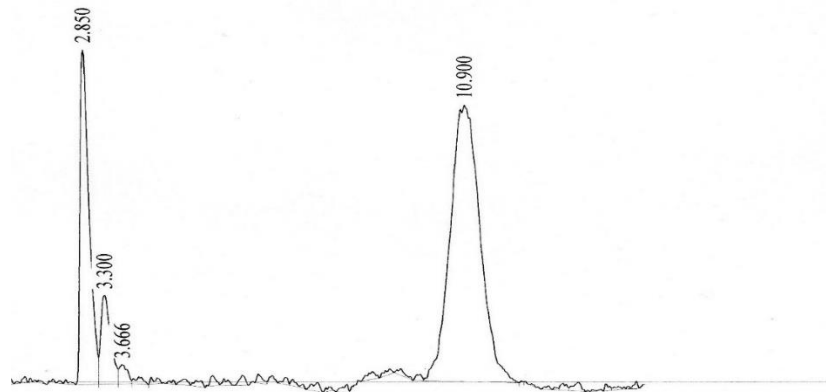
**6. สารละลายซีทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (cetylpyridiniumchloride, CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์**

สารละลายซีทิลไพริดีเนียมคลอไรด์	10 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

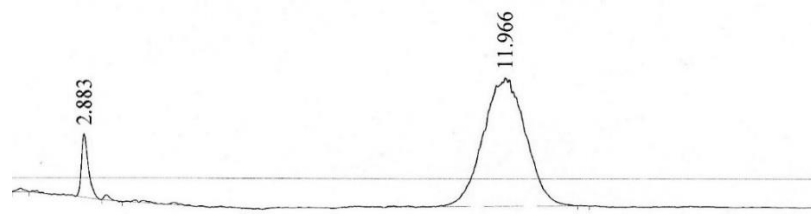
## ภาคผนวก ค

## โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมอนอแซ็กคาไรด์โดยวิธี HPLC

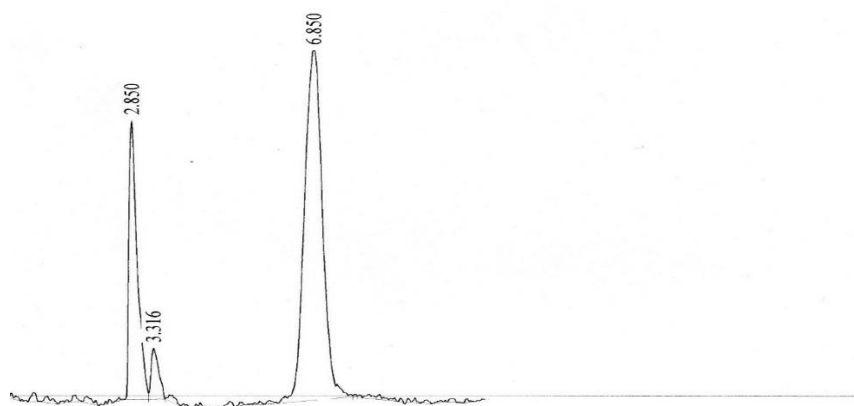
## 1. โครมาโทแกรมสารมาตรฐานกลูโคส



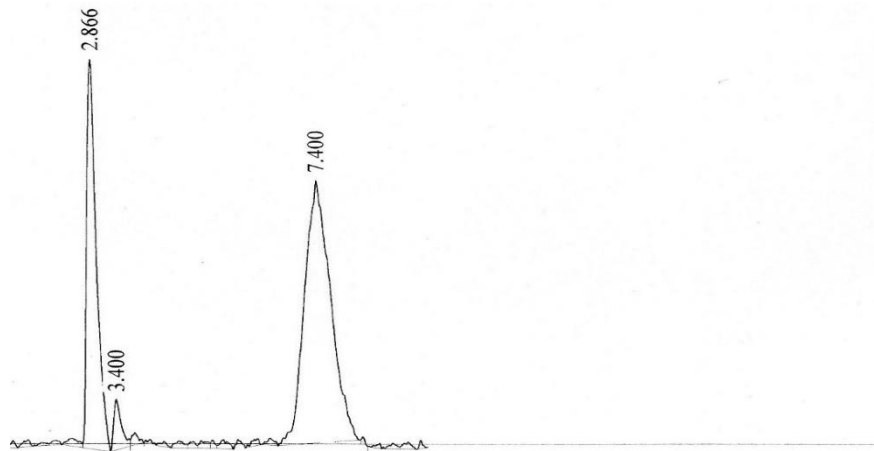
## 2. โครมาโทแกรมสารมาตรฐานกาแลคโทส



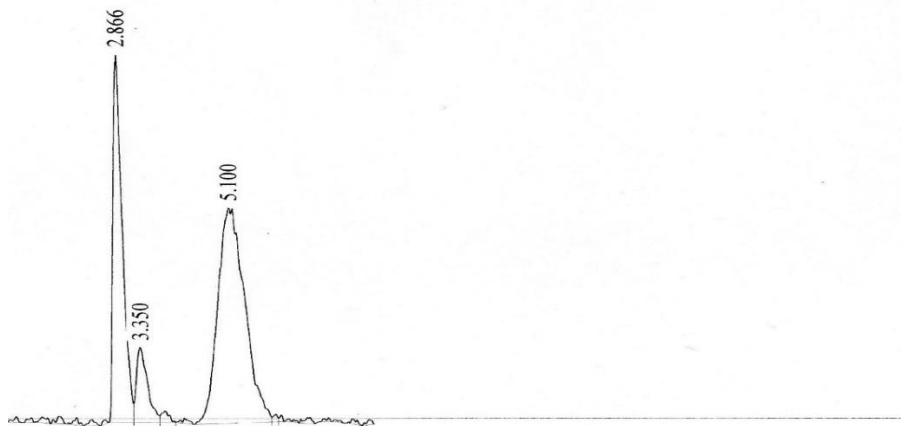
## 3. โครมาโทแกรมสารมาตรฐานไซโลส



## 4. โครมาโทแกรมสารมาตรฐานไรโบส

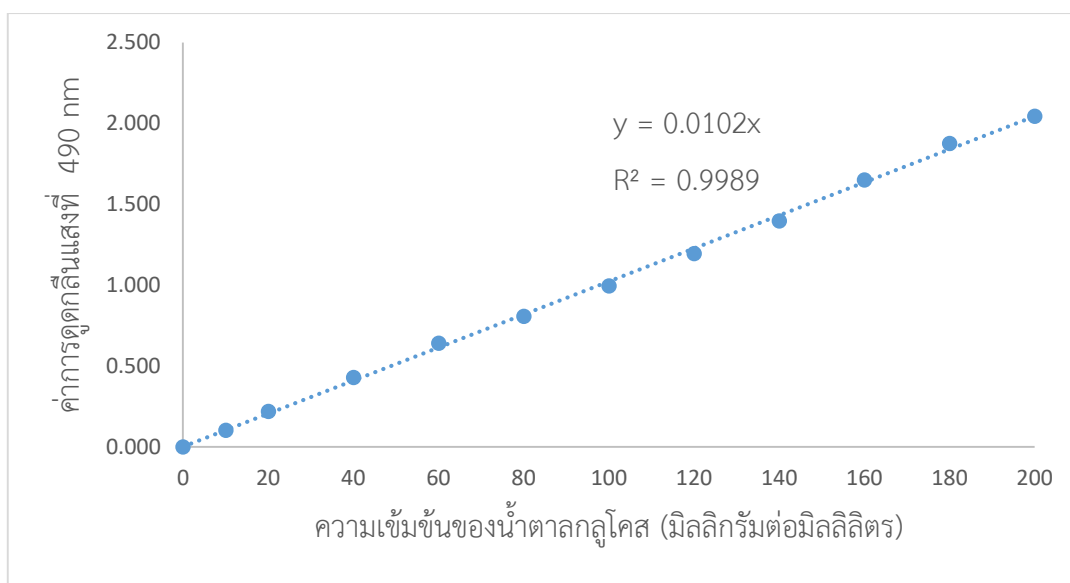


## 5. โครมาโทแกรมสารมาตรฐานแรมโนส

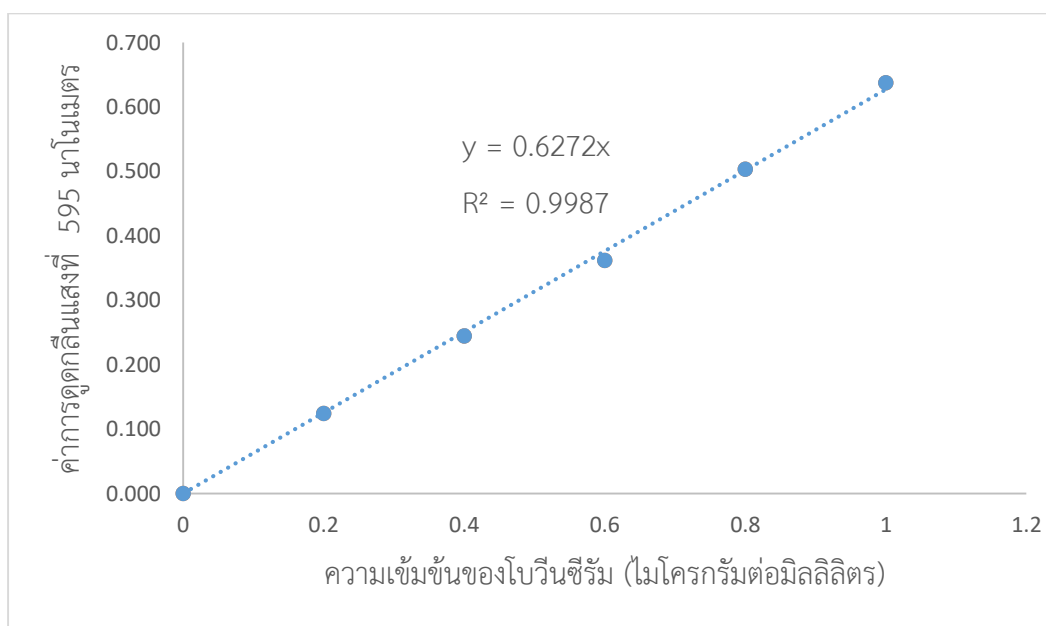


ภาคผนวก ง  
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)



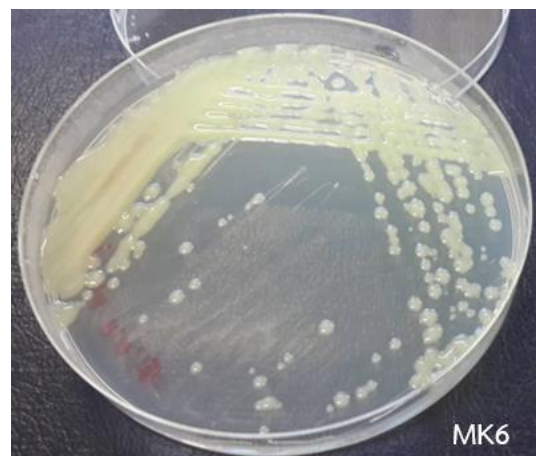
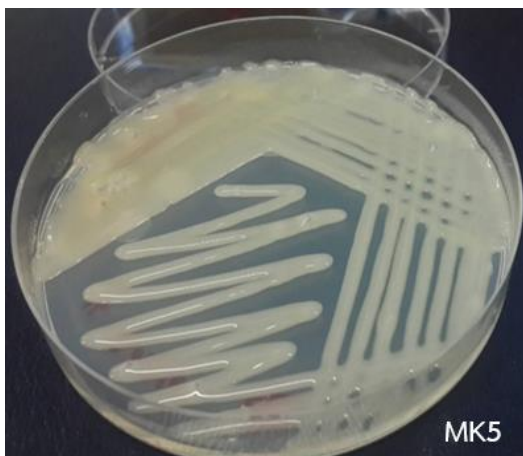
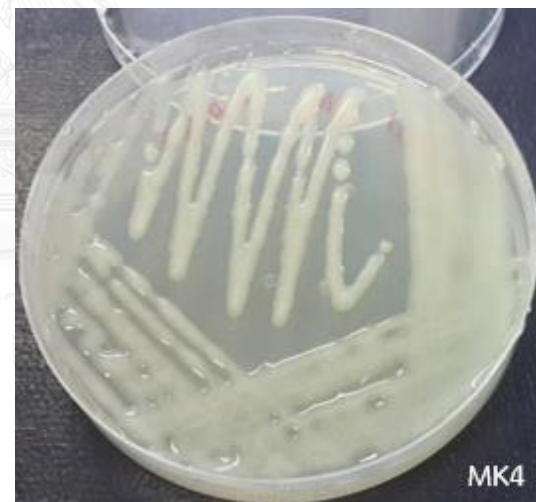
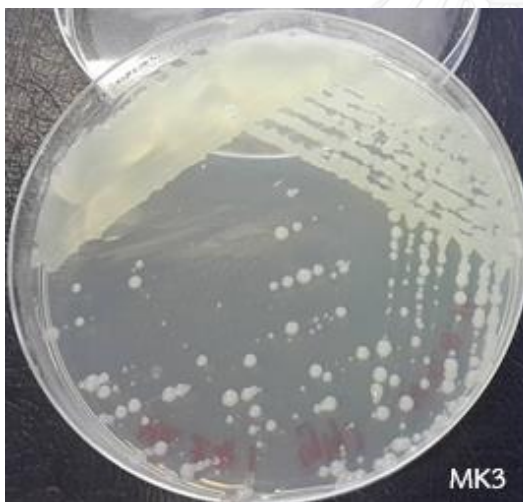
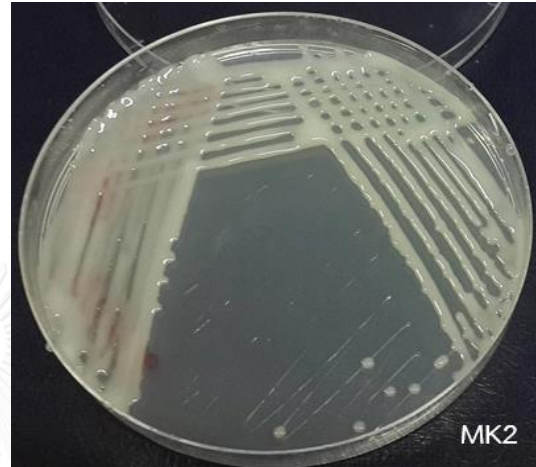
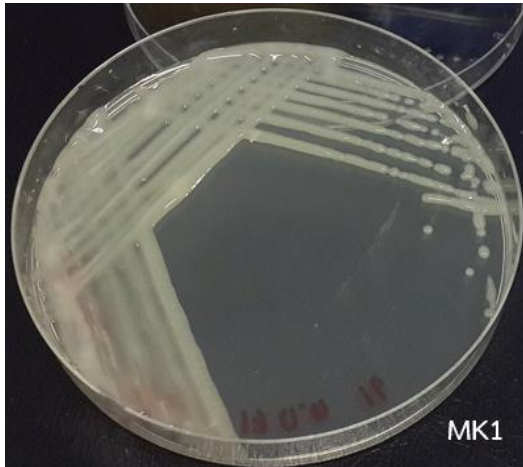
2. กราฟมาตรฐานโปรตีนวิเคราะห์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976)

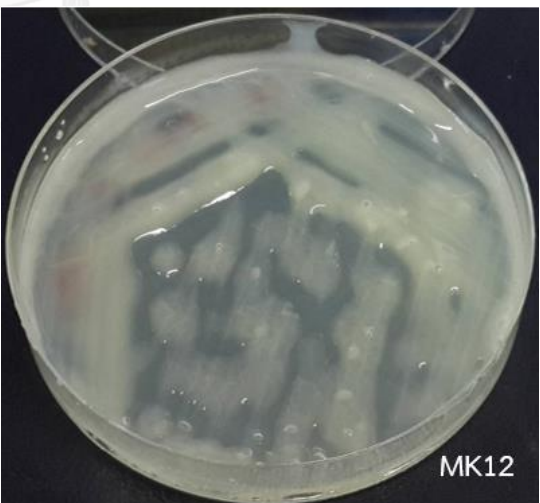
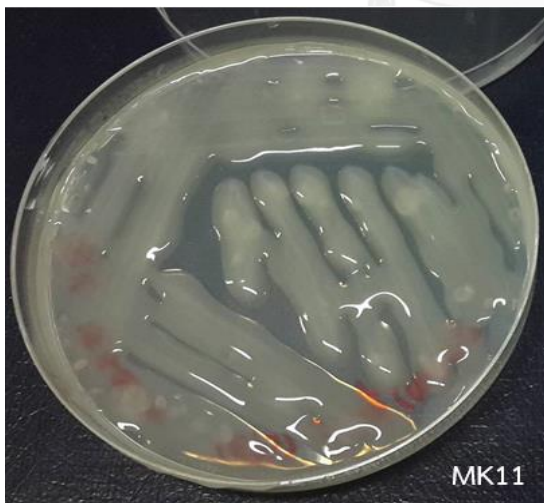
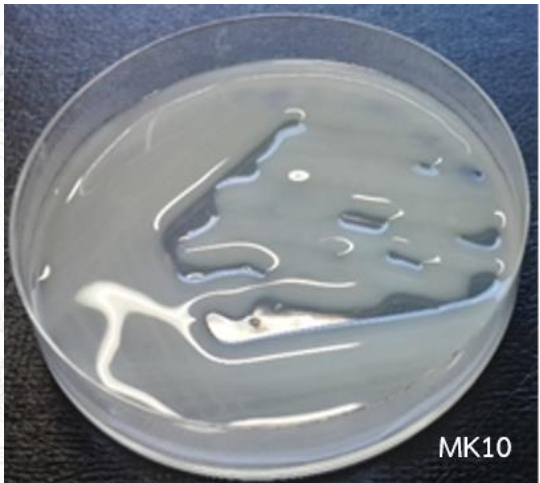
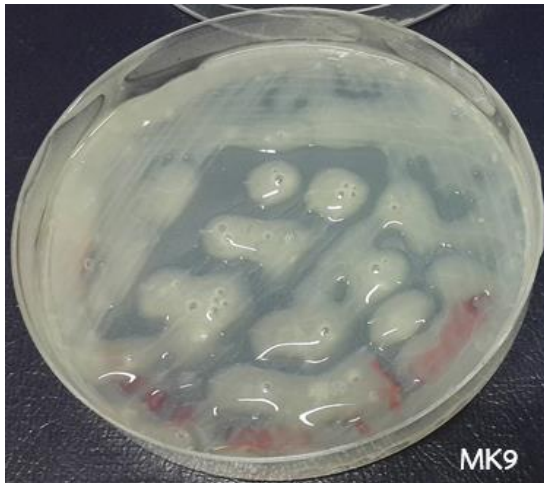
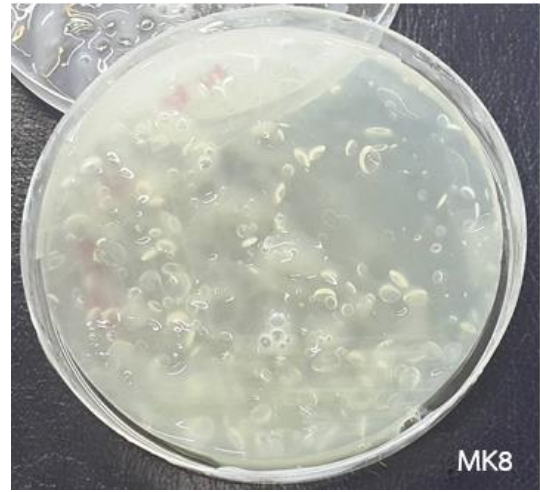
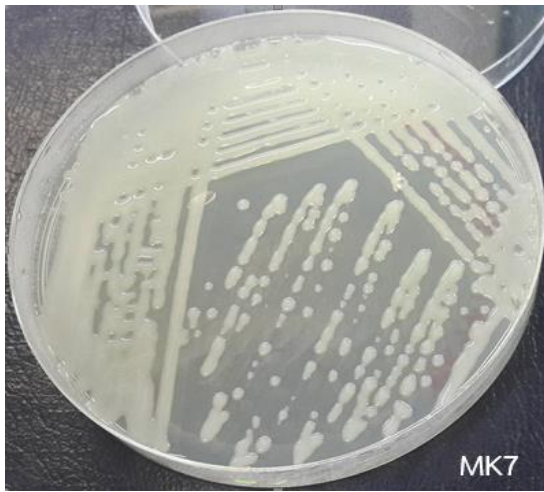


## ภาคผนวก จ

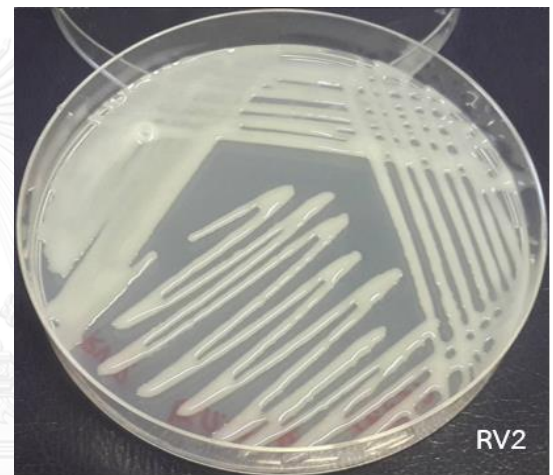
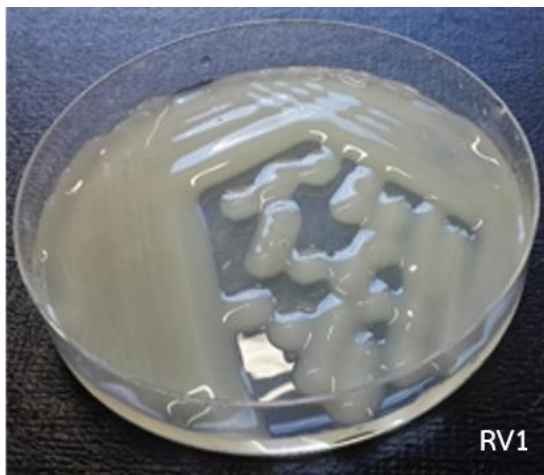
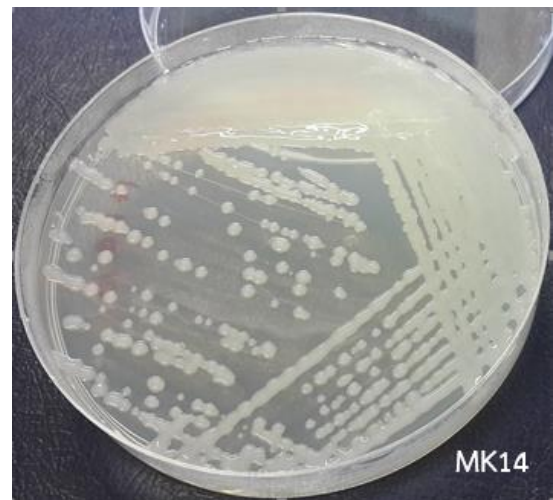
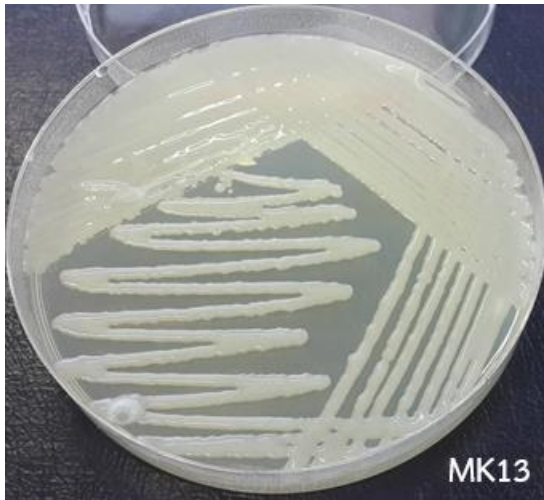
## ข้อมูล

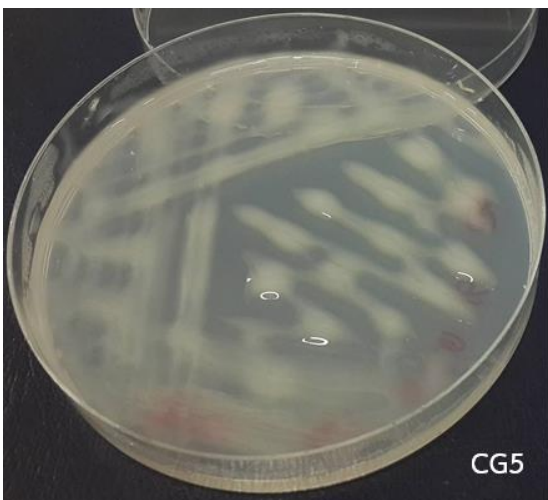
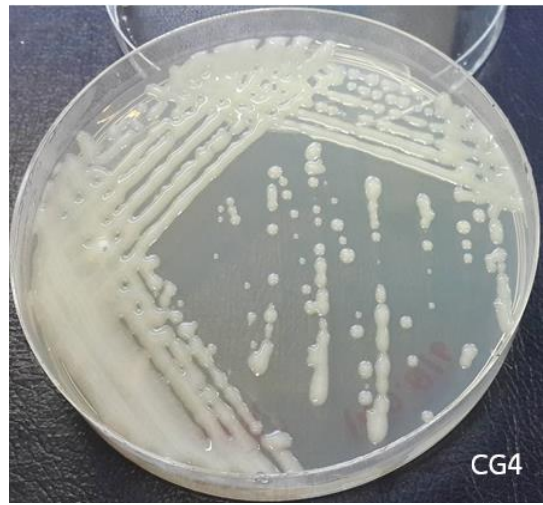
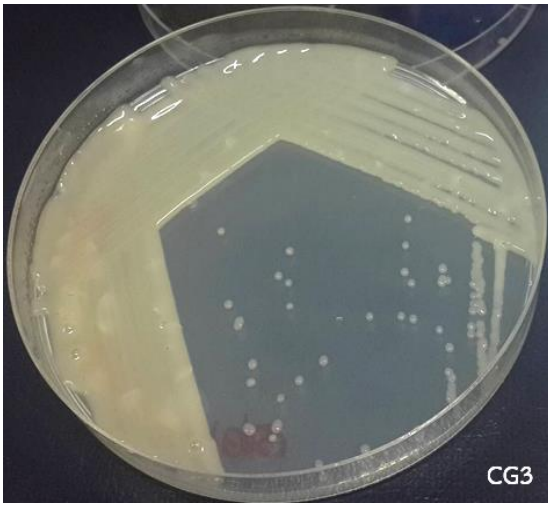
## 1. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 30 ไอโซเลตบนอาหารตามสูตรของ Bromfield

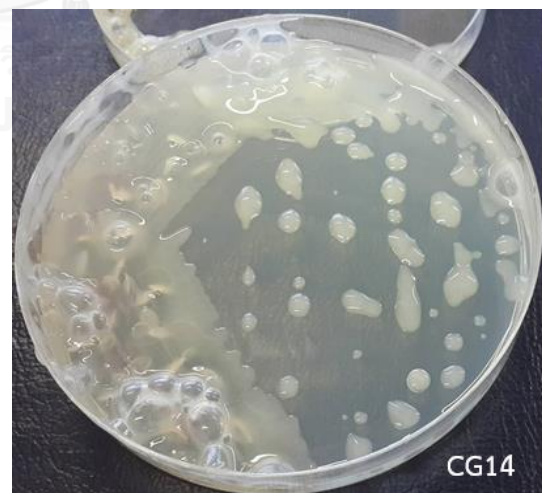
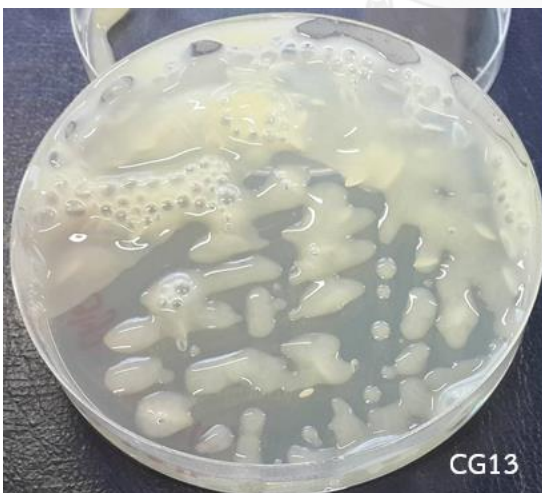
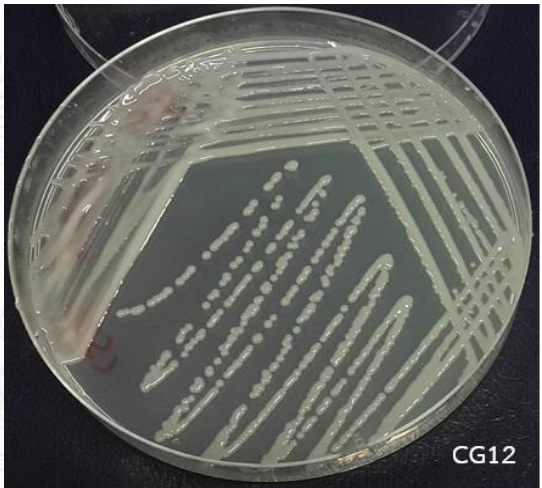
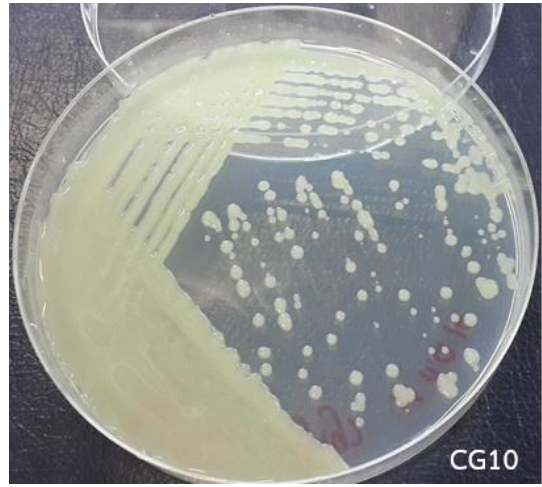
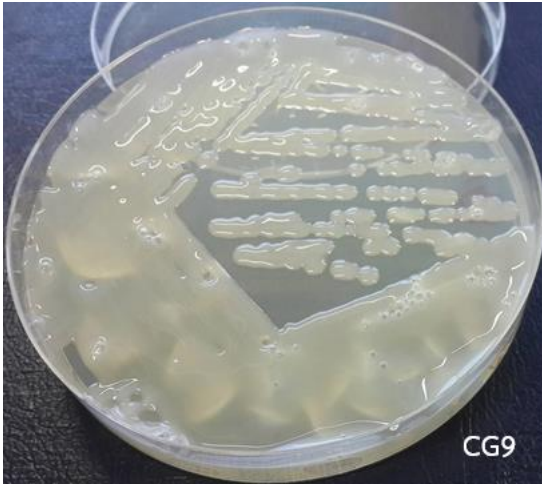












2. น้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 30 ไอโซเลตในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

ไอโซเลต	น้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์หน่วยกรัมต่อลิตร (3 ซ้ำ)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
MK1	0.0332	0.0376	0.0310	0.0339
MK2	0.0176	0.0183	0.0105	0.0155
MK3	0.0873	0.0836	0.1141	0.0950
MK4	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
MK5	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
MK6	0.0442	0.0541	0.0473	0.0485
MK7	0.0055	0.0071	0.0060	0.0062
MK8	0.1636	0.1612	0.3011	0.2086
MK9	0.0691	0.0925	0.1239	0.0952
MK10	0.1287	0.1187	0.1471	0.1315
MK11	0.1095	0.1101	0.1217	0.1138
MK12	0.0044	0.0041	0.0051	0.0045
MK13	0.0599	0.0516	0.0631	0.0582
MK14	<0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
RV1	0.2520	0.2204	0.2250	0.2325
RV2	0.0329	0.0224	0.0286	0.0280
CG1	0.0958	0.0683	0.0824	0.0822
CG2	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CG3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CG4	0.0071	0.0088	0.0086	0.0082
CG5	0.0074	0.0065	0.0082	0.0074
CG6	0.0316	0.0255	0.0299	0.0290
CG7	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CG8	0.0343	0.0301	0.0328	0.0324
CG9	0.0378	0.0247	0.0316	0.0314
CG10	0.0176	0.0245	0.0162	0.0194

(ต่อ)

ไอโซเลต	น้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์หน่วยกรัมต่อลิตร (3 ชั่วโมง)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
CG11	0.1728	0.1495	0.1447	0.1557
CG12	0.0676	0.0548	0.0621	0.0615
CG13	0.1046	0.0873	0.0618	0.0846
CG14	0.0373	0.0314	0.0353	0.0347

### 3. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต

#### 3.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ค่าการดูดกลืนแสง 490 นาโนเมตร

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร (3 ชั่วโมง)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
CG11	0.762	0.734	0.794	0.763
MK8	0.790	0.771	0.782	0.781
MK10	0.439	0.420	0.478	0.446
MK11	0.796	0.764	0.775	0.778
RV1	0.525	0.553	0.536	0.538

#### 3.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (3 ชั่วโมง)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
CG11	0.011	0.006	0.007	0.008
MK8	0.003	0.008	0.005	0.005
MK10	0.006	0.007	0.009	0.007
MK11	0.006	0.003	0.010	0.006
RV1	0.026	0.022	0.024	0.024

#### 4. การทดสอบความสามารถในการเร่งการจับกลุ่มเบื้องต้น

พอลิแซ็กคาไรด์ (0.5 กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
ดินขาว	2.425	2.427	2.432	2.428
ดินขาว+CaCl <sub>2</sub>	0.375	0.360	0.422	0.386
CG11	0.684	0.680	0.645	0.670
MK8	0.425	0.410	0.460	0.432
MK10	0.296	0.339	0.334	0.323
MK11	0.363	0.346	0.364	0.358
RV1	0.375	0.413	0.373	0.387
แซนแทน	0.649	0.648	0.688	0.662
อัลจิเนต	0.412	0.458	0.390	0.420

#### 5. การทดสอบประสิทธิภาพการเร่งการจับกลุ่ม

##### 5.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต่างกัน

พอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
ดินขาว	2.490	2.493	2.499	2.494	
ดินขาว+CaCl <sub>2</sub>	0.382	0.341	0.407	0.377	
CG11	0.001	0.315	0.316	0.323	0.318
	0.005	0.321	0.279	0.261	0.287
	0.010	0.271	0.277	0.27	0.273
	0.025	0.277	0.272	0.273	0.274
	0.050	0.299	0.305	0.312	0.305
	0.100	0.288	0.302	0.308	0.299
	0.500	0.415	0.407	0.441	0.421

(ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)		ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ชั่วโมง)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
CG11	1	0.42	0.406	0.396	0.407
	5	1.352	1.163	1.135	1.217
	10	1.705	1.718	1.761	1.728
	15	2.203	2.25	2.171	2.208
MK8	0.001	0.314	0.299	0.296	0.303
	0.005	0.298	0.327	0.303	0.309
	0.010	0.315	0.270	0.275	0.287
	0.025	0.304	0.288	0.333	0.308
	0.050	0.309	0.294	0.305	0.303
	0.100	0.327	0.306	0.339	0.324
	0.500	0.346	0.336	0.357	0.346
	1	0.375	0.384	0.396	0.385
	5	0.697	0.687	0.704	0.696
	10	1.265	1.315	1.293	1.291
	15	1.481	1.473	1.487	1.480
MK10	0.001	0.279	0.278	0.28	0.279
	0.005	0.286	0.309	0.3	0.298
	0.010	0.304	0.307	0.284	0.298
	0.025	0.304	0.317	0.297	0.306
	0.050	0.275	0.281	0.279	0.278
	0.100	0.284	0.295	0.297	0.292
	0.500	0.292	0.332	0.322	0.315
	1	0.324	0.348	0.359	0.344
	5	0.44	0.439	0.449	0.443
	10	0.562	0.565	0.573	0.567
	15	0.852	0.791	0.817	0.820

(ต่อ)

พอลิเอธิลีนไครต์ (กรัมต่อลิตร)		ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
MK11	0.001	0.347	0.346	0.346	0.346
	0.005	0.35	0.311	0.337	0.333
	0.010	0.348	0.311	0.364	0.341
	0.025	0.359	0.347	0.317	0.341
	0.050	0.329	0.324	0.327	0.327
	0.100	0.362	0.347	0.338	0.349
	0.500	0.394	0.391	0.414	0.400
	1	0.501	0.508	0.48	0.496
	5	1.226	1.187	1.270	1.228
	10	1.801	1.763	1.733	1.766
	15	2.321	2.323	2.285	2.310
RV1	0.001	0.294	0.299	0.292	0.295
	0.005	0.426	0.424	0.396	0.415
	0.010	0.294	0.272	0.274	0.280
	0.025	0.291	0.286	0.295	0.291
	0.050	0.304	0.287	0.269	0.287
	0.100	0.341	0.32	0.35	0.337
	0.500	0.332	0.307	0.313	0.317
	1	0.317	0.323	0.334	0.325
	5	0.444	0.435	0.467	0.449
	10	0.577	0.578	0.582	0.579
	15	0.822	0.735	0.739	0.765
แซนแทน	0.001	0.281	0.287	0.308	0.292
	0.005	0.303	0.358	0.317	0.326
	0.010	0.301	0.306	0.293	0.300
	0.025	0.290	0.306	0.294	0.297
	0.050	0.308	0.337	0.307	0.317
	0.100	0.338	0.328	0.315	0.327



(ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)		ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
แซนแทน	0.500	0.471	0.456	0.448	0.458
	1	0.534	0.548	0.529	0.537
	5	2.17	2.229	2.253	2.217
	10	2.483	2.484	2.477	2.481
	15	2.503	2.493	2.493	2.496
อัลจินต	0.001	0.299	0.311	0.31	0.307
	0.005	0.399	0.374	0.355	0.376
	0.010	0.292	0.310	0.306	0.303
	0.025	0.319	0.292	0.284	0.298
	0.050	0.309	0.31	0.309	0.309
	0.100	0.306	0.314	0.307	0.309
	0.500	0.33	0.324	0.303	0.319
	1	0.308	0.312	0.33	0.317
	5	0.385	0.391	0.44	0.405
	10	0.36	0.358	0.371	0.363
	15	0.372	0.434	0.371	0.392

## 5.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ต่างกัน

พอลิแซ็กคาไรด์ (0.001 กรัมต่อลิตร)	CaCl <sub>2</sub> (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ชั่วโมง)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
ดินขาว		2.501	2.499	2.498	2.499
ดินขาว + CaCl <sub>2</sub>	0.1	2.499	2.495	2.501	2.498
	0.5	2.492	2.492	2.491	2.492
	1	2.493	2.491	2.490	2.491
	2.5	1.727	1.691	1.723	1.714
	5	0.704	0.697	0.739	0.713
	7.5	0.524	0.561	0.541	0.542
	10	0.352	0.385	0.359	0.365
	12.5	0.366	0.335	0.332	0.344
CG11	0.1	2.501	2.498	2.499	2.499
	0.5	2.496	2.496	2.493	2.495
	1	2.492	2.495	2.492	2.493
	2.5	2.027	1.938	1.999	1.988
	5	0.586	0.649	0.635	0.623
	7.5	0.418	0.423	0.434	0.425
	10	0.393	0.342	0.376	0.370
	12.5	0.324	0.317	0.331	0.324
MK8	0.1	2.497	2.500	2.498	2.498
	0.5	2.496	2.496	2.493	2.495
	1	2.489	2.491	2.491	2.490
	2.5	2.088	1.963	1.987	2.013
	5	0.723	0.576	0.749	0.683
	7.5	0.495	0.449	0.448	0.464
	10	0.369	0.379	0.370	0.373
	12.5	0.318	0.362	0.364	0.348

(ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์ (0.001 กรัมต่อลิตร)	CaCl <sub>2</sub> (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
MK10	0.1	2.498	2.501	2.499	2.499
	0.5	2.500	2.493	2.497	2.497
	1	2.490	2.492	2.492	2.491
	2.5	2.121	2.167	2.087	2.125
	5	0.614	0.709	0.713	0.679
	7.5	0.564	0.502	0.469	0.512
	10	0.374	0.412	0.432	0.406
	12.5	0.365	0.378	0.386	0.376
MK11	0.1	2.497	2.498	2.495	2.497
	0.5	2.492	2.496	2.495	2.494
	1	2.491	2.489	2.487	2.489
	2.5	2.090	2.100	2.126	2.105
	5	0.507	0.534	0.505	0.515
	7.5	0.445	0.560	0.430	0.478
	10	0.336	0.371	0.368	0.358
	12.5	0.304	0.332	0.297	0.311
RV1	0.1	2.487	2.491	2.492	2.490
	0.5	2.482	2.482	2.481	2.482
	1	2.481	2.478	2.483	2.481
	2.5	1.951	1.929	2.012	1.964
	5	0.649	0.685	0.561	0.632
	7.5	0.378	0.483	0.468	0.443
	10	0.334	0.372	0.320	0.342
	12.5	0.342	0.349	0.314	0.335

(ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์ (0.001 กรัมต่อลิตร)	CaCl <sub>2</sub> (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ชั่วโมง)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
แซนแทน	0.1	2.499	2.493	2.493	2.495
	0.5	2.495	2.492	2.492	2.493
	1	2.490	2.490	2.489	2.490
	2.5	1.897	1.864	1.880	1.880
	5	0.598	0.620	0.624	0.614
	7.5	0.480	0.465	0.444	0.463
	10	0.344	0.327	0.345	0.339
	12.5	0.347	0.304	0.305	0.319
อัลจินต	0.1	2.498	2.499	2.494	2.497
	0.5	2.496	2.495	2.498	2.496
	1	2.492	2.489	2.491	2.491
	2.5	1.831	1.848	1.771	1.817
	5	0.583	0.680	0.624	0.629
	7.5	0.381	0.398	0.386	0.388
	10	0.335	0.348	0.346	0.343
	12.5	0.345	0.333	0.348	0.342

## 5.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่สภาวะค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน

พอลิแซ็กคาไรด์ (0.001 กรัมต่อลิตร)	pH	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
ดินขาว	3	2.461	2.458	2.456	2.458
	5	2.476	2.465	2.462	2.468
	7	2.469	2.467	2.468	2.468
	9	2.461	2.462	2.472	2.465
	11	2.478	2.473	2.472	2.474
ดินขาว + CaCl <sub>2</sub>	3	0.393	0.391	0.388	0.391
	5	0.746	0.713	0.725	0.728
	7	0.595	0.591	0.562	0.583
	9	0.356	0.342	0.392	0.363
	11	0.276	0.233	0.234	0.248
CG11	3	0.388	0.434	0.438	0.420
	5	0.601	0.659	0.637	0.632
	7	0.588	0.547	0.547	0.561
	9	0.334	0.333	0.307	0.325
	11	0.238	0.267	0.237	0.247
MK8	3	0.358	0.395	0.359	0.371
	5	0.789	0.746	0.786	0.774
	7	0.521	0.488	0.477	0.495
	9	0.385	0.395	0.365	0.382
	11	0.234	0.233	0.246	0.238
MK10	3	0.400	0.382	0.414	0.399
	5	0.864	0.880	0.918	0.887
	7	0.400	0.419	0.383	0.401
	9	0.373	0.401	0.420	0.398
	11	0.228	0.258	0.233	0.240

(ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์ (0.001 กรัมต่อลิตร)	pH	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
MK11	3	0.419	0.422	0.386	0.409
	5	0.719	0.761	0.734	0.738
	7	0.557	0.590	0.547	0.565
	9	0.392	0.434	0.378	0.401
	11	0.252	0.250	0.239	0.247
RV1	3	0.465	0.466	0.395	0.442
	5	0.614	0.708	0.665	0.662
	7	0.529	0.503	0.556	0.529
	9	0.308	0.324	0.304	0.312
	11	0.246	0.244	0.229	0.240
แซนแทน	3	0.355	0.384	0.340	0.360
	5	0.635	0.680	0.644	0.653
	7	0.461	0.424	0.415	0.433
	9	0.328	0.380	0.336	0.348
	11	0.255	0.273	0.222	0.250
อัลจินต	3	0.456	0.455	0.518	0.476
	5	0.714	0.664	0.670	0.683
	7	0.464	0.517	0.526	0.502
	9	0.380	0.434	0.370	0.395
	11	0.240	0.231	0.260	0.244

## 5.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มที่สภาวะอุณหภูมิที่ต่างกัน

พอลิแซ็กคาไรด์ (0.001 กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (°C)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ชั่วโมง)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
ดินขาว	20	2.492	2.499	2.497	2.496
	40	2.508	2.511	2.504	2.508
	60	2.521	2.516	2.515	2.517
	80	2.523	2.519	2.519	2.520
ดินขาว + CaCl <sub>2</sub>	20	0.612	0.564	0.643	0.606
	40	0.608	0.582	0.605	0.598
	60	0.468	0.472	0.448	0.463
	80	0.301	0.293	0.267	0.287
CG11	20	0.660	0.707	0.686	0.684
	40	0.547	0.543	0.554	0.548
	60	0.457	0.430	0.428	0.438
	80	0.292	0.291	0.264	0.282
MK8	20	0.554	0.559	0.570	0.561
	40	0.548	0.567	0.527	0.547
	60	0.457	0.441	0.436	0.445
	80	0.282	0.251	0.291	0.275
MK10	20	0.574	0.528	0.520	0.541
	40	0.495	0.516	0.523	0.511
	60	0.432	0.431	0.428	0.430
	80	0.271	0.275	0.275	0.274
MK11	20	0.568	0.594	0.599	0.587
	40	0.557	0.521	0.531	0.536
	60	0.444	0.419	0.430	0.431
	80	0.251	0.251	0.239	0.247

(ต่อ)

พอลิแซ็กคาไรด์ (0.001 กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (°C)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)			
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย
RV1	20	0.659	0.701	0.678	0.679
	40	0.538	0.524	0.547	0.536
	60	0.427	0.409	0.410	0.415
	80	0.275	0.276	0.265	0.272
แซนแทน	20	0.538	0.574	0.543	0.552
	40	0.535	0.536	0.537	0.536
	60	0.431	0.459	0.434	0.441
	80	0.265	0.290	0.268	0.274
อัลจิเนต	20	0.595	0.651	0.665	0.637
	40	0.596	0.547	0.591	0.578
	60	0.418	0.417	0.416	0.417
	80	0.262	0.293	0.279	0.278



6. ทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งการจับกลุ่มตัวอย่างน้ำเสียจริง

พอลิเมอร์ (0.001 กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (3 ซ้ำ)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
น้ำเสีย	1.781	1.792	1.790	1.788
น้ำเสีย+CaCl <sub>2</sub>	0.946	0.975	0.947	0.956
CG11	0.928	0.924	0.923	0.925
MK8	0.853	0.831	0.834	0.839
MK10	0.866	0.838	0.846	0.850
MK11	0.831	0.846	0.848	0.842
RV1	0.861	0.885	0.895	0.880
อะลูมิเนียมซัลเฟต	0.928	0.912	0.892	0.911
เฟอร์ริกคลอไรด์	1.056	1.082	1.074	1.071

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว นุชจรินทร์ วรรณนิตย์ เกิดวันพุธที่ 15 กรกฎาคม 2530 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณลาดกระบัง ปีการศึกษา 2551 ที่อยู่ปัจจุบัน 156 ซ.หอกการค้าไทย ถ.วิภาวดีรังสิต เขตดินแดง แขวงดินแดง จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10400

### ผลงานที่เคยตีพิมพ์

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ ในงาน The 27th Annual meeting of the Thai society for biotechnology and international conference 2015 (TSB 2015) ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรมแมนดาริน จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง Isolation of exopolysaccharide producing bacteria and the application of exopolysaccharide as bioflocculant.