

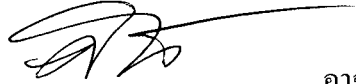
การสร้างไปโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกและการควบคุมโดยใช้โมเนนซิน
เพื่อผลิตเชื้อเพลิงเอทานอล

นันทพร เจริญเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

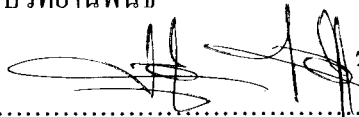
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ นันทพร เจริญเจริญ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

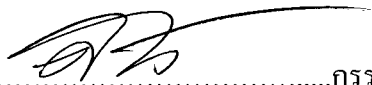


.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริ โฉม ทุงเก่า)

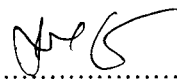
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



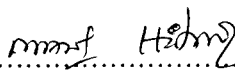
.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมชาย ไกรรัศมิ์)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริ โฉม ทุงเก่า)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร)



.....กรรมการ
(ดร.กาญจนา หริ่มเพ็ง)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่... 8 ...เดือน... พฤษภาคม... พ.ศ. 2560

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ประจำปี 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา
และเงินทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประเภทบัณฑิตศึกษา
ประจำปีงบประมาณ 2559 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริ โฉม ทุ่งแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางที่ถูกต้องทั้งทางด้านวิชาการและการปฏิบัติการ ตลอดจนช่วยเหลือสนับสนุนทางด้านต่าง ๆ และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภารัตน์ สวนจิตร และดร. กาญจนา หริ่มเพ็ง อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาและอาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ ตรวจสอบแก้ไข และวิจารณ์ผลงาน ทำให้งานวิจัยมีความถูกต้อง สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบ รวมทั้งให้คำแนะนำต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ คุณคุณากร เชื้อสุวรรณ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บรวบรวมตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

งานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ประจำปี 2558 ของมหาวิทยาลัยบูรพา จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2559 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) มา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณพระคุณ คุณวรรณภา จงโยธา และคุณประภารัตน์ พูลผล ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์และสารเคมี รวมทั้งคำปรึกษาต่าง ๆ

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัว เพื่อน ๆ และพี่ ๆ ทุกคนที่ให้อกำลังใจและสนับสนุน ผู้วิจัยเสมอมา คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่ บุพการี บุรพจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

นันทพร เจริญเจริญ

55910375: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก/ไบโอฟิล์ม/เอทานอล/โมนนซิน

นันทพร เจริญเจริญ : การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกและการควบคุมโดยใช้โมนนซิน เพื่อผลิตเชื้อเพลิงเอทานอล (BIOFILM FORMATION OF LACTIC ACID BACTERIA AND CONTROL BY A MONENSIN FOR FUEL ETHANOL PRODUCTION)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศิริ โฉม ทุงแก้ว, Ph.D. 125 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียแลคติกจากกระบวนการผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ แล้วนำมาระบุสปีชีส์ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม ASI 304 และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อผสมในสภาวะการหมักจำลองที่มียาปฏิชีวนะ Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm เปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติมยาปฏิชีวนะพบว่าตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียแลคติก อยู่ในช่วง 6.91 ถึง 8.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาคัดแยกพบว่าในจำนวน 7 ไอโซเลต ประกอบด้วยจีโนสเดี่ยว คือ จีโนส *Lactobacillus* โดยสปีชีส์ที่พบได้แก่ *L. farraginis*, *L. pantheris*, *L. farciminis*, *L. formosensis* และ *L. plantarum* group แบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลต มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยวและพบไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกผสมร่วมกับยีสต์ในสภาวะการหมักจำลอง และการเติม Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm ทำให้ปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกผสม มีค่าลดลงเฉลี่ย 81.13% เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง แบคทีเรียแลคติกที่พบมากในไบโอฟิล์มของเชื้อผสมมี 2 สปีชีส์ ได้แก่ *L. farraginis* และ *L. parafarraginis*

55910375: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M. Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: LACTIC ACID BACTERIA/ BIOFILM/ ETHANOL/ MONENSIN

NUNTAPORN REANJAROEN: BIOFILM FORMATION OF LACTIC ACID BACTERIA AND CONTROL BY A MONENSIN FOR FUEL ETHANOL PRODUCTION.

ADVISORY COMMITTEE: SIRICHOM THUNGKAO, Ph.D. 125 P. 2017.

The purposes of this study were to isolate lactic acid bacteria (LAB) from a commercial ethanol plant using molasses as the raw material and to identify LAB by 16S rRNA sequencing method and evaluate their abilities to form monoculture biofilm on ASI 304 stainless steel as well as formation of mixed LAB-yeast biofilm under simulated ethanol production with 5 ppm Monensin X antibiotic and without antibiotic addition.

The results showed that all samples were contaminated with LAB, ranging from 6.91 to 8.24 log CFU/ml. Seven predominant LAB isolates were found to be solely genus *Lactobacillus* and were identified as *L. farraginis*, *L. pantheris*, *L. farciminis*, *L. formosensis* and *L. plantarum* group. The seven Lactobacilli showed abilities to form monoculture biofilm on stainless steel. Moreover, mixed-biofilm of LAB and yeast was also observed under simulated ethanol production. The addition of Monensin X reduced the amount of biofilm by averaged 81.13% after 48 incubation. *L. farraginis* and *L. parafarraginis* were the most prevalent species in the mixed culture biofilm.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
เอทานอล.....	4
กระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพ.....	5
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล.....	7
อุตสาหกรรมเอทานอลในประเทศไทย.....	8
กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล.....	9
การประเมินวัฏจักรและต้นทุนวัฏจักรชีวิตของการผลิตเอทานอล.....	10
การปนเปื้อนของแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเอทานอล.....	14
แบคทีเรียปนเปื้อนและผลกระทบ.....	14
แบคทีเรียแลคติก.....	15
การควบคุมการปนเปื้อน.....	15
ไบโอฟิล์ม.....	16
กระบวนการก่อตัวของไบโอฟิล์ม.....	17
การป้องกันและกำจัดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรม.....	18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
วิธีการตรวจสอบใบไอฟิล์ม.....	18
ยาปฏิชีวนะในกลุ่มโมเนนซิน.....	19
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
วัตถุประสงค์.....	28
ตอนที่ 1: การศึกษาจำนวนและความหลากหลายของแบคทีเรียแลคติก.....	30
- การเก็บตัวอย่างน้ำหมักเอทานอลและการศึกษาด้วยวิธี Wet mount	30
- การเพาะแยกแบคทีเรียแลคติกและการเก็บรักษาเชื้อ.....	31
- การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก.....	32
ตอนที่ 2 : การสร้างใบไอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว.....	34
- การเตรียมแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม.....	34
- การเตรียม Molasses medium.....	34
- การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแลคติกทดสอบ.....	35
- การทดสอบการสร้างใบไอฟิล์มของเชื้อเดี่ยว.....	35
- การหาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในใบไอฟิล์ม.....	36
ตอนที่ 3 : การสร้างใบไอฟิล์มในสภาวะการหมักจำลอง.....	36
- การเตรียมแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมและกากน้ำตาล.....	36
- การเตรียมสารละลายตั้งต้นยา Monensin X.....	37
- การเตรียมเชื้อผสมของยีสต์และแบคทีเรียแลคติก.....	37
- การทดสอบการสร้างใบไอฟิล์มในสภาวะการหมักจำลอง.....	37
- การหาปริมาณใบไอฟิล์มและจัดจำแนกเชื้อ.....	38
- การตรวจสอบการสร้างใบไอฟิล์ม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	38
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	39
4 ผลการวิจัย.....	40

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การศึกษาจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำหมักเอทานอล.....	40
การแยกแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างน้ำหมักเอทานอล.....	41
การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากกระบวนการผลิตเอทานอล.....	44
การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว.....	52
การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกและการหาปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ในรูป Planktonic cell ในสภาวะการหมักจำลอง.....	53
การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่พบในไบโอฟิล์ม.....	62
การศึกษาไบโอฟิล์ม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	69
5 สรุปและอภิปรายผล.....	70
สรุปผลการวิจัย.....	70
อภิปรายผล.....	70
ข้อเสนอแนะ.....	76
บรรณานุกรม.....	77
ภาคผนวก.....	87
ภาคผนวก ก.....	88
ภาคผนวก ข.....	91
ภาคผนวก ค.....	93
ภาคผนวก ง.....	95
ภาคผนวก จ.....	112
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	125

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1	เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 1 ลิตร..... 7
2-2	ปริมาณการผลิตเอทานอลจำแนกตามวัตถุดิบ (ลิ้นลิตร)..... 8
4-1	สัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของไอโซเลตที่คัดแยกได้ จากน้ำหมักเอทานอล..... 42
4-2	ความชุกของไอโซเลตแบคทีเรียแลคติกที่พบในตัวอย่างน้ำหมัก..... 44
4-3	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักเอทานอล เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ EzTaxon..... 46
4-4	แทกซอนต่าง ๆ ของแบคทีเรียยีส <i>Lactobacillus</i> ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับไอโซเลต KA 01, KA 02, KA 03, KA 04, KA05, KA 06 และ KA 07..... 48
4-5	Sequence identity matrix ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์ สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากน้ำหมัก เอทานอล 7 ไอโซเลต..... 51
4-6	ไอโซเลตของแบคทีเรียแลคติกบน MRS agar ที่แยกได้จากไบโอฟิล์ม..... 56
4-7	ลักษณะโคโลนีและลักษณะได้กลิ่นของไอโซเลตที่ก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม บนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม ในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง..... 57
4-8	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกจากไบโอฟิล์มที่สร้างในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ EzTaxon..... 63
4-9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก จากฐานข้อมูล ของ GenBank และ EzTaxon..... 65

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4-10 Sequence identity matrix ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์ สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับแบคทีเรียแลคติกจากไบโอฟิล์ม ที่สร้างในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง 16 ไอโซเลต.....	68

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
2-1	แผนผังแสดงรายละเอียดกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล.....	10
2-2	การประเมินวัฏจักรชีวิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการเพาะปลูกอ้อย.....	11
2-3	การประเมินวัฏจักรชีวิตผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนการขนส่ง.....	11
2-4	การประเมินวัฏจักรชีวิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการผลิตน้ำตาล.....	12
2-5	การประเมินวัฏจักรชีวิตผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ 99.5%.....	13
2-6	กระบวนการเกิดไบโอฟิล์ม.....	17
2-7	โครงสร้างของไบโแนนซิน.....	20
2-8	การทำงานของไบโแนนซินที่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก.....	20
4-1	เซลล์ยีสต์และแบคทีเรียในน้ำหมักจากถังเลี้ยงยีสต์ (A), ถังหมักเอทานอลถังที่ 1-6 (B-G, ตามลำดับ) และถังเก็บน้ำหมักรอกถั่ว (H) เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า.....	40
4-2	จำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนในกระบวนการหมักเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ (log CFU ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้วิธีนับจำนวนแบคทีเรียบน MRS agar ที่มียาปฏิชีวนะ Cycloheximide 0.01% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในโถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน.....	41
4-3	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำหมักในกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 plus bp.....	45
4-4	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียแลคติก 7 ไอโซเลตที่แยกได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล.....	50
4-5	ปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลต เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-6	ปริมาณ ไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง ที่มียา Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง.....	54
4-7	แบคทีเรียแลคติกแขวนลอยในกากน้ำตาลที่มียา Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	55
4-8	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างไบโอฟิล์ม โดยเทียบกับดีเอ็นเอ มาตรฐาน VC 100 plus bp.....	63
4-9	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียแลคติก 16 ไอโซเลต.....	67
4-10	ลักษณะของ ไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักจำลองบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม เมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	69

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมันเชื้อเพลิงจากฟอสซิลถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักมานานกว่า 200 ปี ไม่ว่าจะ เป็นทางด้านอุตสาหกรรม ยานพาหนะส่วนตัวและขนส่งมวลชน ประกอบกับสถานการณ์ราคาน้ำมันดิบที่สูงขึ้นและปริมาณสำรองที่ลดลง ปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมจากการสะสมตัวของปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลในชั้นบรรยากาศโลกที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะเรือนกระจกและภาวะโลกร้อนที่ทวีความรุนแรงมากขึ้น (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) จึงมีผู้ให้ความสนใจพัฒนาพลังงานทางเลือกต่างๆ เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคต เช่น พลังงานความร้อนจากแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ และพลังงานชีวมวล

เอทานอลจัดเป็นพลังงานชีวมวลชนิดหนึ่งที่มีความสนใจนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทน สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรหลายชนิด ด้วยกระบวนการหมักของยีสต์เพื่อเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตจากพืชให้เป็นเอทานอลและกลั่นเป็นเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ 95.5% (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2551) ซึ่งเอทานอลที่ได้จะเรียกว่า เอทานอลชีวภาพ (Bioethanol) โดยมีประเทศสหรัฐอเมริกาและบราซิลเป็นผู้ผลิตและส่งออกเอทานอล อันดับ 1 และ 2 ของโลก ตามลำดับ ประชากรประเทศบราซิลได้ใช้พลังงานจากเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงสำหรับยานพาหนะส่วนตัวมากกว่า 50% (Basso, Basso, & Rocha, 2011; Robert, 2012) สำหรับประเทศไทย มีการผลิตเอทานอลเป็นอันดับ 6 ของโลก (ธนาคารแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 2558) และมีการใช้พลังงานทดแทนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีผลมาจากนโยบายการพัฒนาพลังงานทดแทน โดยในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีการใช้พลังงานทดแทนทั้งหมดถึง 10,956 พันตัน โดยมีการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทน 3.55 ล้านลิตรต่อวัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2558) ในประเทศไทยมีวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล คือ อ้อย มันสำปะหลังและกากน้ำตาล โดยกากน้ำตาลใช้มากถึง 75% (อภิชาติ จงสกุล, 2555) ซึ่งเอทานอลสามารถนำไปผสมในน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนที่เหมาะสม จึงเป็นการลดปริมาณและนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงได้ รวมถึงช่วยลดปัญหามลพิษทางอากาศและช่วยยกระดับราคาพืชผลทางการเกษตร เพื่อความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของเกษตรกร (Knittel & Smith, 2012)

ปัญหาที่สำคัญที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ในการหมักนั้นมีหลายประการที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ เช่น ความเข้มข้นของเอทานอลที่สูง ความเป็นกรดและปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น (Basso et al., 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) ซึ่งถือว่าเป็นปัญหาหลักที่พบได้เสมอ เนื่องจากกระบวนการหมักเอทานอลดำเนินการในสภาวะที่ไม่ปลอดเชื้อ มีรายงานว่า โรงงานผลิตเอทานอลของประเทศเกาหลีที่ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ มีการปนเปื้อนจาก *Lactobacillus fermentum*, *L. salivarius* และ *L. casei* (Chang, Kim, Shin, & Lee, 1995) โรงงานเอทานอลในประเทศบราซิลพบการปนเปื้อนจาก *L. fermentum* และ *L. vini* (Lucena et al., 2010) ในประเทศไทย โรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบพบการปนเปื้อนของ *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. buchneri* และ *Pediococcus damnosus* (ศิริ โฉม ทุงแก้ว และพิริยา พัฒนาเจริญสุข, 2557) ซึ่งการปนเปื้อนนี้ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลลดลง เนื่องจากทำให้ความสามารถในการหมักและการเจริญของเซลล์ยีสต์ลดลง (Basso et al., 2011) เป็นปัญหาเรื้อรังในโรงงานผลิตเอทานอล ทำให้ต้องมีวิธีการต่าง ๆ ในการควบคุม เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะเติมลงในถังหมัก เช่น Penicilin, Virginiamycin รวมทั้งยาในกลุ่ม โมเนนซิน (Monensin antibiotics) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีรายงานว่าแบคทีเรียที่พบในถังหมักเอทานอลสามารถก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม (Biofilm) ได้ (Skinner-Nemec, Nichols, & Leathers, 2007; Joseph, Timothy, Melinda, & Kenneth, 2011; Leathers et al., 2014) ทำให้สารฆ่าเชื้อรวมทั้งยาปฏิชีวนะทำลายแบคทีเรียที่อยู่ภายในโครงสร้างของไบโอฟิล์มได้น้อยลง จึงกำจัดได้ยากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ที่ไม่ได้อยู่ในรูปไบโอฟิล์ม (Planktonic cell) (Gilbert & Brown, 1995; Desai, Buhler, Weller, & Brown, 1998; Ceri et al., 1999; Stewart, Mukherjee, & Ghannoum, 2004) ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความสนใจศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอลของไทย ซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการหมัก รวมถึงศึกษาผลของยาปฏิชีวนะในกลุ่มโมเนนซิน ซึ่งมีการใช้เพื่อยับยั้งแบคทีเรียปนเปื้อนในโรงงานต่อการก่อตัวและการกำจัดไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม (Stainless steel) ซึ่งเป็นวัสดุที่ใช้ทำถังหมักเพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นและอาจมีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตเอทานอลอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียแลคติกจากถังหมักเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาล
วัตถุดิบ
2. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้
3. เพื่อศึกษาผลของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของโมแนนซินต่อการยับยั้งการก่อตัวเป็น
ไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม ASI 304

สมมติฐานของการวิจัย

1. มีแบคทีเรียแลคติกปนเปื้อนในขั้นตอนการผลิตเอทานอลของโรงงานที่นำมาศึกษา
2. แบคทีเรียแลคติกแต่ละสปีชีส์ มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกัน
3. ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของโมแนนซิน ความเข้มข้น 5 ppm มีผลลดการก่อตัวของ
ไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ทราบความหลากหลายของแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนในถังหมักเอทานอล
2. ทราบถึงความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแต่ละไอโซเลต
และประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะในกลุ่มของโมแนนซิน ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะ
การหมักเอทานอลจำลอง
3. สามารถนำผลการสร้างไบโอฟิล์มและผลของยาปฏิชีวนะมาประยุกต์ใช้ในสภาวะ
การหมักจริง

ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการผลิตเอทานอลของโรงงาน
แห่งหนึ่งที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ โดยวิธีนับจำนวนโคโลนี (Plate count) และระบุชนิดของ
แบคทีเรีย โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากนั้นศึกษาความสามารถ
ในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อผสม
ในสภาวะการหมักจำลองที่มียาปฏิชีวนะในกลุ่มของโมแนนซิน ความเข้มข้น 5 ppm บนแผ่น
เหล็กกล้าปลอดสนิม ASI 304 เปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติมยาปฏิชีวนะ โดยหาปริมาณไบโอฟิล์มด้วย
วิธีนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell count) และศึกษาไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
แบบส่องกราด (SEM)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

1. เอทานอล (Ethanol)
2. การปนเปื้อนของแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเอทานอล
3. ไบโอฟิล์ม (Biofilm)
4. ยาปฏิชีวนะในกลุ่มโมเนนซิน (Monensin antibiotic)
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เอทานอล (Ethanol)

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง มีสูตรโมเลกุล C_2H_5OH มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 กรัมต่อโมล มีจุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงินและไม่มีควัน สามารถละลายรวมตัวกับน้ำ อีเทอร์ หรือ คลอโรฟอร์มได้ทุกส่วน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) ผลิตได้จาก 2 กระบวนการ คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งเป็นการผลิตจากอนุพันธ์ปิโตรเลียม เช่น เอทิลีน (Ethylene) ด้วยปฏิกิริยาเอทิลีน ไฮเดรชัน (Ethylene hydration) โดยอาศัยกรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และกระบวนการหมักซึ่งเป็นการเปลี่ยนวัสดุทางการเกษตรที่มีคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นเอทานอล โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ ซึ่งเอทานอลที่ได้อาจเรียกว่า เอทานอลชีวภาพหรือไบโอเอทานอล (Bioethanol) เอทานอลถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในรูปเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้ในอุตสาหกรรมยา ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและสารชีวเคมี รวมทั้งใช้เป็นเชื้อเพลิงและสารเพิ่มค่าออกเทนในเชื้อเพลิง เป็นต้น (นคร ทิพย์าวงศ์, 2553)

เชื้อเพลิงที่ได้จากเอทานอลชีวภาพจัดว่าเป็นพลังงานชีวมวล (Biomass energy) ชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ทดแทนแหล่งพลังงานจากฟอสซิล โดยพลังงานชีวมวลเป็นแหล่งพลังงานที่กักเก็บมาจากแสงอาทิตย์และเกิดขึ้นหมุนเวียนซ้ำแล้วซ้ำอีกตามธรรมชาติ สามารถนำมาผลิตพลังงานเพื่อใช้ทดแทนพลังงานจากฟอสซิลซึ่งมีอยู่จำกัดและใกล้จะหมดลงได้ ชีวมวลที่นำมาเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพ เป็นผลผลิตทางการเกษตร การนำมาผลิตเป็นเอทานอลจึงเป็นการสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรให้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้การใช้เอทานอลเพื่อเป็นพลังงานทดแทนยังช่วยลดการนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศด้วย ข้อดีของการใช้ชีวมวลที่มีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อม คือ

ไม่เพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศโลก เนื่องจากเมื่อมีการเพาะปลูกพืชหรือชีวมวลทดแทนในอัตราที่เท่ากัน พืชเหล่านั้นก็จะดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศเพื่อการเจริญเติบโตของตนเอง ผ่านทางกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังนั้น การใช้เชื้อเพลิงชีวมวลถือว่าเป็นการใช้พลังงานที่ไม่ทำให้การปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกไซด์ของโลกเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังมีปริมาณกำมะถันต่ำกว่าเชื้อเพลิงฟอสซิลมาก (นคร ทิพย์วงศ์, 2553)

ปัจจุบันประเทศบราซิล ซึ่งเป็นผู้ผลิตเอทานอลชีวภาพรายใหญ่ของโลก อันดับสอง รองจากประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการใช้เอทานอลเพื่อทดแทนปริมาณน้ำมันจากปิโตรเลียม (สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ และเคโซ ขุนนคร, ม.ป.ป.) โดยการผลิตเอทานอลของโลก มีปริมาณ 97,800 ล้านลิตร เพิ่มขึ้นจากปี 2557 คิดเป็น 4.8% (ธนาคารแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 2558) ในขณะที่บางประเทศรวมถึงประเทศไทย นำเอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) ซึ่งการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิง ช่วยลดมลพิษจากยานพาหนะ เช่น ไฮโดรคาร์บอน คาร์บอนมอนนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไนตริกออกไซด์และไนโตรเจนออกไซด์ เนื่องจากเกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ โดยเอทานอลมีส่วนประกอบของออกซิเจนถึง 35% ลดการปลดปล่อยสารที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ จากท่อไอเสียยานพาหนะ (Khan & Dwivedi, 2012) ในด้านเครื่องยนต์ จะไม่มีผลกระทบต่อสมรรถนะเครื่องยนต์และอัตราการเร่ง ไม่แตกต่างจากน้ำมันเบนซินและไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดำเนินการปรับแต่งเครื่องยนต์ (สุวัฒน์ หนูคีรี, ม.ป.ป.)

1.1 กระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพ

กระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพ เริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบ เพื่อนำมาใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์ การหมักและการกลั่นแยกเอทานอลออกจากน้ำหมัก โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ วัตถุดิบที่มีน้ำตาล วัตถุดิบที่มีแป้ง และวัตถุดิบที่มีเซลลูโลส โดยแป้งและเซลลูโลสต้องนำไปผ่านกระบวนการเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลก่อนที่จะนำไปหมักเป็นเอทานอล

1.1.1.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัสดุทางการเกษตรและผลพลอยได้ที่มีน้ำตาลที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลชีวภาพ ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล (Molasses) บีทรูทหรือหัวผักกาดหวาน ข้าวฟ่างหวาน

เป็นต้น โดยประเทศบราซิลใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลัก ส่วนประเทศไทยใช้อ้อยและกากน้ำตาล เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอล (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) เมื่อใช้อ้อยปริมาณ 12.7 – 14.3 กิโลกรัม จะได้เอทานอล 1 ลิตร ส่วนกากน้ำตาลปริมาณ 4-6 กิโลกรัม จะได้เอทานอล 1 ลิตร (ตารางที่ 2-1) (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.) ซึ่งกากน้ำตาลจากอ้อย เป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้ในประเทศที่ปลูกอ้อย เพื่อใช้ผลิตเป็นน้ำตาลทราย

กากน้ำตาลหรือโมลาส เป็นของเหลวสีน้ำตาลที่เหนียวข้น เป็นของที่เหลือจากการตกผลึกน้ำตาลในการผลิตน้ำตาลทราย ส่วนประกอบของกากน้ำตาลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์อ้อย และกรรมวิธีการผลิต แต่ส่วนมากพบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่คือ น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส ประมาณ 50-55% และน้ำ (นคร ทิพยวงศ์, 2553; ปฏิพล ชัยเทพ, ไพรัช สามี และรัชฎาภรณ์ ปวงก้องตัน, 2555)

1.1.1.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบที่มีแป้งที่ใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพส่วนใหญ่ได้จากผลผลิตทางการเกษตร จำพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบหลัก ส่วนประเทศไทยใช้สำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอล (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) โดยเอทานอล 1 ลิตร มาจากมันสำปะหลัง 5.45-6.50 กิโลกรัม (ตารางที่ 2-1)

1.1.1.3 วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทนี้ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากวัสดุการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย และวัชพืช (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) โดยวัตถุดิบประเภทนี้ยังไม่มี การนำมาใช้ผลิตเอทานอลในเชิงการค้า เนื่องจากต้นทุนการผลิตยังค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2550)

ตารางที่ 2-1 เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 1 ลิตร

ชนิดของวัตถุดิบ	ปริมาณวัตถุดิบ (ก.ก./เอทานอล 1 ลิตร)*
อ้อย	12.7-14.3
กากน้ำตาล	4-6
ข้าวฟ่างหวาน	14
หัวบีท	10.3
มันสำปะหลัง	5.45-6.50
มันฝรั่ง	8.5
ข้าวโพดโดยกระบวนการโม่เปียก (Wet milling)	3.68
ข้าวโพดโดยกระบวนการโม่แห้ง (Dry milling)	2.58
ข้าวสาลี	2.6
ข้าวฟ่าง	2.3
ข้าวเปลือก	2.25
ไม้	3.85

* ขึ้นอยู่กับปริมาณของแป้งหรือน้ำตาลที่มีในวัตถุดิบ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.)

1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ในกระบวนการหมักเอทานอลชีวภาพ จะอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ เนื่องจากยีสต์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอล ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) หรือ Embden – Meyerhof – Parnas โดยยีสต์ที่นิยมใช้ผลิตเอทานอล ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvaum (carlsbergensis)*, *Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces* sp. (เดือนรุ่ง เบญจมาศ, ถาวร ฉิมเลี้ยง, นิพนธ์ วุฒิชัย และจิรพร สวัสดิการ, 2549) ในประเทศบราซิลใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *S. cerevisiae* PE-2 และ *S. cerevisiae* CAT-1 ในการผลิตเอทานอลจากอ้อย (Stambuk, 2013; Romani, Pereirab, Johanssonb, & Dominguesa, 2015) มีรายงานว่ายีสต์ส่วนมากที่พบในโรงงานผลิตเอทานอลของประเทศบราซิล คือ *S. cerevisiae* และมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ใช้ *S. pombe*, *Dekkera bruxellensis*

และ *Candida krusei* ซึ่งมีน้อยกว่า 5% จากสายพันธุ์ยีสต์ที่พบทั้งหมด (Basso, Amorim, Oliveira, & Lopes, 2008)

1.3 อุตสาหกรรมเอทานอลในประเทศไทย

ในประเทศไทยอุตสาหกรรมเอทานอล มีการใช้วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล 3 ชนิด คือ กากน้ำตาล 3.2 ล้านตัน น้ำอ้อย 0.9 ล้านตัน และมันสำปะหลัง 2.2 ล้านตัน โดยกากน้ำตาลเป็น วัตถุดิบที่ใช้มากที่สุด เนื่องจากมีราคาถูก ในปัจจุบันมีโรงงานเอทานอลชีวภาพที่เปิดดำเนินการแล้ว 21 แห่ง และมีโรงงานที่อยู่ระหว่างก่อสร้างเพื่อเตรียมเปิดดำเนินการ อีก 2 แห่ง มีกำลังการผลิตรวม 4.4 ล้านลิตรต่อวัน ซึ่งคิดเป็นกำลังการผลิตที่ผลิตจากกากน้ำตาล 63.7% (2.8 ล้านลิตรต่อวัน) จาก น้ำอ้อย 4.5% (0.2 ล้านลิตรต่อวัน) และจากมันสำปะหลัง 31.8% (1.4 ล้านลิตรต่อวัน) ของกำลัง การผลิตรวม สำหรับปริมาณการผลิตเอทานอลของประเทศไทยปี 2558 มีปริมาณ 1,173.8 ล้านลิตร หรือ 3.2 ล้านลิตรต่อวัน คิดเป็นร้อยละ 72.7 ของกำลังการผลิตรวม เพิ่มขึ้นจากปี 2557 คิดเป็น 10.9 % โดยเป็นเอทานอลที่ผลิตจากกากน้ำตาล 759.2 ล้านลิตร จากน้ำอ้อย 68.6 ล้านลิตร และจาก หัวมันสำปะหลัง 346.0 ล้านลิตร คิดเป็นสัดส่วน 64.7: 5.8 : 29.5 ของผลผลิตรวม ดังแสดงใน ตารางที่ 2-2 (ธนาคารแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 2558)

ตารางที่ 2-2 ปริมาณการผลิตเอทานอลจำแนกตามวัตถุดิบ (ล้านลิตร)

ปี	กากน้ำตาล	น้ำอ้อย	มันสำปะหลัง	รวม
2554	381.4	36.5	102.6	520.5
2555	531.8	49.0	74.7	655.5
2556	627.0	56.9	265.2	949.1
2557	694.2	66.2	297.9	1,058.3
2558	759.2	68.6	346.0	1,173.8

(ธนาคารแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 2558)

1.4 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

ตัวอย่างกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลในประเทศไทยที่ใช้กระบวนการแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous process) ซึ่งประกอบด้วยถังหมัก 6 ถัง มีขั้นตอน 4 ส่วนหลัก ดังนี้

1.4.1 การเตรียมวัตถุดิบ

กากน้ำตาลที่เป็นวัตถุดิบในโรงงานผลิตเอทานอลจะมีความเข้มข้นประมาณ 80 องศาบริกซ์ นำมาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้น 12 – 16 องศาบริกซ์ สำหรับใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อเตรียมกล้าเชื้อ (ถัง Pre-fermenter) และให้มีความเข้มข้น 35 องศาบริกซ์ เพื่อใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์สำหรับผลิตเอทานอล โดยปรับค่าพีเอช ให้เป็น 4.5 - 5 ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์ นอกจากนี้จะมีการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Diammonium hydrogen phosphate) และไดแอมโมเนียม ซัลเฟต (Diammonium sulfate) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม โดยเติมให้มีความเข้มข้น 0.1%

1.4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจะใช้ยีสต์แห้ง (Dry yeast) โดยเลี้ยงในถัง Pre-fermenter บ่มเป็นเวลาประมาณ 10-12 ชั่วโมง จนได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส และมีการให้อากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนแก่ยีสต์ ในขั้นตอนนี้อาจมีการเติมยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการปนเปื้อนแบคทีเรียด้วย

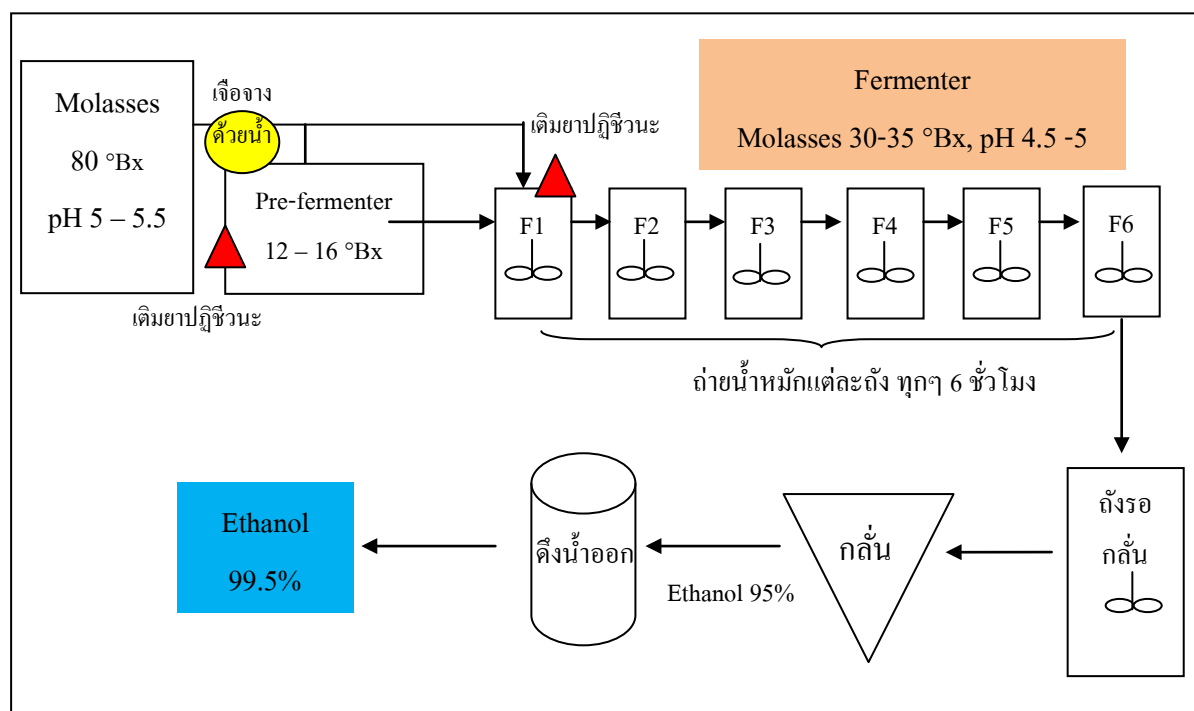
1.4.3 การหมัก

ในขั้นตอนนี้หัวเชื้อยีสต์จะถูกถ่ายเข้าสู่ถังหมักถังแรกที่มิกากน้ำตาลเข้มข้นประมาณ 35 องศาบริกซ์ บ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายน้ำหมักจากถังที่ 1 สู่อ่างหมักที่ 2 บ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการถ่ายน้ำหมักต่อไปเป็นลำดับจนถึงถังหมักที่ 6 รวมระยะเวลาการหมักประมาณ 36 ชั่วโมง ซึ่งถังหมักมีการกวนแต่ไม่มีการให้อากาศ ในขั้นตอนนี้ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล จนได้ความเข้มข้นประมาณ 8-12%

1.4.4 การแยกเอทานอลและทำให้บริสุทธิ์

เมื่อหมักครบ 36 ชั่วโมง จะนำน้ำหมักจากถังหมักนำมาแยกยีสต์ เพื่อนำกลับไปใช้ใหม่ ส่วนน้ำหมักถ่ายเก็บรวมในถังเพื่อรอกั่น โดยใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วนซึ่งสามารถแยก

เอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ประมาณ 95% จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการคั่งน้ำออก ทำให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ 99.5% แผนผังสรุปขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลแสดงในภาพที่ 2-1



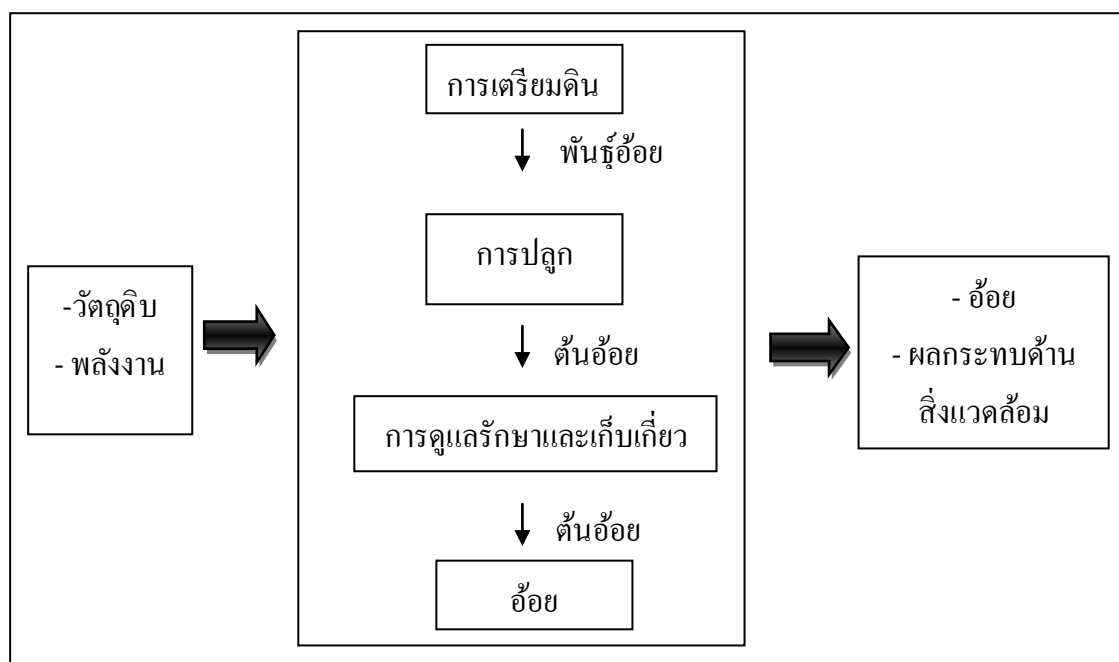
ภาพที่ 2-1 แผนผังแสดงรายละเอียดกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

1.5 การประเมินวัฏจักรและต้นทุนวัฏจักรชีวิตของการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ 99.5%

การประเมินผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมตลอดช่วงชีวิตของการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ 99.5% โดยใช้เทคนิค Life Cycle Assessment (LCA) และอีกส่วนหนึ่งคือการประเมินต้นทุนตลอดวัฏจักรชีวิตของการผลิตเอทานอล โดยแบ่งวัฏจักรชีวิตของเอทานอลที่ทำการศึกษาออกเป็นสามช่วง คือ (1) ขั้นตอนการทางการเกษตรซึ่งได้แก่การเพาะปลูกอ้อย (2) ขั้นตอนการผลิตเอทานอล และ (3) ขั้นตอนการขนส่งในระหว่างกระบวนการเพาะปลูกไปยังโรงงานผลิตเอทานอล และในส่วนของประเมินต้นทุนตลอดวัฏจักรชีวิตของการผลิตเอทานอลนั้นจะยึดตามวิธีการกำหนดองค์ประกอบต้นทุน โดยนำข้อมูลทางด้านกายภาพ การใช้พลังงาน และผลกระทบทางด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นตลอดวัฏจักรชีวิตของระบบการผลิตเอทานอล ซึ่งประกอบไปด้วยข้อมูลด้านพลังงาน วัสดุคิบ ราคาในขั้นตอนต่างๆ วัสดุคิบผลกระทบทางสิ่งแวดล้อม และของเสีย (Waste processing) (บุษนาถ ลอยจีว, 2551)

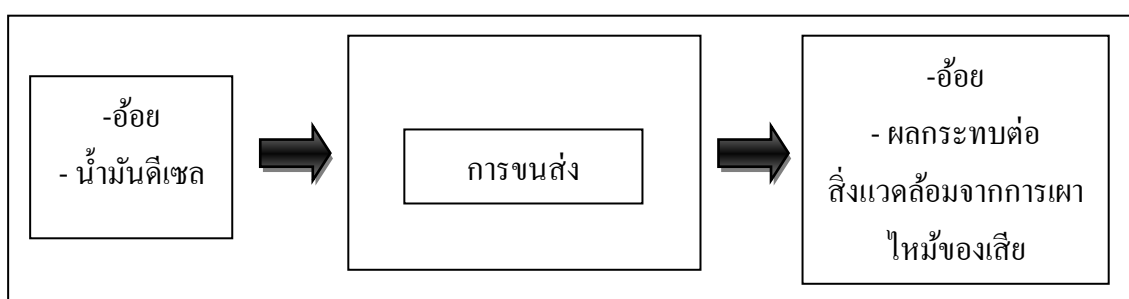
โดยเริ่มจากขั้นตอนการเพาะปลูกอ้อย ตั้งแต่การเตรียมดิน การปลูก การดูแลรักษา การเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้อ้อยที่จะขนส่งไปยังขั้นตอนการผลิตน้ำตาล ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้ปุ๋ยเคมี สารกำจัดวัชพืช สูญเสียพลังงานไฟฟ้าและพลังงานน้ำมัน ดังภาพที่

2-2



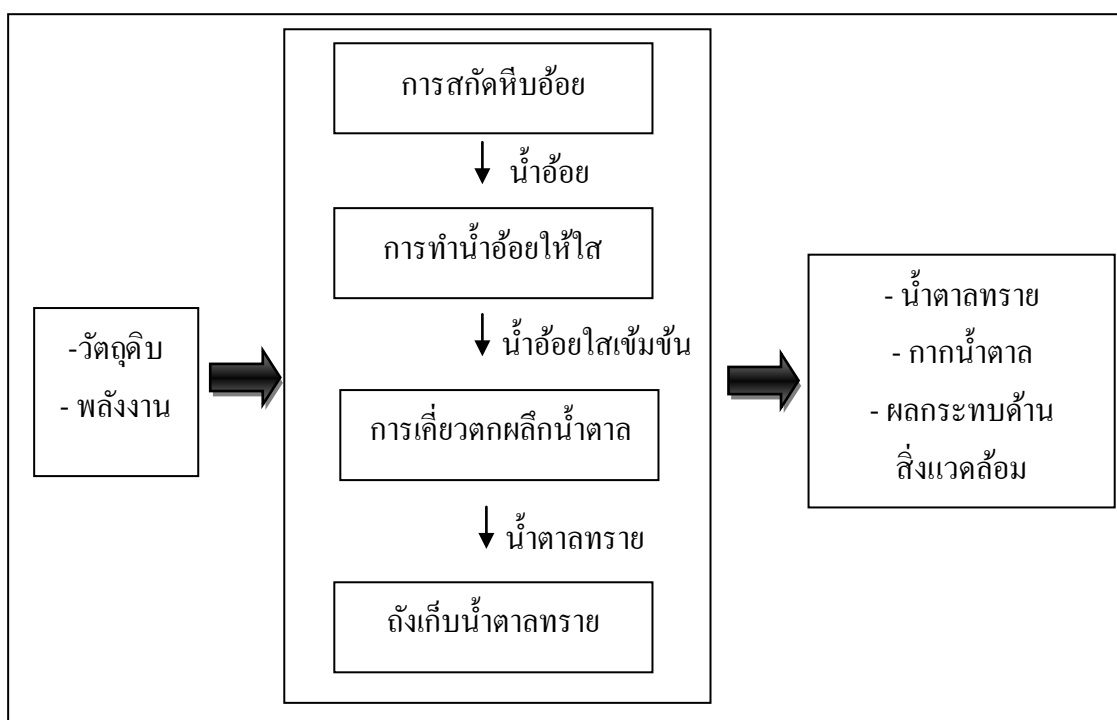
ภาพที่ 2-2 การประเมินวัฏจักรชีวิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการเพาะปลูกอ้อย (นุชนาถ ลอยจิว, 2551)

ขั้นตอนที่สอง เป็นขั้นตอนการขนส่งอ้อยจากไร่ของเกษตรกรไปยังโรงงานผลิตน้ำตาล ซึ่งการขนส่งจะก่อให้เกิดมลพิษจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงต่อสิ่งแวดล้อม ดังภาพที่ 2-3



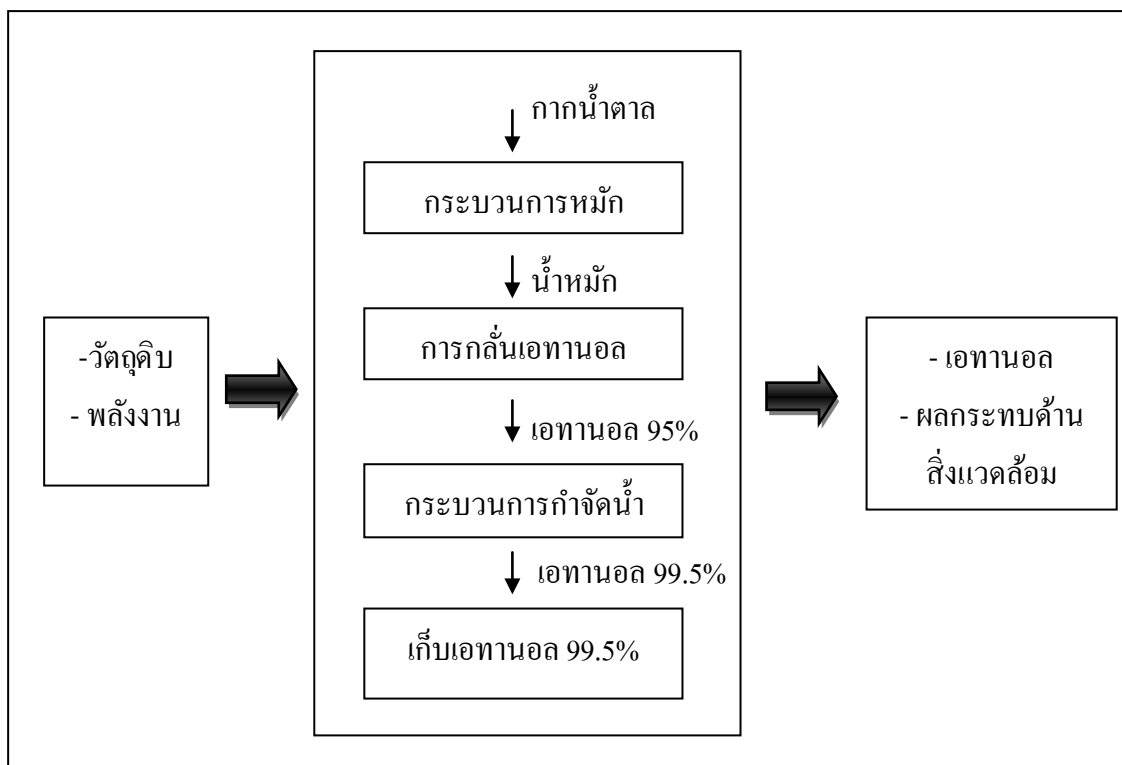
ภาพที่ 2-3 การประเมินวัฏจักรชีวิตผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนการขนส่ง (นุชนาถ ลอยจิว, 2551)

ขั้นตอนที่สามคือ ขั้นตอนการผลิตน้ำตาลทราย เพื่อให้ได้กากน้ำตาลมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ซึ่งประกอบด้วย การสกัดหีบอ้อยเพื่อเอาน้ำอ้อย จากนั้นเข้าสู่กระบวนการทำน้ำอ้อยให้ใสและเคี่ยวให้ได้น้ำอ้อยใสเข้มข้น จนตกผลึกเป็นน้ำตาล และนำไปปั่นเพื่อให้ได้น้ำตาลทรายบริสุทธิ์ โดยในขั้นตอนนี้จะได้กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ ซึ่งกระบวนการผลิตน้ำตาลส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทางด้านการใช้พลังงานไฟฟ้า ดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 การประเมินวัฏจักรชีวิตผลิตภัณฑ์ในกระบวนการผลิตน้ำตาล(นุชนาถ ลอยจิว, 2551)

ในขั้นตอนที่สี่ คือ ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล ซึ่งกระบวนการผลิตหลักประกอบด้วย การหมักและการกลั่นเพื่อเพิ่มความเข้มข้น และการกำจัดน้ำออกจากเอทานอล ทำให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ 99.5% โดยในขั้นตอนนี้ต้องใช้พลังงานไฟฟ้า การเติมแหล่งไนโตรเจน และกรดซัลฟูริก ดังภาพที่ 2-5



ภาพที่ 2-5 การประเมินวัฏจักรชีวิตผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ 99.5%
(นุชนาถ ลอยจิว, 2551)

จากการประเมินประเมินวัฏจักรและต้นทุนวัฏจักรชีวิตของการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ 99.5% ได้แบ่งเป็น 4 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการเกษตร ขั้นตอนการขนส่ง ขั้นตอนการผลิต น้ำตาลและขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอทานอล 99.5% ซึ่งพบว่าในแต่ละขั้นตอนมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ในขั้นตอนการเพาะปลูกอ้อย จะมีการใช้ปุ๋ยเคมี สารกำจัดวัชพืช น้ำ และพลังงานไฟฟ้า ส่วนในขั้นตอนการผลิตเอทานอลและทำเอทานอลให้บริสุทธิ์ มีทั้งผลกระทบจากการใช้พลังงานไฟฟ้า การใช้กากน้ำตาล น้ำ ยีสต์ สารเคมีต่าง ๆ เช่น ยูเรีย กรดซัลฟิวริก เป็นต้น

นุชนาถ ลอยจิว (2551) ได้ทำการศึกษาพบว่า การผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ 99.5% ในปริมาณ 1 ลิตร จะใช้พลังงานใน 3 ขั้นตอน คือ 1.1, 1.75 และ 8.67 เมกะจูล และเมื่อทำการประเมิน LCA ด้วยวิธี Environmental design of industrial product (EDIP) พบว่า ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอทานอล 99.5% ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากที่สุด รองลงมาคือ กระบวนการทางเกษตร และลำดับสุดท้ายคือ ขั้นตอนการขนส่ง โดยประเภทของค่าผลกระทบที่เกิดตลอดวัฏจักรการผลิตเอทานอล พบว่าเกิดมลพิษที่สะสมในดินที่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ 32% เกิดมลพิษสะสมในน้ำที่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ 17% และเกิดการสะสมสารพิษต่อระบบนิเวศในน้ำ 15%

2. การปนเปื้อนของแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเอทานอล

2.1 แบคทีเรียปนเปื้อนและผลกระทบ

การปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเอทานอลเป็นปัญหาสำคัญในกระบวนการผลิต ซึ่งแบคทีเรียจำนวนมากเหล่านี้เข้าสู่ระบบจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต (Paul, 2010) การปนเปื้อนส่งผลต่อประสิทธิภาพของการหมัก โดยอาจร้ายแรงจนต้องปิดระบบการหมักและทำความสะอาดอุปกรณ์ แบคทีเรียที่ปนเปื้อนนี้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Skinner-Nemec et al., 2007) โดยพบว่า จีโนส *Lactobacillus* เป็นจีโนสที่พบได้มาก เนื่องจากสามารถปรับตัวในสถานะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลที่สูง ค่าพีเอชต่ำ อุณหภูมิสูง และสภาวะออกซิเจนที่ต่ำในระหว่างการหมักได้ (Narendranath, Hynes, Thomas, & Ingledew, 1997; Beckner, Lvey, & Phister, 2011) มีรายงานว่าโรงงานผลิตเอทานอลของประเทศเกาหลีที่ใช้มันสำปะหลังและข้าวบาร์เลย์เป็นวัตถุดิบ มีการปนเปื้อนจาก *Lactobacillus fermentum*, *L. salivarius* และ *L. casei* (Skinner & Leather, 2004) ในขณะที่โรงงานผลิตเอทานอลของประเทศบราซิลที่ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบพบการปนเปื้อนจาก *L. fermentum* และ *L. vini* (Lucena et al., 2010) สำหรับโรงงานในประเทศไทย ในโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบพบการปนเปื้อนของ *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. buchneri* รวมทั้ง *Pediococcus damnosus* (ศิริ โนม ทุงแก้ว และพิริยา พัฒนาเจริญสุข, 2557)

แบคทีเรียที่ปนเปื้อนต้องการสารอาหารเพื่อนำมาใช้ในการเจริญ เช่นเดียวกับยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ทำให้เกิดการแข่งชันกับยีสต์ในการใช้สารอาหาร ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง รวมถึงแบคทีเรียแลคติกจะผลิตกรดแลคติกและกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งกรดเหล่านี้เป็นกรดอ่อน โดยกรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์แล้วจะแตกตัวและปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน (H^+) ส่งผลทำให้ไซโตพลาซึมของเซลล์ยีสต์มีภาวะความเป็นกรด นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าสารประกอบอื่น ๆ ที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น เช่น Diacetyl (2,3-butandione), กรดไขมัน เช่น Hydroxylated fatty acids ที่ผลิตจาก *L. plantarum* มีผลต่อยีสต์ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Reuterin (3-hydroxy propionaldehyde) ที่ผลิตโดย *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. coolinoide* และ *L. coryniformis* มีผลต่อโปรตีนของเซลล์ยีสต์ ทำให้สัทธิภาพการทำงานของเซลล์ยีสต์และผลผลิตเอทานอลลดลง (Paul, 2010; Beckner et al., 2011) มีรายงานว่า การมีแบคทีเรียแลคติกประมาณ 4.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่การหมัก 30 ชั่วโมง ส่งผลต่อผลผลิตเอทานอลลดลง 17% รวมถึงยีสต์มีการใช้คาร์โบไฮเดรตลดลงและน้ำหมักมีความเป็นกรดสูงขึ้น (Makanjuola, Tymon, & Springham, 1992)

2.2 แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนหรือกลม ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส แต่บางชนิดอาจมีเอนไซม์คะตะเลสเทียม (Pseudocatalase) ทนต่อความเป็นกรด และสร้างกรดแลคติก (Lactic acid) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลักในระหว่างการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยที่อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีมานี้ โดยในปัจจุบันกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกประกอบด้วย 12 จินัส คือ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* (Holzapfel, Haberer, Geisen, Bjorkroth, & Schillinger, 2001; Axelsson, 2004) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีบทบาทหน้าที่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลื้อยคลานและมนุษย์

Axelsson (2004) กล่าวว่า การจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับจินัส จะอาศัยรูปร่างของเซลล์ เช่น รูปกลม รูปท่อน เป็นต้น การเรียงตัวของเซลล์ เช่น คู่สี่ โซ่ และคู่ การเจริญที่ระดับพีเอช 4.4 หรือ 9.6 การทนต่อความเค็ม อุณหภูมิในการเจริญและการหมักน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากแบคทีเรียแลคติก มีวิธีการหมักน้ำตาลที่แตกต่างกัน โดยแบ่งเป็นแบบ Homolactic fermentation และ Heterolactic fermentation โดยกลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ Homolactic fermentation จะได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว หรือตั้งแต่ 80% จากการสลายน้ำตาลกลูโคส ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof-Parnas; EMP หรือ Embden-Meyerhof) ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ ได้แก่ *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางสปีชีส์ ส่วน Heterolactic fermentation เป็นการหมักที่ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอทานอล และให้ผลผลิตอีกหลายชนิด คือ กรดแลคติก 50% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20 – 25% และกรดอะซิติก 20 – 25% โดยผ่านวิถี Phospho ketolase (6-phosphogluconate) เช่น *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางสปีชีส์ (Axelsson, 2004; Endo & Dicks, 2014) อย่างไรก็ตาม วิธีการจัดจำแนกสปีชีส์ตามลักษณะของพีโนไทป์และทางชีวเคมี ไม่สามารถจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ทุกจินัส จึงนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นวิธีจัดจำแนกที่มีความน่าเชื่อถือ ง่ายและรวดเร็ว (Balcazar et al., 2007)

2.3 การควบคุมการปนเปื้อน

การปนเปื้อนจากแบคทีเรียอื่นสามารถเกิดขึ้นได้ในแต่ละขั้นตอนของการหมักเอทานอล แม้จะมีการลดการปนเปื้อน เช่น การทำความสะอาดอุปกรณ์และถังหมักที่อุณหภูมิสูงกว่า

70 องศาเซลเซียส การให้ความร้อนกับวัตถุดิบ การเติมสารฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ ในน้ำหมัก เช่น Potassium metabisulfite, Hydrogen peroxide, 3,4,4' Trichlorocarbanilide (Narendranath et al., 1997) รวมทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Penicillin G, Streptomycin, Tetracycline, Virginiamycin และ Monensin เป็นต้น (Skinner & Leather, 2004) แต่ก็ยังไม่ได้ผลมากนัก ซึ่งสาเหตุหนึ่งก็คือ แบคทีเรียสามารถก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบนพื้นผิวถังหมักและอุปกรณ์การผลิต ทนต่อสารฆ่าเชื้อ (Skinner-Nemec et al., 2007; Muthaiyan & Ricke, 2010; Joseph et al., 2011; Leathers et al., 2014) อีกทั้งไบโอฟิล์มยังเป็นแหล่งของการปนเปื้อนซ้ำในถังหมักเอทานอล (Muthaiyan & Ricke, 2010)

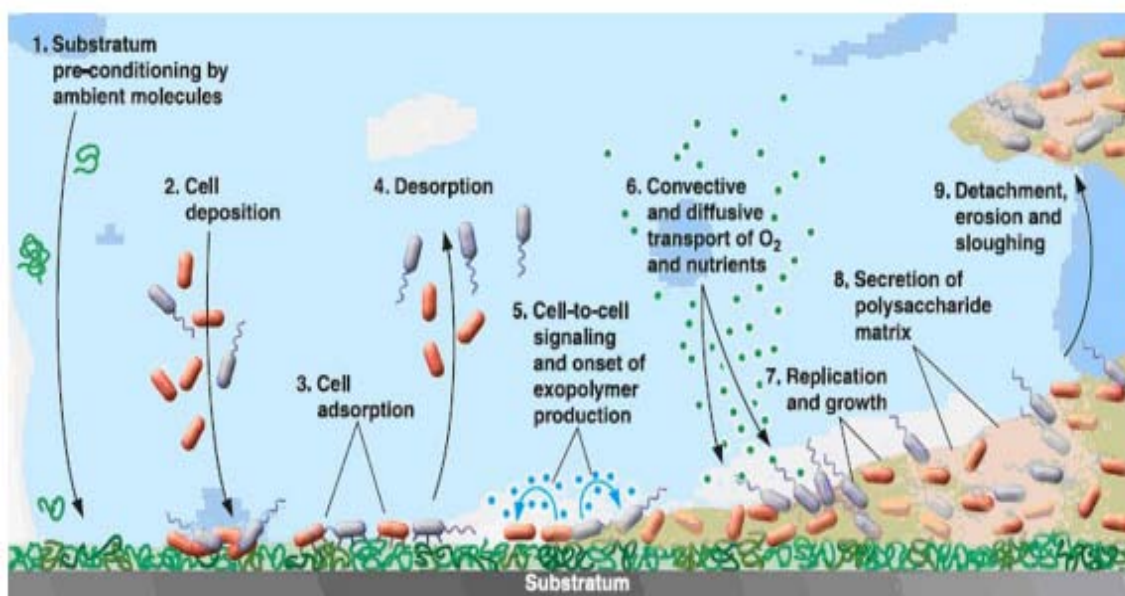
3. ไบโอฟิล์ม

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) คือ กลุ่มชั้นของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว ที่เจริญอยู่บนพื้นผิวต่าง ๆ ทั้งเหล็ก ไม้ เนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตและอื่น ๆ โดยมีเมทริกซ์ของ โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide matrix) ปกคลุมเพื่อยึดเกาะและอาศัย เพิ่มจำนวนอยู่บนพื้นผิวนั้น ๆ โครงสร้างที่มีจุลินทรีย์มารวมตัวกัน อาจมีจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือหลายชนิด องค์ประกอบสำคัญของไบโอฟิล์มมี 3 องค์ประกอบ คือ จุลินทรีย์ สาร Glycocalyx และพื้นผิว ซึ่งสาร Glycocalyx ถือเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ไบโอฟิล์มไม่หลุดออกจากพื้นผิว สารนี้ทำหน้าที่คล้ายกาว ส่งผลให้แบคทีเรียเจริญเป็นโคโลนิบนพื้นผิวได้อย่างรวดเร็วและเป็นจุดเริ่มต้นที่ก่อให้เกิดโครงสร้างของ Exopolysaccharides หรือ Extracellular polymeric substances (EPS) ที่มีความซับซ้อน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดนิวคลีอิก โปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และสารอาหาร (Donlan, 2002; Kokare, Chakraborty, Khopade, & Mahadik, 2009)

ไบโอฟิล์มสามารถก่อตัวได้บนพื้นผิวหลากหลายชนิด เช่น แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) (Rossoni & Gaylarde, 2000) แผ่นกระจก (Glass slide) (Kawarai et al., 2007) เป็นต้น แต่หนึ่งในปัญหาของไบโอฟิล์มนั้นพบในโรงงานอุตสาหกรรม (Shunmugaperumal, 2010) เช่น การเกิดไบโอฟิล์มในเครื่องจักรผลิตกระดาษ ในถังจ่ายน้ำเยื่อ (Head box) ถังผสม (Mixing tank) ถังเก็บน้ำและสารเติมแต่ง (Storage tank of water and additives) (Rochex & Lebeault, 2007) การเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร (Van Houdt & Michiels, 2010) และการเกิดไบโอฟิล์มในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอล (Josep et al., 2011; Leathers et al., 2014; Skinner-Nemec et al., 2007)

3.1 กระบวนการก่อตัวของไบโอฟิล์ม (Biofilm formation process)

การก่อตัวของไบโอฟิล์มนั้นเริ่มจากการมีบริเวณพื้นผิวที่เหมาะสมและมีการสะสมของสารอินทรีย์และมีความชื้น ทำให้เกิดฟิล์มที่ปรับสภาพ (Conditioning film) บนพื้นผิว จากนั้นจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ที่อยู่ในรูป Planktonic cell จะลงเกาะบนพื้นผิวที่ถูกปรับสภาพ โดยใช้โครงสร้างที่เป็นระยางค์ภายนอกเซลล์ เช่น ฟิมเบรีย (Fimbriae) พิลไล (Pilli) หรือแฟลกเจลลา (Flagella) เรียกว่า เซลล์ลงเกาะ (Sessile cell) ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็นการเกาะกันด้วยแรงยึดเกาะอ่อน ๆ และอาจหลุดได้ (Reversible attachment) หลังจากนั้นจุลินทรีย์เริ่มมีการแบ่งตัวและสร้างเป็นกลุ่มจุลินทรีย์บนพื้นผิว (Colonization) โดยสร้างสาร Extracellular polymeric matrix (EPS) เพื่อปกคลุมโครงสร้างและช่วยปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใน โดยจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวจะเกาะกันด้วยแรงยึดที่แข็งแรงขึ้น (Irreversible attachment) ซึ่งจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มแต่ละชนิดนั้นจะมีการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ ซึ่งเรียกว่า Quorum sensing system เพื่อใช้ควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด เมื่อเวลาผ่านไปไบโอฟิล์มจะขยายตัวและมีความหนาเพิ่มมากขึ้น และเมื่อถึงระยะหนึ่งจะมีไบโอฟิล์มบางส่วนหลุดออกจากพื้นผิวเดิม (Detachment) ซึ่งทำให้จุลินทรีย์อยู่ในรูป Planktonic cell และกระจายไปสู่พื้นผิวบริเวณอื่น เมื่อมีสภาพที่เหมาะสมก็จะเกาะติดพื้นผิวก่อตัวเป็นโครงสร้างไบโอฟิล์ม (ณฐนนท์ ตราฐู, 2551; Mattila, 2002; Shunmugaperumal, 2010) วงจรการเกิดไบโอฟิล์มแสดงดังภาพที่ 2-6



ภาพที่ 2-6 กระบวนการเกิดไบโอฟิล์ม (Bryers & Ratner, 2004)

3.2 การป้องกันและกำจัดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรม

ในโรงงานอุตสาหกรรม การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อเป็นสิ่งจำเป็นในส่วนของกระบวนการผลิตซึ่งมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ส่วนใหญ่การทำความสะอาดมักใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นตามด้วยการใช้สารเคมีและสารฆ่าเชื้อ ซึ่งสารเคมีที่ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวหรือมีส่วนประกอบของอัลคาไลต์ช่วยในการทำลายโปรตีน ในการกำจัดไบโอฟิล์มนั้นต้องมีการทำลาย Extracellular polymeric matrix เพื่อให้สารฆ่าเชื้อสามารถเข้าไปถึงเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในโครงสร้างไบโอฟิล์ม

ในกระบวนการทำความสะอาดสามารถกำจัดจุลินทรีย์ที่อยู่บนพื้นผิวได้ถึง 90% แต่ไม่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด แบคทีเรียจะสะสมตัวได้อีกครั้งในบริเวณอื่นและเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมจะก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม อย่างไรก็ตาม การใช้สารฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะยังคงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการควบคุมและกำจัดไบโอฟิล์ม ซึ่งในปัจจุบันสารฆ่าเชื้อมีหลายชนิด เช่น คลอรีน (Chlorine) คลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide) ไอโอดีน (Iodine) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และกลูตาออลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) เป็นต้น หรือการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น Ampicillin, Chloramphenicol, Penicillin, Tetracycline และ Virginiamycin เป็นต้น ดังนั้นการเลือกใช้สารฆ่าเชื้อต้องมีประสิทธิภาพ ปลอดภัย ใช้งานได้ง่าย และไม่ก่อให้เกิดสิ่งตกค้างที่เป็นพิษในผลิตภัณฑ์ (Ferreira, Pereira, Melo, & Simões, 2010)

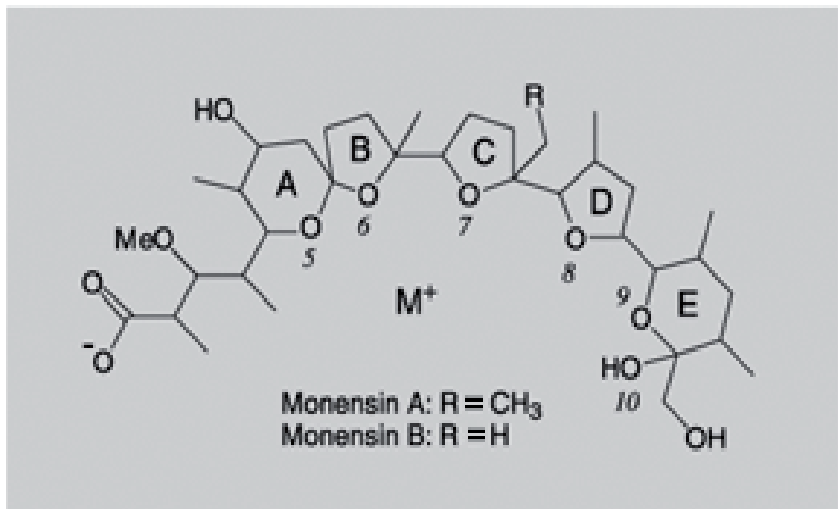
3.3 วิธีการตรวจสอบไบโอฟิล์ม

การตรวจสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวอาจใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่อยู่บนพื้นผิวนั้น ๆ โดยวิธีนับจำนวนโคโลนี ซึ่งเป็นวิธีแบบดั้งเดิม หรือใช้วิธีการย้อมสีเซลล์ที่อยู่ในไบโอฟิล์ม ซึ่งมีทั้งแบบที่ใช้สีย้อม Crystal violet และการย้อมแบบ live/dead ซึ่งการย้อมแบบใช้สี Crystal violet เป็นตัวชี้วัดมวลของไบโอฟิล์มที่ดี โดยจะย้อมติดเซลล์แบคทีเรียและ Extracellular matrix แต่ไม่สามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในไบโอฟิล์มได้ และเป็นประโยชน์สำหรับการถ่ายภาพแผ่นไบโอฟิล์มได้ นอกจากนั้นยังมีวิธี Metabolic assays ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถบ่งชี้ถึงปริมาณของเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตในไบโอฟิล์ม จัดเป็นวิธีการทางอ้อมโดยอาศัยการตรวจสอบการเกิดเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย (Welch, Cai, & Strømme, 2012) โดยทั่วไปการตรวจสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียมักทำบนพื้นผิว 96-well microtiter และตรวจสอบโดยการย้อมสี Crystal violet และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer เป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากทำได้อย่างรวดเร็ว (Kubota, Senda, Nomura, Tokuda, & Uchiyama, 2008) นอกจากนั้นยังมีการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

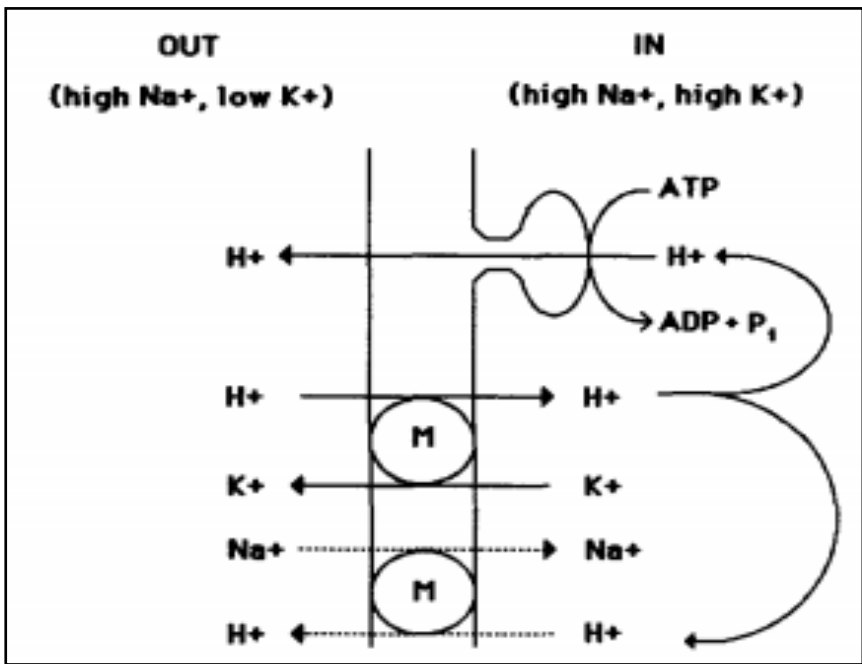
แบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM) จะได้ภาพแบบสามมิติ (Marques et al., 2007) ในขณะที่การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของไบโอฟิล์มด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์และใช้สีย้อมภาพที่เห็นจะเป็นภาพแบบสองมิติ ทำให้รับภาพได้เฉพาะผิวหนังตัวอย่างเท่านั้น และปัจจุบันได้มีการใช้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่มีระบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ที่สามารถรับภาพที่มีความลึกได้ ผิวหน้า (Confocal laser scanning microscope; CLSM) ในการศึกษาไบโอฟิล์ม (ณฐนนท์ตราฐ, 2551)

4. ยาปฏิชีวนะในกลุ่มโมเนนซิน

โมเนนซิน (Monensin) เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มโพลีเอเทอร์ไอโอโนฟอร์ (Polyether ionophore antibiotics) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Streptomyces cinnamonensis* มีโครงสร้างแบบซับซ้อน ประกอบด้วยวงแหวนหลายวง (Pseudomacrocyclic complexes) (ภาพที่ 2-7) ประกอบด้วยไอออนที่มีประจุบวก 1 ประจุ (Monovalent cations) และไอออนที่มีประจุบวก 2 ประจุ (Divalent cations) และมีคุณสมบัติขนส่งไอออนผ่านผนังเซลล์ได้ ยาปฏิชีวนะโมเนนซินมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก โดยจะมีผลรบกวนการขนส่งไอออน ทำให้โซเดียมไอออน (Na^+) ฝั่งในเซลล์ได้มากกว่า การไหลออกของโพแทสเซียมไอออน (K^+) ดังนั้นโพแทสเซียมไอออนจึงแลกเปลี่ยนกับการไหลเข้าของไฮโดรเจนไอออน (H^+) ทำให้มีไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์มากเกินไป เซลล์ต้องใช้พลังงานในรูป ATP เพื่อขับไฮโดรเจนไอออนที่มากเกินไปออกนอกเซลล์ (ภาพที่ 2-8) จึงเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญ แต่ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมลบยาปฏิชีวนะโมเนนซินจะไปกระตุ้นการเจริญให้เพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยจะเพิ่มการผลิตกรดโพธิโอนิก และกรดซัคซินิกในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยในประเทศสหรัฐอเมริกาเริ่มมีการใช้ยาปฏิชีวนะโมเนนซินในปศุสัตว์ ตั้งแต่ปี 1977 ถูกใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (Growth promoter) สำหรับโค และใช้เป็น Coccidiostat สำหรับสัตว์ปีก โดยมีระดับการให้ยาปฏิชีวนะในไก่อยู่ที่ 0.01-0.0121% ส่วนในไก่วงมีค่า 0.006-0.01% ในร่างกายของสัตว์สามารถดูดซึมยาปฏิชีวนะโมเนนซิน ซึ่งถูกเมตาบอลิซึมและขับออกได้อย่างรวดเร็ว และมีค่าระยะเวลาในการขับออกของยา (Drug withdrawal time) อยู่ที่ 3 วัน (Afifi, 2014) แต่ก็มีรายงานการใช้ยาปฏิชีวนะนี้ที่ผิดวิธีก่อให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ได้ เช่น ไก่ นกกระทา สุกร และโค เป็นต้น ซึ่งในประเทศไทยยังไม่ปรากฏรายงานการสะสมของยาปฏิชีวนะโมเนนซินในเนื้อสัตว์ (ปนนท์ ธนเจริญวัชร และละณี สุขถิ่นไทย, 2547; รุจิรักษ์ ฐระกิจ, 2552)



ภาพที่ 2-7 โครงสร้างของโมนนซิน (Lopes, Almeida-Paz, & Gates, 2006)



ภาพที่ 2-8 การทำงานของโมนนซินที่มีผลต่อเบคทีเรียแกรมบวก (Russell, 1987)

ยาปฏิชีวนะ Monensin X เป็นหนึ่งในกลุ่มยาปฏิชีวนะโมเนนซิน มีลักษณะเป็นผลึกเกลือโซเดียม ละลายได้ดีในน้ำและสารละลายอินทรีย์ มีจุดเดือดที่ 267-269 องศาเซลเซียส พีเอช 6-9 นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะในการควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในการหมักเอทานอล มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด ที่พบได้บ่อยในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของ *Lactobacillus* และ *Leuconostoc* แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเซลล์ยีสต์ (Paul, 2010)

Monensin X ละลายในเอทานอล เมื่ออยู่ในถังหมักเอทานอลแล้วจะมีความเสถียรอย่างน้อย 20 วัน ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะการหมักเอทานอลในเชิงพาณิชย์ ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาที่อุณหภูมิสูง ในกากน้ำตาล พบว่า ยา Monensin X มีประสิทธิภาพที่ 2 ชั่วโมง เมื่อมีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และที่ 1.5 ชั่วโมง เมื่อมีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (Paul, 2010) ปัจจุบันโรงงานผลิตเอทานอลในประเทศไทยบางแห่ง ได้มีการนำยาปฏิชีวนะชนิดนี้มาใช้ควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิต โดยใช้ในความเข้มข้นประมาณ 5 ppm (Paul, 2010)

Paul (2010) รายงานว่าประสิทธิภาพของยา Monensin X ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ppm ที่เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปราศจากเชื้อ (Sterilized control) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และชุดควบคุมที่ไม่ปราศเชื้อ (Unsterilized control) ในทวีปอเมริกาเหนือ ซึ่งใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ โดยในแต่ละชุดการทดสอบจะมีหัวเชื้อยีสต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ยีสต์ 18 กรัม ในแป้งที่เป็นวัตถุดิบ 101.56 กรัม) และเติมสารละลายเอนไซม์ 0.126 มิลลิลิตร (700 กรัม ต่อ 378,500 ลิตร) พบว่าเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 46.5 ชั่วโมง ชุดควบคุมที่ปราศจากเชื้อมีความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าในชุดควบคุมที่ไม่ปราศจากเชื้ออยู่ 10% นอกจากนี้พบว่าในชุดที่เติม Monensin X ทั้ง 5 ชุดทดสอบ รวมถึงชุดควบคุมที่ปราศจากเชื้อจะมีความเข้มข้นของกรดแลคติก ความเป็นกรดต่ำกว่าในชุดควบคุมที่ไม่ปราศจากเชื้อ

ในทวีปยุโรปได้ศึกษาประสิทธิภาพของ Monensin X ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ppm โดยใช้กากน้ำตาลจากหัวบีทที่มีปริมาณความเป็นกรดเริ่มต้น คือ 1 กรัมต่อลิตร และมีพีเอช 5.6 ซึ่งทำการทดลองในงานเพาะเชื้อ ในแต่ละงานเพาะเชื้อมีหัวเชื้อของ *Lactobacillus buchneri* ที่ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าที่เมื่อความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น จำนวนแบคทีเรียแลคติกจะลดลง โดยที่ความเข้มข้น 2.0 – 3.0 ppm ที่ 24 ชั่วโมงของการบ่ม พบแบคทีเรียแลคติกน้อยกว่า 2×10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติม Monensin X พบแบคทีเรียแลคติก 4.10×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าเมื่อใช้ Monensin X (ในทุกความเข้มข้น) มีความเป็นกรดลดลง และพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น

มีการทดสอบความปลอดภัยของยา Monensin X ในห้องปฏิบัติการและในฟาร์มเลี้ยงสัตว์สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น หนู (Mouse) ตัวผู้และตัวเมีย มีค่า LD₅₀ คือ 70.0 ± 9.0 และ 98.0 ± 12.0 ตามลำดับ ในกระต่าย แกะ แพะ หมู และไก่ต็อก มีค่า LD₅₀ คือ 41.7 ± 3.6, 11.9 ± 1.2, 26.4 ± 4.0, 16.7 ± 3.6 และ 95.0 ± 11.0 ตามลำดับ

Paul (2010) รายงานว่าการได้รับสัมผัสของยาปฏิชีวนะโมเนนซินความเข้มข้น 2.53±0.39 มิลลิกรัมต่อลิตร ในหนูตัวผู้และตัวเมียอย่างละ 10 ตัว เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าหนูทั้งหมดรอดชีวิตหลังจากได้รับสัมผัสนี้ แต่จะมีการเคลื่อนไหวที่ช้าลง ซึ่งจะหายเป็นปกติภายใน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าการสูดดมยาปฏิชีวนะโมเนนซินแบบกึ่งเรื้อรังในสุนัขพันธุ์บีเกิ้ลในตัวผู้และตัวเมีย โดยให้รับสัมผัสยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.08, 0.15 และ 0.84 ไมโครกรัมต่อลิตร ในเวลา 6 ชั่วโมงต่อวัน 5 วันต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 90 วัน ซึ่งจะได้รับสัมผัสทั้งหมด 65 ครั้ง และนำมาหาค่าน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะ และระดับยาปฏิชีวนะโมเนนซินในเลือด เป็นต้น พบว่ายาปฏิชีวนะนี้ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและอวัยวะ ส่วนระดับโมเนนซินในเลือดกลับไม่มีความสัมพันธ์กันกับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและในช่วงระยะเวลาของการทดสอบจะไม่สามารถตรวจพบได้ โดยที่ระดับความเข้มข้นของยา 0.84 ไมโครกรัมต่อลิตร ถือว่ามีความเป็นพิษต่อสุนัขแต่ที่ระดับความเข้มข้นของยา 0.15 ไมโครกรัมต่อลิตร ถือว่าไม่มีพิษต่อสุนัข และพบว่ายาปฏิชีวนะโมเนนซินมีผลต่อหัวใจและหลอดเลือดในสุนัข ที่ความเข้มข้น 0.035 และ 0.69 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าเส้นเลือดดำพบว่ายาปฏิชีวนะทั้งสองความเข้มข้นมีผลต่อการหดตัวของหัวใจ ความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจและการไหลเวียนของหลอดเลือดหัวใจ

ในการศึกษาความปลอดภัยของยาปฏิชีวนะโมเนนซินต่อสิ่งแวดล้อม พบว่าการย่อยสลายยาปฏิชีวนะโมเนนซินที่ระดับความเข้มข้นของยาเริ่มต้นประมาณ 1 ppm ในดิน โดยพบว่ายาปฏิชีวนะสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในดิน ซึ่งในตัวอย่างดินที่มีมูลสัตว์ พบว่ามีตัวอย่างเพียง 22% ที่ตรวจพบยาปฏิชีวนะในดินหลังจาก 5 วัน และไม่พบปฏิกิริยาจากยาปฏิชีวนะโมเนนซินหลังจาก 12-14 วัน ส่วนในตัวอย่างดินที่ไม่มีมูลสัตว์ พบว่ามีประมาณ 50% ที่พบยาปฏิชีวนะในดินหลังจาก 5 วัน และไม่พบปฏิกิริยาจากยาปฏิชีวนะโมเนนซิน หลังจาก 28 วัน โดยผลของยาปฏิชีวนะโมเนนซินในดินต่อพืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ ต้นพริก และต้นมะเขือเทศ เป็นต้น พบว่ายาปฏิชีวนะที่อยู่ในดินจะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษเมื่ออยู่ที่อัตรา 1.12 – 2.24 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ โดยสังเกตได้ว่าเมื่อมีอัตราของยาปฏิชีวนะอยู่ที่ 4.48 – 8.96 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ ส่งผลให้พืชได้รับบาดเจ็บในระดับปานกลาง นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการชะล้างของดิน โดยศึกษาในคอลัมน์ภายในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบลักษณะการชะล้างของยาปฏิชีวนะโมเนนซินในดิน 4 ประเภท คือ ทราย ดินร่วนปนทราย ดินร่วนและดินร่วนเหนียวปนตะกอน พบว่าทราย

และดินร่วนปนทรายมีการชะล้างของยาปฏิชีวนะโม่เนนซินได้มากกว่าในดินร่วนและดินร่วนเหนียวปนตะกอน (Paul, 2010)

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

de Oliva-Neto and Yokoya (2001) ศึกษาผลของยาปฏิชีวนะต่อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากโรงกลั่นเอทานอลของประเทศบราซิล คือ *Lactobacillus fermentum* และ *Leuconostoc mesenteroides* โดยการหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) พบว่ายาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง ได้แก่ Acid penicillin V มีค่า MIC ระหว่าง 0.10-0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Clindamycin มีค่า MIC อยู่ที่ 0.05-0.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารเคมีที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ Sodium sulphite (มีค่า MIC อยู่ที่ 10-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Nitrite (มีค่า MIC <117 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Copper sulphate (มีค่า MIC ระหว่าง 75-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับ Zinc, Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate และ Dimethyldithiocarbamate ยับยั้งแบคทีเรียได้ต่ำ โดยมีค่า MIC > 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ Methylthiocarbamate ยับยั้ง *L. fermentum* ที่ค่า MIC 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้ง *S. cerevisiae* ที่ค่า MIC 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน Thiocyanate, Bromophenate และ n-alkyldimethylbenzylammonium chloride มีผลยับยั้ง *S. cerevisiae* ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกันกับ *L. mesenteroides* หรือ *L. fermentum* โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 1.2-5.0, 9-18 และ 1-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ Formaldehyde มีผลต่อแบคทีเรียมากกว่ายีสต์ ที่พีเอช 4.5 และ 6.5 โดยมีค่า MIC ระหว่าง 11- 23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 46-92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Skinner and Leathers (2004) รายงานจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการผลิตเอทานอลของโรงงานที่ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ ในระยะเวลา 9 เดือน โดยเก็บตัวอย่างจากน้ำแช่ข้าวโพด (Steep water) ก่อนและหลังการพาสเจอร์ไรซ์ และจากถังหมักเอทานอลที่ใช้กระบวนการแบบต่อเนื่องของโรงงานที่ย่อยข้าวโพดด้วยวิธี Wet mill ตั้งแต่เดือนธันวาคม ปี 2002 และในเดือนกุมภาพันธ์ เมษายน และตุลาคม ปี 2003 พบว่าจำนวนแบคทีเรียในน้ำแช่ข้าวโพด มีประมาณ 10^4 - 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนในถังหมักพบว่าแบคทีเรีย 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อนำมาจัดจำแนกพบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* มากที่สุด ประมาณ 44-60% ของไอโซเลตทั้งหมด โดยสปีชีส์ที่พบได้แก่ *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. crispatus* และพบ *Bifidobacterium* ในตัวอย่างที่เก็บในเดือนกุมภาพันธ์ ปี 2003 เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบ

Clostridium, *Eubacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Weissella* ในขณะที่โรงงานที่ย่อยข้าวโพดด้วยใช้วิธี Dry grind โรงงานที่ 1 ซึ่งใช้ถังหมักแบบ batch 3 ถึง ทำการเก็บตัวอย่างเดือนธันวาคม และเมษายน ปี 2003 พบว่าในถังเลี้ยงยีสต์ (Yeast propagation) ที่เติมยาปฏิชีวนะ Virginiamycin มีจำนวนแบคทีเรียต่ำคือ ประมาณ $3 \times 10^3 - 2 \times 10^4$ CFU ต่อมิลลิลิตร และในระหว่างการหมักพบว่ามีจำนวนของแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ที่ $10^5 - 10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาที่ 12-18 และลดลงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อนำไอโซเลตทั้งหมดมาจัดจำแนกพบว่าเป็น *Lactobacillus* มากที่สุด ประมาณ 37-39% ของไอโซเลตทั้งหมด โดยพบ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* มากที่สุด แต่ไม่พบ *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่พบมากในโรงงานที่ย่อยข้าวโพดโดยวิธี wet mill ส่วนโรงงานที่ย่อยข้าวโพดด้วยใช้วิธี Dry grind แห่งที่ 2 ซึ่งใช้ถังหมักแบบ Batch เพียงถังเดียวและใช้ยาปฏิชีวนะ Virginiamycin ทำการเก็บตัวอย่างในเดือนธันวาคม ปี 2002 และเดือนกุมภาพันธ์ พฤษภาคม และตุลาคม ปี 2003 พบว่าจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นอยู่ที่ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และเจริญสูงสุดอยู่ที่ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยไอโซเลตที่พบเป็น *Lactobacillus* มากที่สุด เช่นเดียวกันโดยคิดเป็นสัดส่วนประมาณ 69-87% ของไอโซเลตทั้งหมด

Skinner-Nemece et al. (2007) ศึกษาแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในโรงงานผลิตเอทานอล โดยทำการแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างในถังหมักของโรงงานที่ใช้กระบวนการแบบต่อเนื่อง ซึ่งใช้ข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแบบ wet mill เป็นวัตถุดิบ ได้ทั้งหมดจำนวน 116 ไอโซเลต และนำตัวอย่างมาเตรียมไปไอฟิล์มบนพื้นผิวเหล็กกล้าปลอดสนิมด้วยเครื่อง CDC biofilm reactor พบว่าไอโซเลตที่แยกได้จากบนพื้นผิว (ไปไอฟิล์ม) มี 129 ไอโซเลต เมื่อนำโคโลนีทั้งหมดจำนวน 245 ไอโซเลต มาจำแนกด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL และ Biolog พบว่าสปีชีส์ที่พบมากในตัวอย่างจากถังหมัก ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *L. reutrei* และในไปไอฟิล์ม ได้แก่ *L. amylovorus*, *L. vaginalis* และ *L. fermentum* ส่วนสปีชีส์ที่พบได้น้อยในไปไอฟิล์ม ได้แก่ *L. delbrueckii* และ *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่งไอโซเลตที่พบนั้นไม่สามารถจัดจำแนกด้วย 2 วิธีนี้ได้ทั้งหมด จึงนำวิธีจัดจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มาเปรียบเทียบกับการใช้วิธี Phenotypic method ที่ใช้จำแนกไอโซเลตที่พบในตัวอย่างถังหมักและในไปไอฟิล์ม พบว่าไอโซเลตที่จัดจำแนกไม่ได้ เมื่อใช้วิธีทางอนุพันธุศาสตร์ สามารถจัดจำแนกได้แก่ *Staphylococcus*, *Clostridium* species และ *L. panis* ในขณะที่ *L. crispatus*, *L. citreum* และ *L. amylovorus* จัดจำแนกได้เป็น *L. amylovorus* ซึ่งพบมากที่สุด ในตัวอย่างของไปไอฟิล์ม

Kawarai et al. (2007) ศึกษาการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ *L. helveticus* B-1, *L. bulgaricus* B-56, *L. casei* L-14, *L. acidophilus* L-54 และ *S. cremoris* H-61 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างโยเกิร์ต ส่วนอีก 5 สายพันธุ์นำมาจากแหล่งรวบรวมสายพันธุ์ คือ *L. mesenteroides* IAM 1064, *P. acidilactici* IAM 1233, *L. paracasei* subsp. *paracasei* IFO3533, *L. sakei* IFO3541 และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* IFO3831 สายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาใช้ คือ *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A, Kyokai-6, Kyokai-7, Kyokai-9, Kyokai-10, Kyokai-11, Kyokai-12, Kyokai-13, IAM 4125, IAM 4140, IAM 4178, IAM 4274 และ IAM 4954 โดยนำมาศึกษาการก่อตัวของไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม บนพื้นผิวของ Microtiter plate พบว่าเมื่ออยู่แบบเชื้อเดี่ยวทุกสายพันธุ์สร้างไบโอฟิล์มได้ ในขณะที่เมื่ออยู่ร่วมกับยีสต์ แบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สร้างไบโอฟิล์ม เช่น *S. cerevisiae* Kyokai-10 กับ *L. casei* subsp. *rhamnosus* IFO3831 จากนั้นนำมาศึกษาการก่อตัวของไบโอฟิล์มของเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* Kyokai-10 และ *L. casei* subsp. *rhamnosus* IFO3831 บนพื้นแผ่นแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมสีแกรม พบว่าเซลล์แบคทีเรียเกาะติดกับพื้นผิว ในขณะที่เซลล์ยีสต์เกาะอยู่ด้านบนของเซลล์แบคทีเรีย และมี Protrusion ยื่นออกมาจากพื้นผิวของเซลล์ นอกจากนี้ยังตรวจสอบไบโอฟิล์มโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดอีกด้วย

Lucena et al. (2010) แยกแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพของโรงกลั่น 4 แห่ง ที่ตั้งอยู่ในประเทศบราซิล ระหว่างปี 2007 – 2008 โดยโรงกลั่น 1 แห่งใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ และอีก 3 แห่งใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบ พบว่ามีจำนวนอยู่ที่ 6×10^5 - 8.9×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาจัดจำแนกสปีชีส์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบในวันแรกและในวันสุดท้ายของกระบวนการผลิตจากทั้ง 4 แห่งนั้น คือ *L. fermentum*, *L. vini*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. diolivorans*-like, *L. ferintoshensis*, *L. plantarum*, *L. manihotivorans*, *L. mucosae*, *L. nagelii*, *Oenococcus kitaharae*-like, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus* sp. และมีจำนวนหนึ่งไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ ซึ่งสปีชีส์ที่มีจำนวนมากที่สุดในระยะเวลา 30 วันของกระบวนการหมัก ในโรงกลั่น Miriri และ Japungu คือ *L. plantarum* ส่วนในโรงกลั่น Trapiche พบ *Weissella paramesenteroides* มากที่สุด และในวันสุดท้ายของกระบวนการหมัก (30 วัน) พบ *L. fermentum* และ *L. vini* มากที่สุด

Rich, Leathers, Nunnally and Bischoff (2011) ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในถังหมักเอทานอลของโรงงานที่ใช้ข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแบบ Dry grind โดยศึกษา

บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม บนเครื่อง CDC biofilm reactor นำไอโซเลตที่ได้มาแยกแบคทีเรียและจัดจำแนกด้วยวิธีทางพีซีอาร์ พบว่าทั้งหมด 10 ไอโซเลต โดยเป็น *Lactobacillus fermentum* 6 ไอโซเลต *L. johnsonii* 2 ไอโซเลต *L. mucosae* และ *L. amylovorus* อย่างละ 1 ไอโซเลต ซึ่งในถังหมักเอทานอลของโรงงานนี้ใช้ยาปฏิชีวนะ Virginiamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 0.13 ppm (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยศึกษาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ Virginiamycin ต่อทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-16 ppm โดยไอโซเลตที่ไวต่อยาปฏิชีวนะได้แก่ *L. fermentum* BR0315#1B, *L. mucosae* BR0315#2B, *L. fermentum* BR0315#5B, *L. fermentum* BR0315#9B และ *L. fermentum* BR0315#10B (MIC < 0.5 mg/ml) จากนั้นนำมาศึกษาการเจริญของไบโอฟิล์มด้วยวิธีการย้อมสี crystal violet พบว่า *L. fermentum* BR0315#6B, *L. fermentum* BR0315#8B และ *L. fermentum* BR0315#9B มีการก่อตัวของไบโอฟิล์มสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 144 เมื่อนำมาศึกษาใน 96 well plate ที่มี Virginiamycin ความเข้มข้น 2 และ 32 ppm พบว่า *L. fermentum* BR0315#6B และ *L. fermentum* BR0315#8B มีการสร้างไบโอฟิล์มสูงที่สุดทั้ง 2 ความเข้มข้นของยาหลังจากนั้นนำมาศึกษาไบโอฟิล์มโดยการเติมยาปฏิชีวนะ ทั้ง 2 ความเข้มข้นนี้ หลังจากมีการเจริญของไบโอฟิล์มที่ 48 ชั่วโมง เติมยาปฏิชีวนะหลังจากมีการเจริญของไบโอฟิล์มที่ 96 ชั่วโมง และเติมยาปฏิชีวนะหลังจากมีการเจริญของไบโอฟิล์มที่ 144 ชั่วโมง พบว่าทั้ง 3 สภาวะนี้ *L. fermentum* BR0315#6B และ *L. fermentum* BR0315#8B มีการสร้างไบโอฟิล์มสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 144

Leathers et al. (2014) ศึกษาแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากโรงงานผลิตเอทานอล ที่ใช้ข้าวโพดที่เตรียมแบบ Dry-grind โดยนำตัวอย่างมาจากถังย่อยแป้ง (Liquefaction tank) ถังเตรียมหัวเชื้อยีสต์ (Prop tank) ถังหมักระยะแรก (Early fermentor) และถังหมักระยะสุดท้าย (Late fermentor) และนำมาจำแนกสปีชีส์โดยใช้ 16S rRNA จากนั้นนำไปศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มบน microtiter plate โดยวัดการสร้างไบโอฟิล์มด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ถ้ามีค่ามากกว่า 0.3 แสดงว่าเซลล์ไบโอฟิล์มมีความหนาแน่นของแบคทีเรียประมาณ $6-7 \log_{10}$ (cfu/cm²) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนทั้ง 6 สายพันธุ์ มี 3 สายพันธุ์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร มากกว่า 0.3 ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม คือ *Lactobacillus fermentum* BR0909#5.10, *L. plantarum* BR0909#5.11, และ *L. brevis* BR0909#5.19 จากนั้นนำมาศึกษาถึงผลของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนต่อการยับยั้งการหมักของยีสต์ที่ใช้ corn mash เป็นวัตถุดิบ พบว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนทั้ง 6 สายพันธุ์ (*L. fermentum* BR0909#5.10, *L. plantarum* BR0909#5.11, *L. brevis* BR0909#5.19, *L. fermentum* BR0909#6.24, *L. plantarum* BR0909#5.38 และ *L. brevis* BR0909#5.37) มีผลยับยั้งการหมักของ *Saccharomyces cerevisiae* โดยลดผลผลิตเอทานอลลง

ประมาณ 15-30 กรัมต่อลิตร และทำให้มีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ (Residual glucose) ประมาณ 30-50 กรัมต่อลิตร

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหมดจะเห็นได้ว่าในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพมักพบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแลคติก ซึ่งสามารถก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ และมีแนวโน้มที่จะทนต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งส่งผลให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลลดลง เนื่องจากทำให้ความสามารถในการหมักและการเจริญของเซลล์ยีสต์ลดลง (Basso et al., 2011)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำหมักจากชั้นตอนต่าง ๆ ของโรงงานผลิตเอทานอลแห่งหนึ่งที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ

จำนวน 8 ตัวอย่าง

2. กากน้ำตาลความเข้มข้น 80 องศาบริกซ์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.1 de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)

3.2 de Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth)

3.3 Potato Dextrose agar (PDA agar)

4. สารเคมี (ภาคผนวก ข)

4.1. สารเคมีและยาปฏิชีวนะสำหรับเพาะแยกแบคทีเรียและหาปริมาณไบโอฟิล์ม

4.1.1 สารละลาย NaCl 0.85 % ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บรรจุในขวดฝาเกลียว

4.1.2 สารละลาย NaCl 0.85 % ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดแก้วฝาเกลียว

ขนาด 16x150 มิลลิเมตร

4.1.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3% (Hydrogen peroxide)

4.1.4 กลีเซอรอล (Glycerol)

4.1.5 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline, PBS)

4.1.6 กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) ความเข้มข้น 15%

4.1.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ความเข้มข้น 1% (W/V) พีเอช 12.5

4.1.8 ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DiAmmonium hydrogen phosphate)

4.1.9 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)

4.1.10 เอทานอล ความเข้มข้น 95%

4.2 ยาปฏิชีวนะ

4.2.1 Cycloheximide (Merck, US) (ภาคผนวก ค)

4.2.2 Monensin X (ได้รับมาจากโรงงานผลิตเอทานอล)

4.3 สารเคมีและวัสดุสำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรีย

- 4.3.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอ TIANamp (Tiangen Biotech, Beijing)
 - 4.3.1.1 GB buffer
 - 4.3.1.2 GD buffer
 - 4.3.1.3 PW buffer
- 4.3.2 Enzymatic lysis buffer
 - 4.3.2.1 Tris-HCl
 - 4.3.2.2 Sodium EDTA
 - 4.3.2.3 Lysozyme (Tiangen Biotech, Beijing)
- 4.3.3 Proteinase K (Tiangen Biotech, Beijing)
- 4.3.4 TE buffer
- 4.3.5 เอทานอลบริสุทธิ์ (Absolute ethanol)
- 4.3.6 อะกาโรส เจล (Agarose gel)
- 4.3.7 เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)
- 4.3.8 ไพร์เมอร์ LAC16F และ ไพร์เมอร์ LAC16R
- 4.3.9 พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer)
- 4.3.10 แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium chloride)
- 4.3.11 *Taq* DNA polymerase
- 4.3.12 Nucleotide triphosphate (dNTP)
- 4.3.13 ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ E.Z.N.A.[®] Cycle Pure Kit (Omega, USA)

5. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 5.1 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (Scientific industries, USA)
- 5.2 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) (BOECO, Germany)
- 5.3 หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติก (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 5.4 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 5.5 แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) ASI 304 ขนาด 10x20x2 มิลลิเมตร
- 5.6 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Automatic thermal cycler) (Biometra, Germany)
- 5.7 โถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) (Merck, USA) และซองสารเคมีกำจัดออกซิเจน (Gas pack) (Becton Dickinson and company, USA)
- 5.8 ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) (Mettler Toledo, USA)
- 5.9 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic cleaner) (Kudos, China)

5.10 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) (LEO รุ่น LEO 1450 VP, UK)

5.11 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus, Japan) และชุดบันทึกภาพ (Moticam 2, China)

5.12 เครื่องวัดความหวาน (Refractometer) (ATAGO, USA)

5.13 เครื่องเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวนอน (Electrophoresis apparatus) (Bio-Rad, UK)

5.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed centrifuge) (Sartorius, Germany)

5.15 เครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point drying, CPD) (Polaron Range รุ่น SC 7501, UK)

5.16 เครื่องเคลือบตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (Ion sputter coater) (Polaron Range รุ่น SC 7620, UK)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาจำนวนและความหลากหลายของแบคทีเรียแลคติก

1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำหมักเอทานอลและการศึกษาด้วยวิธี Wet mount

เก็บตัวอย่างน้ำหมักเอทานอลจากกระบวนการหมักเอทานอลขึ้นตอนต่างๆ ได้แก่ ถึงเลี้ยงยีสต์ ถึงหมัก และถึงน้ำหมักก่อนการกลั่น ตัวอย่างละ 250 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดพลาสติกที่มีฝาปิดสนิท โดยเก็บรักษาบนน้ำแข็ง นำตัวอย่างมาศึกษาจุลินทรีย์โดยวิธี Wet mount ด้วยวิธีของ Fankhauser (2002) ดังนี้

1.1.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากน้ำตาล นำมาหยดลงบนกึ่งกลางของแผ่นสไลด์ที่

สะอาด

1.1.2 ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยทำมุม 45 องศา กับแผ่นสไลด์แล้ววางลงระวางอย่าให้เกิดฟองอากาศ

1.1.3 ตรวจสอบจุลินทรีย์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่า และบันทึกภาพ Moticam 2.0

1.2 การเพาะแยกแบคทีเรียแลคติกและการเก็บรักษาเชื้อ (ดัดแปลงจากวิธีของ Lucena et al., 2010)

1.2.1 การนับจำนวนแบคทีเรียแลคติก

1.2.1.1 ถ่ายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดบรรจุสารละลาย NaCl 0.85% 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}

1.2.1.2 ถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากข้อ 1.2.1.1 ลงในหลอด NaCl 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2}

1.2.1.3 ทำการเจือจางตัวอย่างเช่นเดียวกันเป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางตามต้องการ

1.2.1.4 ถ่ายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางเหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร MRS agar ที่มี Cycloheximide 0.01 % ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำ ทำซ้ำ 2 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในโถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน

1.2.1.5 นับจำนวนโคโลนี บนที่ลักษณะโคโลนีที่พบ

1.2.1.6 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาอย่างน้อย 2 โคโลนีต่อแบบ นำมาข้อมแกรมและทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะเลส ดังนี้ 1) การข้อมแกรม นำโคโลนีมาข้อมแกรมตามวิธีมาตรฐานและตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยแบคทีเรียแลคติกติดสีแกรมบวก รูปท่อน รูปกลม หรือรูปไข่ ไม่สร้างสปอร์ 2) การทดสอบอะเลส นำไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเขี่ยโคโลนีมาแตะบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยแบคทีเรียแลคติกจะให้ผลลบกับการทดสอบนี้ (ไม่เกิดฟองฟู)

1.2.1.7 คำนวณปริมาณแบคทีเรียแลคติก ในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และรายงานผลเป็น log CFU ต่อ มิลลิลิตร

1.2.2 การเก็บรักษาเชื้อ

1.2.2.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกแต่ละไอโซเลตบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในโถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน

1.2.2.2 เพาะโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.2.3 เติมกลีเซอรอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (กลีเซอรอล 30%) แบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก

จัด จำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (สุदारตัน สวานจิตร, 2557) ดังนี้

1.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป TIANamp (Tiangen Biotech,

Beijing)

1.3.1.1 นำแบคทีเรียที่เก็บไว้แต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้ เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3.1.2 ใช้หัวงูเขี่ยเชื้อชุดโคโลนีมาแขวนลอยใน TE buffer ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาดเล็ก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (7,378 xg) เป็นเวลา 2 นาที และเทส่วนใสทิ้ง

1.3.1.3 แวนลอยส่วนของตะกอนเซลล์ใน Enzymatic lysis buffer ปริมาตร 180 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย EDTA 2 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และ Lysozyme ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.1.4 เติมเอนไซม์ Proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ GB buffer ปริมาตร 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.3.1.5 เติมเอทานอลปริมาตร 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายสารผสมลงสู่ Spin column CB3 ที่วางอยู่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (10,625 xg) เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลวที่ไหลออกจากคอลัมน์ และนำคอลัมน์มาวางใน Collection tube เช่นเดิม

1.3.1.6 เติม GD buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (10,625 xg) เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลวที่ไหลออกจากคอลัมน์ และนำคอลัมน์มาวางใน Collection tube เช่นเดิม

1.3.1.7 เติม PW buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (10,625 xg) เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนของเหลวที่ไหลออกจากคอลัมน์ และนำคอลัมน์มาวางใน Collection tube เช่นเดิม (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

1.3.1.8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (10,625 xg) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เมมเบรนภายในคอลัมน์แห้งสนิท

1.3.1.9 วางคอลัมน์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม TE buffer ปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร ลงตรงกลางเมมเบรนเพื่อละลายตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปวางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที (10,625 xg) เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายจีโนมิกดีเอ็นเอ สำหรับนำไปใช้เป็นแม่แบบในการทำพีซีอาร์

1.3.2 การออกแบบไพรเมอร์

1.3.2.1 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกจีสต่างๆ มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Bioedit (Version 7.2.5) และเลือกบริเวณเบสจำเพาะร่วม (Consensus sequence) ของลำดับนิวคลีโอไทด์

1.3.2.2 นำบริเวณเบสจำเพาะร่วมมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>)

1.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และการทำบริสุทธิ์

1.3.3.1 นำสารละลายจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ คือ LAC16F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGG-3') และ LAC16R (5'-TACCTT GTTACGACT TCACCC-3')

1.3.3.2 จัดเตรียมสารละลายในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย พีซีอาร์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ Nucleotide triphosphate ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 2.5 ยูนิต และดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้น 500 นาโนกรัม

1.3.3.3 นำหลอดที่ใส่สารละลายแล้วลงเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งค่าการทำงานดังนี้ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที, อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที ทั้งหมด 35 รอบ และขึ้นตอนสุดท้ายตั้งอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.3.3.4 นำสารละลายจากหลอดปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปทำบริสุทธิ์ โดยใช้ชุด E.Z.N.A.[®] Cycle Pure Kit

1.3.4 การอ่านและวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

1.3.4.1 นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว ส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st Base Pte Co. Ltd. (ประเทศมาเลเซีย) โดยส่งผ่านห้างหุ้นส่วนจำกัด วอร์ด เมดิค (Ward medic ltd partnership) (ประเทศไทย)

1.3.4.2 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการอ่านด้วยไพร์เมอร์แต่ละเส้นมาสร้าง Contig เพื่อเชื่อมต่อข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Bioedit (Version 7.2.5)

1.3.4.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมต่อแล้วไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึง ด้วย EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) จากนั้นวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม MEGA software version 6.0

2. การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว

2.1 การเตรียมแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม

เตรียมแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Choi et al. (2012) ดังนี้

2.1.1 แช่แผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม ขนาด 10x20x2 มิลลิเมตร ในสารละลายกรด ฟอสฟอริก เข้มข้น 15% ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความถี่ 40 กิโลเฮิรตซ์ (kHz) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น

2.1.2 แช่แผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1% (W/V) พีเอช 12.5 และนำไปให้คลื่นเสียงความถี่สูง เช่นเดียวกับในข้อ 2.1.1 นำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น

2.1.3 นำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2 การเตรียม Molasses medium

2.2.1 Molasses medium เข้มข้น 15 องศาบริกซ์ สำหรับเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกและยีสต์

2.2.1.1 เจือจางกากน้ำตาลให้มีความเข้มข้นประมาณ 15 องศาบริกซ์ จากนั้นนำไปแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (1,434 xg) เป็นเวลา 5 นาที โดยทำซ้ำ 2 รอบ

2.2.1.2 เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้มีความเข้มข้น 0.1% เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซัลฟูริก

2.2.1.3 บรรจุในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดละ 20 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.2.2 Molasses medium เข้มข้น 32 องศาบริกซ์ สำหรับทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม

2.2.2.1 เจือจางกากน้ำตาลให้มีความเข้มข้นประมาณ 32 องศาบริกซ์ จากนั้นนำไปแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (1,434 xg) เป็นเวลา 5 นาที โดยทำซ้ำ 2 รอบ

2.2.2.2 เติมไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้มีความเข้มข้น 0.1% เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซัลฟูริก

2.2.2.3 บรรจุในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดละ 18 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแลคติกทดสอบ

2.3.1 เพาะเชื้อแบคทีเรียแลคติกแต่ละไอโซเลตลงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในโถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน

2.3.2 เพาะโคโลนี 1 หลบ ลงใน Molasses medium เข้มข้น 15 องศาบริกซ์ (ข้อ 2.2.1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3.3 นำมาแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (1,434 xg) เป็นเวลา 10 นาที และแขวนลอยเซลล์ในสารละลาย NaCl 0.85% ปรับความขุ่นด้วยเครื่องวัดความขุ่น ให้เท่ากับ MacFarland No. 0.5 จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร

2.3.4 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากข้อ 2.3.3. ลงในหลอดที่มีสารละลาย NaCl 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จนได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ 10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร (ยืนยันจำนวนโคโลนีด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อบนอาหาร MRS agar)

2.4 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว

ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อเดี่ยวตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Marques et al. (2007) ดังนี้

2.4.1 นำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่งลงใน Molasses medium ที่บรรจุในหลอดปั่นเหวี่ยง (ข้อ 2.2.2) ความเข้มข้น 32 องศาบริกซ์

2.4.2 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย (ข้อ 2.3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง

2.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมมาหาปริมาณไบโอฟิล์มตามวิธีในข้อ 2.6

2.5 การหาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในไบโอฟิล์ม

หาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในไบโอฟิล์ม โดยวิธีนับจำนวนโคโลนี ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kobayashi, Oethinger, Tuohy, Procop, and Bauer (2009) ดังนี้

2.5.1 นำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมจากข้อ 2.4.3 มาล้างด้วยสารละลาย PBS 1 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นมาใส่ในหลอดที่มีสารละลาย PBS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2.5.2 นำไปเข้าเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความถี่ 40 กิโลเฮิรตซ์ (kHz) เป็นเวลา 30 นาที

2.5.3 เจือจางส่วนของเหลวด้วยสารละลาย NaCl 0.85 % จนมีระดับความเจือจางที่เหมาะสม

2.5.4 ถ่ายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร

2.5.5 เทอาหาร MRS agar หลอมเหลว (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) ลงในจานอาหารที่มีตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน และรอจนอาหารแข็ง

2.5.6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในโถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน

2.5.7 นับจำนวนโคโลนี ย้อมแกรมและทดสอบคตะเลส เพื่อยืนยันแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้น ตามวิธีในข้อ 1.2.1.6 และคำนวณปริมาณแบคทีเรียแลคติก (log CFU ต่อ มิลลิลิตร)

2.5.8 คำนวณปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกต่อพื้นที่เหล็กกล้าปลอดสนิม (log CFU/cm²)

3. การสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักจำลอง

3.1 การเตรียมแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมและกาน้ำตาล

เตรียมแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่ปราศจากเชื้อและ Molasses medium เข้มข้น 32 องศาบริกซ์ ปริมาตร 490 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 1000 มิลลิลิตร และ Molasses medium เข้มข้น 15 องศาบริกซ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1% และพีเอช 4.5 ตามวิธีเดียวกันกับในข้อ 2.1 และ 2.2

3.2 การเตรียมสารละลายตั้งต้นยา Monensin X

3.2.1 ชั่งยา Monensin X 0.01 กรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้นยา 1000 ppm

3.2.2 กรองยาด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน บรรจุลงในขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ

3.2.3 ถ่ายสารละลายตั้งต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นยาด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้นยา 100 ppm

3.3 การเตรียมเชื้อผสมของยีสต์และแบคทีเรียแลคติก

3.3.1 ผสมตัวอย่างน้ำหมักเอทานอลจาก โรงงานเอทานอล ตัวอย่างละ 2 มิลลิลิตร

3.3.2 ถ่ายตัวอย่างที่ผสมแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน Molasses medium เข้มข้น 32 องศาบริกซ์ ปริมาตร 490 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3 ถ่ายเชื้อลงใน Molasses medium เข้มข้น 32 องศาบริกซ์ ลงในขวดใหม่ จะได้น้ำตาลที่มีเชื้อผสมของยีสต์และแบคทีเรียแลคติกผสม และบ่มเช่นเดียวกับ ข้อ 3.3.2

3.3.4 นับจำนวนเซลล์ยีสต์ในข้อ 3.2.3 โดยใช้ไฮโมไซโตมิเตอร์ และปรับให้ได้จำนวนประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ หากมีเซลล์ยีสต์น้อยกว่า 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เติมเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยง Active dry yeast ในกากน้ำตาลเข้มข้น 15 องศาบริกซ์ นำไปเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแยกเซลล์ยีสต์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (806 xg)

3.3.5 นับจำนวนแบคทีเรียแลคติก โดยใช้วิธีเกลี่ยเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่ผสม Cycloheximide 0.01%

3.3.6 บรรจุกากน้ำตาลที่มีเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลคติกลงในหลอดปั่นเหวี่ยง หลอดละ 19 มิลลิลิตร

3.4 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักจำลอง

ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อผสม โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Kawarai et al. (2007) ดังนี้

3.4.1 นำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่ผ่านการล้างและฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในหลอดที่บรรจุกากน้ำตาลที่มีเชื้อผสม (ข้อ 3.3.6)

3.4.2 การทดสอบแบ่งเป็น 2 ชุด คือ 1) เติมนยา Monensin X ความเข้มข้น 100 ppm (ข้อ 2.4.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้นสุดท้ายของยา 5 ppm และ 2) เติมนเอทานอล 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายยา Monensin X เป็นชุดควบคุม

3.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติก ทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง นอกจากนี้ตรวจสอบปริมาณเซลล์แบคทีเรียแลคติกในรูป Planktonic cell ในน้ำหมักเอทานอล ที่ 24 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 3.5

3.5 การหาปริมาณไบโอฟิล์มและจัดจำแนกเชื้อ

หาปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติก และเซลล์แบคทีเรียแลคติกในรูป Planktonic cell โดยวิธีนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่มี Cycloheximide 0.01 % และนำโคโลนีของไบโอฟิล์มแบคทีเรียแลคติกที่พบจัดจำแนกเชื้อโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 1.3

3.6 การตรวจสอบการสร้างไบโอฟิล์ม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตรวจสอบการสร้างไบโอฟิล์มภายใต้กล้อง SEM โดยวิธีของจักรพันธ์ ถาวรชรา และ จันทนิษฐ์ นพรัตน์อากาศ (2552) ดังนี้

3.6.1 เตรียมแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีไบโอฟิล์มของแบคทีเรียผสม เช่นเดียวกับ การศึกษาในข้อที่ 3.3

3.6.2 นำมาตรึง Osmium tetroxide เข้มข้น 1% ใน สารละลาย PBS 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.6.3 ล้างด้วยสารละลาย PBS 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.6.4 นำมาคั่งน้ำออกด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 70 80 และ 90% และในเอทานอล ความเข้มข้น 100% อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ

3.6.5 นำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical point drying และเคลือบด้วยโลหะหนัก

3.6.6 นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

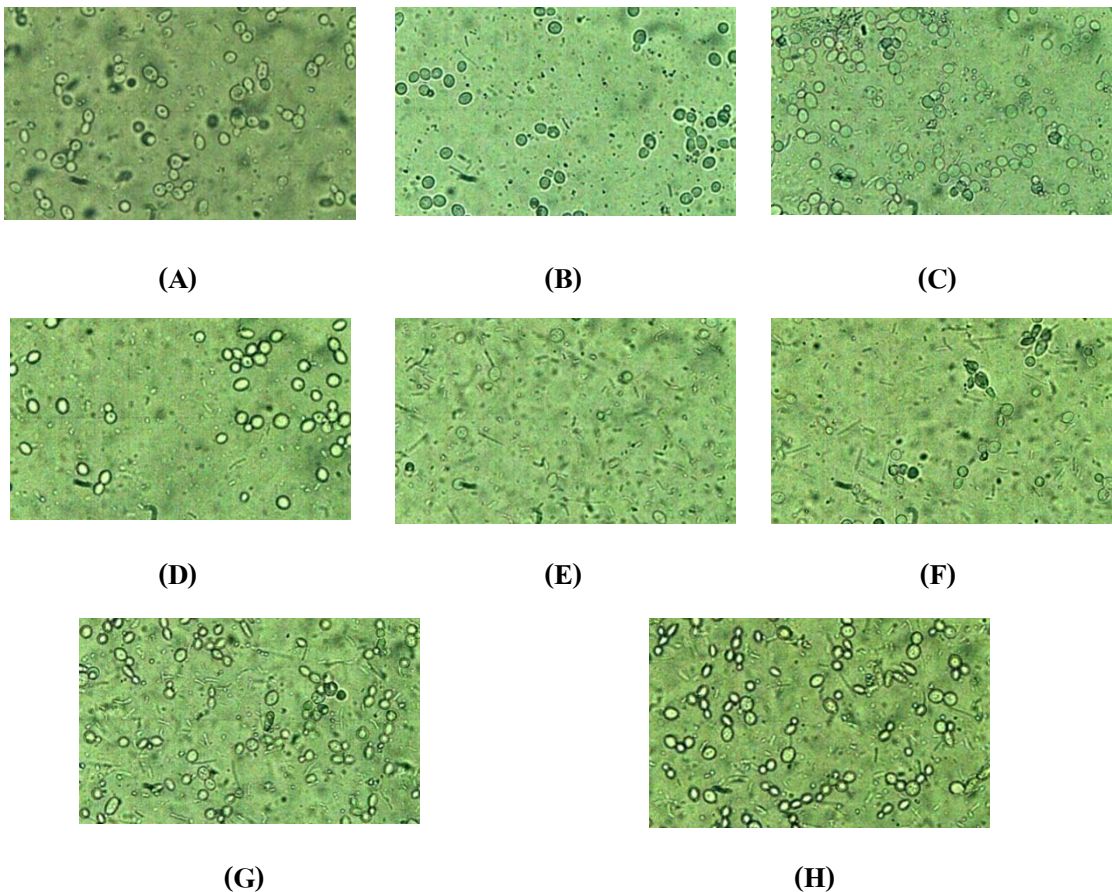
ทำการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม จำนวน 3 รอบ โดยหาค่าเฉลี่ยปริมาณไบโอฟิล์ม วิเคราะห์ข้อมูลของปริมาณไบโอฟิล์มด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.5 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไบโอฟิล์มด้วย Duncan tests ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นอกจากนี้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนในการผลิตเอทานอล

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำหมักเอทานอล

ตัวอย่างน้ำหมักจากกระบวนการผลิตเอทานอลของโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ที่นำมาศึกษามีจำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ถังเลี้ยงยีสต์ 1 ตัวอย่าง ถังหมักเอทานอล 6 ตัวอย่าง (ถังที่ 1-6) และถังเก็บน้ำหมักรอกกลับ 1 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบเซลล์แบคทีเรียในทุกตัวอย่าง โดยเซลล์แบคทีเรียที่พบมีทั้งรูปร่างกลมและรูปร่างท่อน ซึ่งมีความหนาแน่นใกล้เคียงกันกับเซลล์ยีสต์ (ภาพที่ 4-1)

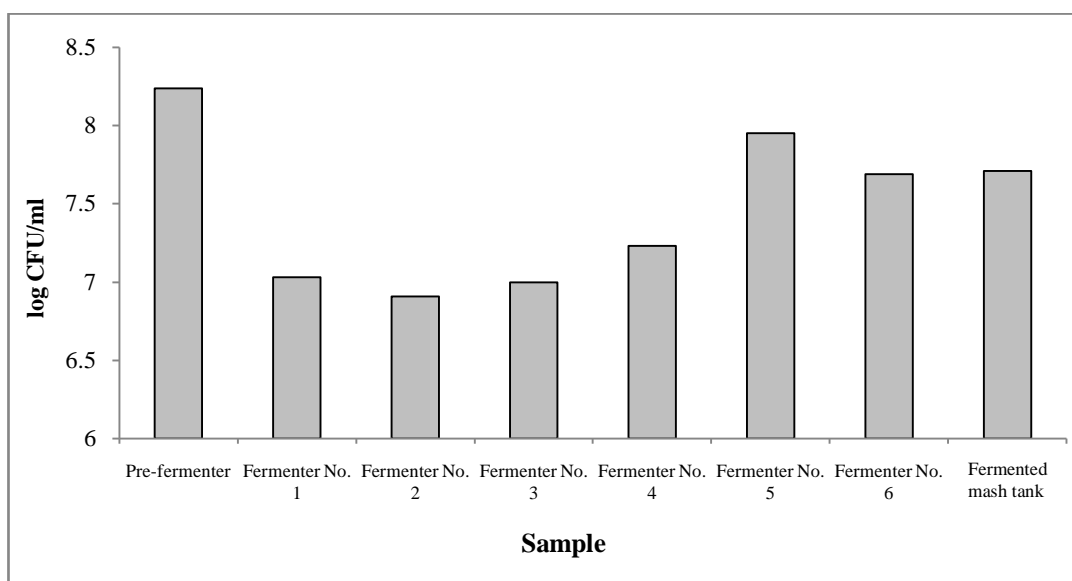


ภาพที่ 4-1 เซลล์ยีสต์และแบคทีเรียในน้ำหมักจากถังเลี้ยงยีสต์ (A), ถังหมักเอทานอลถังที่ 1-6 (B-G, ตามลำดับ) และถังเก็บน้ำหมักรอกกลับ (H) เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

4.2 การแยกแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างน้ำหมักเอทานอล


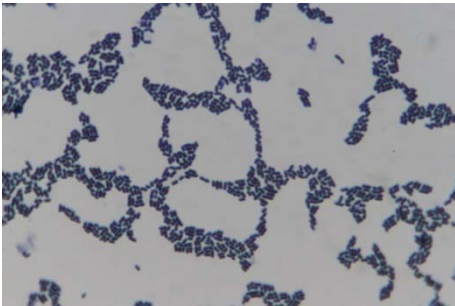

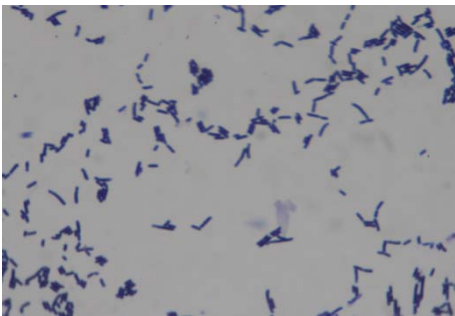
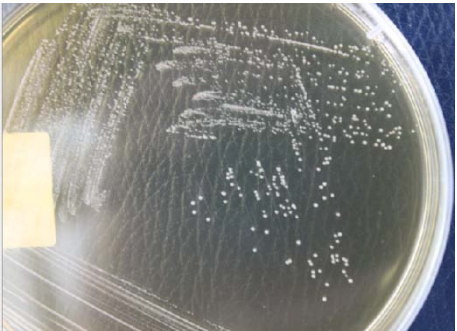
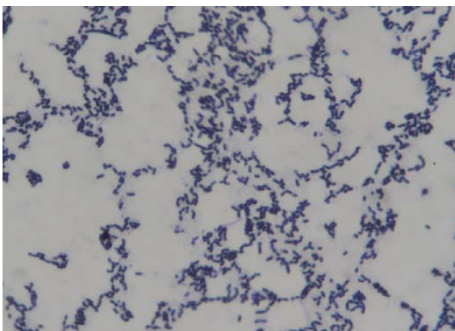
ในการหาปริมาณจำนวนแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างน้ำหมักเอทานอลจากขั้นตอนต่าง ๆ โดยใช้วิธีนับจำนวนโคโลนีบน MRS agar ที่มี Cycloheximide 0.01% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าทุกตัวอย่างมีแบคทีเรียแลคติก โดยมีปริมาณระหว่าง 6.91 – 8.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร โดยมีปริมาณสูงสุดในถังเลี้ยงยีสต์ (Pre-fermenter) รายละเอียดแสดงในภาพที่ 4-2

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันอย่างน้อย 2 โคโลนีต่อแบบมาย้อมแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เพื่อยืนยันแบคทีเรียแลคติกขั้นต้น พบว่าทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เชลล์รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ และให้ผลลบกับการทดสอบอะไมเลส โดยคัดเลือกไอโซเลตที่เป็นตัวแทนแบคทีเรียแลคติกจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ KA 01, KA 02, KA 03, KA 04, KA 05, KA 06 และ KA 07 พบว่าเชลล์มีรูปร่างท่อนทั้งหมด ทั้งรูปท่อนสั้น รูปท่อนปลายมน และรูปท่อนยาว (ตารางที่ 4-1) ซึ่งพบว่าไอโซเลต KA 01 เป็นไอโซเลตที่แยกได้ 7 ใน 8 ตัวอย่าง รองลงมาคือ ไอโซเลต KA 05 และ KA 07 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-2


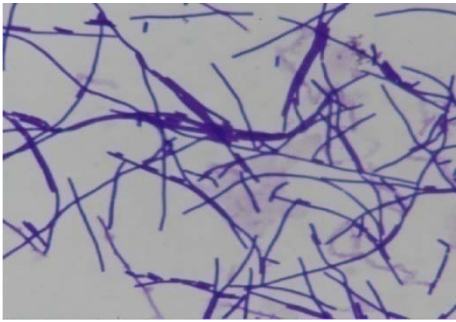

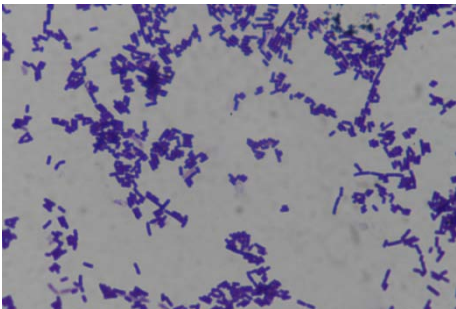

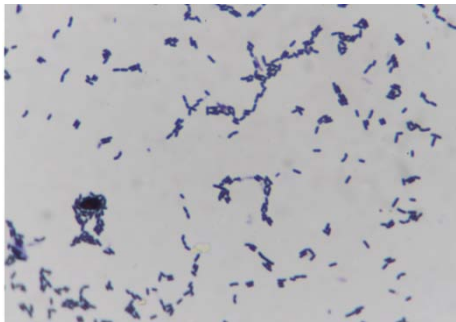


ภาพที่ 4-2 จำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนในกระบวนการหมักเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาล เป็นวัตถุดิบ (log CFU ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้วิธีนับจำนวนแบคทีเรียบน MRS agar ที่มียาปฏิชีวนะ Cycloheximide 0.01% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในโถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน


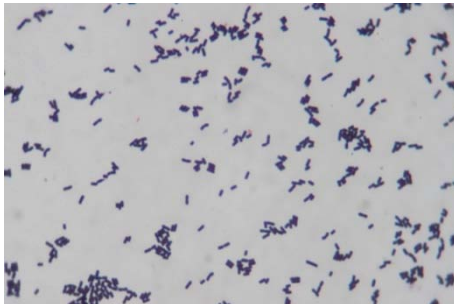
ตารางที่ 4-1 สัมฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของไอโซเลตที่คัดแยกได้จากน้ำหมักเอทานอล

ไอโซเลต	โคโลนี	เซลล์
KA 01	โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมัน ขนาด 1-3 มม.	แกรมบวก รูปท่อน ปลายมน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์
		
KA 02	โคโลนีสีเทาขุ่น กลม นูน ขอบหยัก ผิวมัน ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน ปลายมน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์
		
KA 03	โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมัน ขนาด 0.5-1 มม.	แกรมบวก รูปท่อนสั้น เกือบกลม เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว ไม่สร้างสปอร์
		

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

ไอโซเลต	โคโลนี	เซลล์
KA 04	โคโลนีสีเทาขุ่น แบน ขอบหยัก ผิวหน้าไม่เรียบ ขนาด 1-3 มม.	แกรมบวก รูปท่อนยาว เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยวและแบบเป็นสายไม่สร้างสปอร์
		
KA 05	โคโลนีสีขาวขุ่น แบน ผิวหน้าไม่เรียบ ขนาด 1-3 มม.	แกรมบวก รูปท่อน ปลายมน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์
		
KA 06	โคโลนีสีครีมขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมัน ขนาด 2-4 มม.	แกรมบวก รูปท่อน ปลายมน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว ไม่สร้างสปอร์
		

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

ไอโซเลต	โคโลนี	เซลล์
KA 07	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก ตรงกลางนูน สีขาวขอบสีเทา ขนาด 1 มม.	แกรมบวก รูปท่อน ปลายมน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยวไม่สร้างสปอร์
		

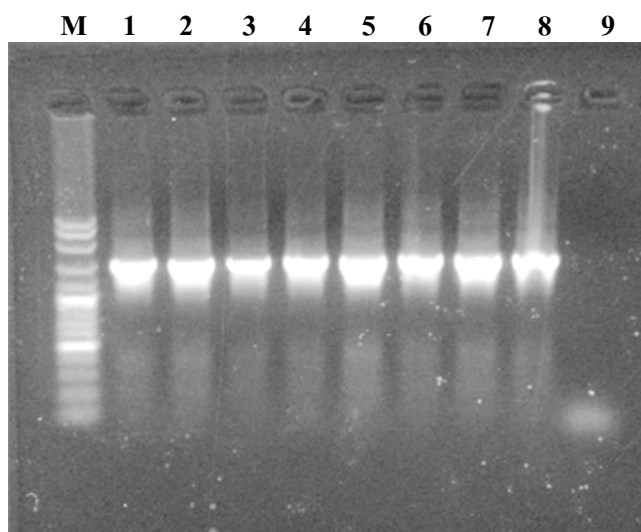
ตารางที่ 4-2 ความชุกของไอโซเลตแบคทีเรียแลคติกที่พบในตัวอย่างน้ำหมัก

ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง	ไอโซเลตที่พบ
1	ถังเลี้ยงยีสต์	KA03-1, KA06-1
2	ถังหมัก ถังที่ 1	KA01-1, KA02-1, KA06-2
3	ถังหมัก ถังที่ 2	KA01-2
4	ถังหมัก ถังที่ 3	KA01-3, KA05-1, KA07-1
5	ถังหมัก ถังที่ 4	KA01-4, KA03-2, KA05-2, KA07-2
6	ถังหมัก ถังที่ 5	KA01-5, KA03-3, KA05-3, KA07-3
7	ถังหมัก ถังที่ 6	KA01-6, KA03-4, KA05-4, KA07-4
8	ถังน้ำหมักก่อนการกลั่น	KA01-7, KA05-5, KA07-5

4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากกระบวนการผลิตเอทานอล

นำตัวแทนไอโซเลตของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำหมักเอทานอล 7 ไอโซเลต มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ LAC16F และ LAC16R โดยใช้วิธีพีซีอาร์ (ภาพที่ 4-3) และนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก ความยาวประมาณ 1,440 นิวคลีโอไทด์ (ภาคผนวก ง) เมื่อเปรียบเทียบ

กับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลของ EzTaxon พบว่า ทั้ง 7 ไอโซเลตอยู่ในจีโนม *Lactobacillus* ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ KA 01 และ KA 06 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด กับ *L. plantarum* group (99.79% - 100.00% และ 99.23% - 99.44% ตามลำดับ) ซึ่งประกอบด้วย *L. pentosus* JCM 1558(T) (D79211) *L. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917(T) *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* DK 022(T) และ *L. paraplantarum* DSM 10667(T) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ KA 02 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99.93%) กับ *L. farciminis* KCTC 3681(T) (AEOT01000034) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ KA 03 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (100.00%) กับ *L. pantheris* A24-2-1(T) (AF413523) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ KA 04 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99.93%) กับ *L. formosensis* S215 (T) (AB794060) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ KA 05 และ KA 07 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (100.00 และ 99.86% ตามลำดับ) กับ *L. farraginis* JCM 14108(T) (BAKI01000097) ดังแสดงในตารางที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำหมักในกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 plus bp (Lane M), KA 01 (Lane 1), KA 02 (Lane 2), KA 03 (Lane 3), KA 04 (Lane 4), KA 05 (Lane 5), KA 06 (Lane 6), KA 07 (Lane 7), Positive control (Lane 8) และ Negative control (Lane 9)

ตารางที่ 4-3 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก
ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักเอทานอล เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ EzTaxon

ไอโซเลต	Max coverage	%Max identity	แท็กซอน	หมายเลข Accession
KA 01*	100	100.00	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211
	100	99.93	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098
	99.9	99.86	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> DK 022(T)	AJ640078
	100	99.79	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667(T)	AJ306297
KA 02	100	99.93	<i>Lactobacillus farciminis</i> KCTC 3681(T)	AEOT01000034
KA 03	100	100.00	<i>Lactobacillus pantheris</i> A24-2-1(T)	AF413523
KA 04	100	99.93	<i>Lactobacillus formosensis</i> S215(T)	AB794060
KA 05	100	100.00	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
KA 06*	100	99.44	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211
	100	99.37	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098
	99.9	99.30	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> DK 022(T)	AJ640078
	100	99.23	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667(T)	AJ306297
KA 07	100	99.86	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097

หมายเหตุ แสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดจากผลการเปรียบเทียบ เข้าถึง
ข้อมูล ณ วันที่ 20 ตุลาคม 2559 โดยค่า Identity มากกว่าหรือเท่ากับ 99% จัดว่าเป็น
สปีชีส์เดียวกัน

* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มีความคล้ายคลึงกันจนไม่สามารถจำแนกเป็น
สปีชีส์ได้ จึงจัดอยู่ใน *L. plantarum* group

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกแต่ละไอโซเลต มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 27 ข้อมูล ซึ่งปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon และ GenBank (ตารางที่ 4-4) สำหรับแท็กซอนนอกกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ *Lactobacillus amylophilus* LMG 11400 (NR042511) พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลตถูกจัดวางตำแหน่งบนแผนภูมิแยกออกจากกันเป็น 2 คลัสเตอร์ (ภาพที่ 4-4) โดยในคลัสเตอร์แรกเป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยไอโซเลต KA 01, KA 02, KA 03, KA 04 และ KA 06 ซึ่งไอโซเลต KA 01 และ KA 06 ถูกจัดวางอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus plantarum* group ซึ่งประกอบด้วย *L. pentosus*, *L. plantarum* subsp. *plantarum* และ *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* โดยมีความใกล้ชิดกับ *L. pentosus* สายพันธุ์ JCM 1558 (T) (D79211) และ *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* สายพันธุ์ DK 022(T) (AJ640078) มากที่สุด มีค่า Sequence identity ระหว่างแท็กซอนที่ถูกจัดวางอยู่ในคลัสต์นี้มีค่าอยู่ 0.935-0.988 (ตารางที่ 4-5) ไอโซเลต KA 02 และ KA 04 แสดงสายวิวัฒนาการที่มิบรรพบุรุษร่วมกัน ซึ่ง KA 02 มีความใกล้ชิดกับ *L. farciminis* สายพันธุ์ KCTC 3681(T) และ *L. farciminis* สายพันธุ์ BCRC 14043 ซึ่งมีค่า Sequence identity ระหว่างแท็กซอนที่ถูกจัดวางอยู่ในคลัสต์นี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.935-0.943 และ KA 04 มีความใกล้ชิดกับ *L. formosensis* สายพันธุ์ S215(T) (AB794060) มีค่า Sequence identity ระหว่างแท็กซอนที่ถูกจัดวางอยู่ในคลัสต์นี้คือ 0.943 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-5) และไอโซเลต KA 03 ถูกจัดวางกับ *L. pantheris* ซึ่งมีค่า Bootstrap ที่สูงถึง 100% โดยมีความใกล้ชิดกับ *L. pantheris* สายพันธุ์ A24-2-1(T) (AF413523) และ *L. pantheris* สายพันธุ์ LMG 21017 (NR025189) ซึ่งมี Sequence identity ระหว่างแท็กซอนที่ถูกจัดวางอยู่ในคลัสต์นี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.927-1.000 (ตารางที่ 4-5)

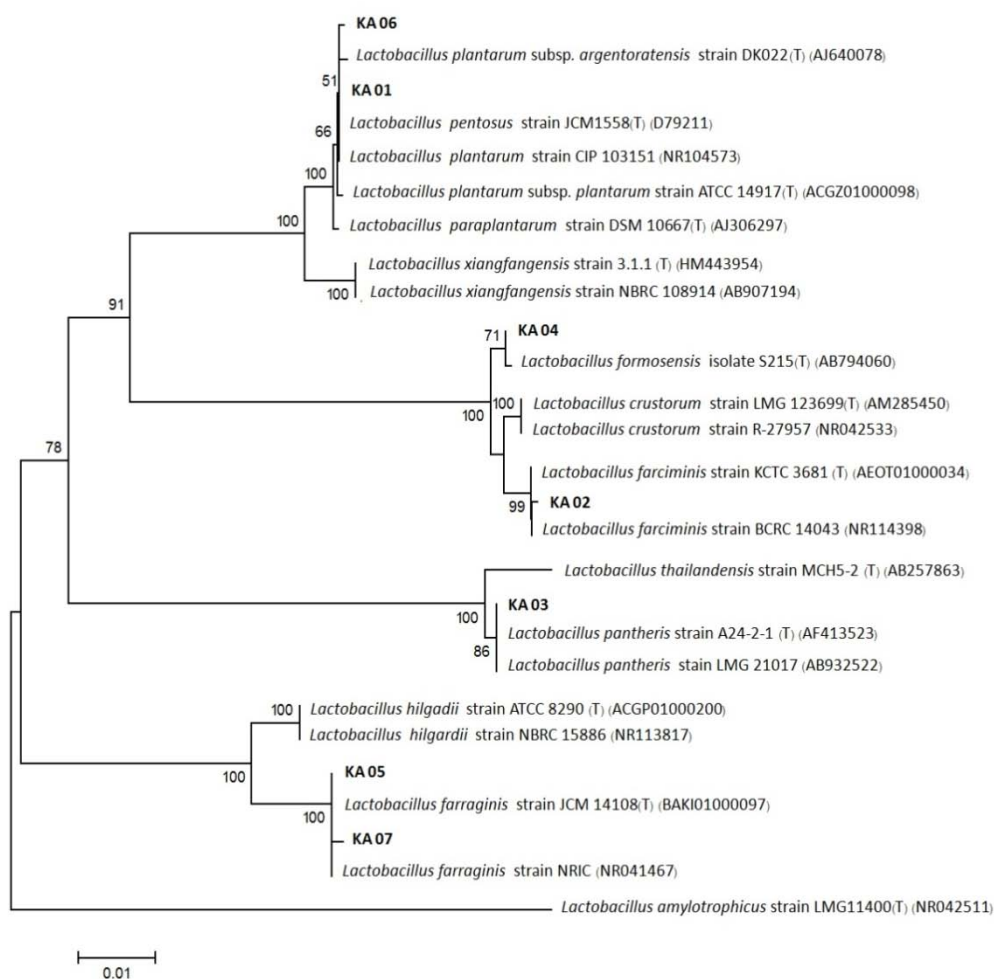
สำหรับไอโซเลต KA05 และ KA07 นั้นถูกจัดวางอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *L. farraginis* และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่สุดกับ *L. farraginis* สายพันธุ์ JCM 14108(T) (BAKI01000097) *L. farraginis* สายพันธุ์ NRIC 0676 (NR041467) โดยมี Sequence identity ระหว่างแท็กซอนที่ถูกจัดวางอยู่ในคลัสต์นี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.940-0.995 (ตารางที่ 4-5) เมื่อพิจารณาข้อมูลด้านสัณฐานและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลต ร่วมกับข้อมูลสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งสอดคล้องกับตารางที่ 4-3 จึงสามารถระบุแท็กซอนของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลต ได้ในระดับสปีชีส์

ตารางที่ 4-4 แยกชอนต่าง ๆ ของแบคทีเรียยีสต์ *Lactobacillus* ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับไอโซเลต KA 01, KA 02, KA 03, KA 04, KA05, KA 06 และ KA 07

หมายเลข	แยกชอน	หมายเลข Accession	แหล่งที่มา
1	KA 01	-	งานวิจัยนี้
2	KA 02	-	งานวิจัยนี้
3	KA 03	-	งานวิจัยนี้
4	KA 04	-	งานวิจัยนี้
5	KA 05	-	งานวิจัยนี้
6	KA 06	-	งานวิจัยนี้
7	KA 07	-	งานวิจัยนี้
8	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211	EzTaxon
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 103151	NR104573	GenBank
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	EzTaxon
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> DK 022(T)	AJ640078	EzTaxon
12	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667(T)	AJ306297	EzTaxon
13	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i> 3.1.1(T)	HM443954	EzTaxon
14	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i> NBRC 108914	AB907194	GenBank
15	<i>Lactobacillus formosensis</i> S215(T)	AB794060	EzTaxon
16	<i>Lactobacillus farciminis</i> KCTC 3681(T)	AEOT01000034	EzTaxon
17	<i>Lactobacillus farciminis</i> BCRC 14043	NR114398	GenBank
18	<i>Lactobacillus crustorum</i> LMG 123699(T)	AM285450	EzTaxon

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

หมายเลข	แทกซอน	หมายเลข Accession	แหล่งที่มา
19	<i>Lactobacillus crustorum</i> R-27957	NR042533	GenBank
20	<i>Lactobacillus pantheris</i> A24-2-1(T)	AF413523	EzTaxon
21	<i>Lactobacillus pantheris</i> LMG 21017	NR025189	GenBank
22	<i>Lactobacillus thailandensis</i> MCH5-2(T)	AB257863	EzTaxon
23	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097	EzTaxon
24	<i>Lactobacillus farraginis</i> NRIC 0676	NR041467	GenBank
25	<i>Lactobacillus hilgardii</i> ATCC 8290(T)	ACGP01000200	EzTaxon
26	<i>Lactobacillus hilgardii</i> NBRC 15886	NR113817	GenBank
27	<i>Lactobacillus amylophilus</i> LMG 11400(T)	NR042511	EzTaxon



ภาพที่ 4-4 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียแลคติก 7 ไอโซเลต ที่แยกได้จากกระบวนการผลิตเอทานอล แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (จำนวนทั้งหมด 1401 ตำแหน่ง) และใช้ Tamura 3-parameter ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแทกซอน โดยมีหน่วยเป็นอัตราการแทนที่คู่เบสในแต่ละตำแหน่งบนยีนเครื่องหมาย อัตราการแปรผันทางพันธุกรรมบนยีนเครื่องหมายคำนวณโดยใช้โมเดล Gamma distribution และทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrap test (1000 ซ้ำ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 27 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Lactobacillus amylotrophicus* LMG11400 (NR042511) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

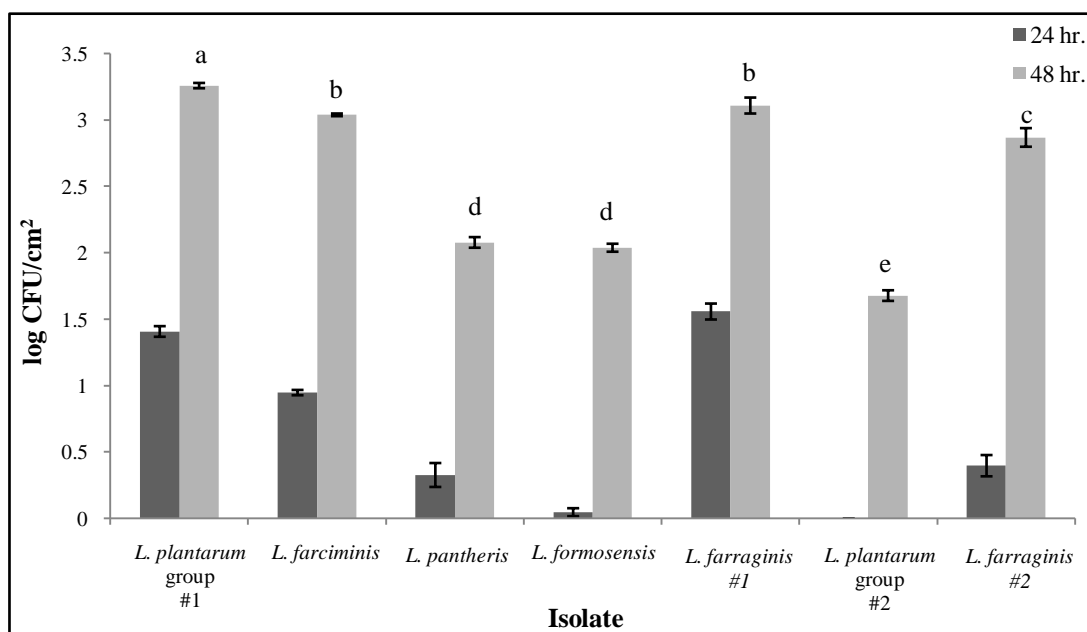
ตารางที่ 4-5 Sequence identity matrix ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์
สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากน้ำหมักเอทานอล 7 ไอโซเลต

1	ID																										
2	0.912	ID																									
3	0.907	0.883	ID																								
4	0.919	0.980	0.888	ID																							
5	0.910	0.889	0.899	0.896	ID																						
6	0.986	0.910	0.896	0.908	0.899	ID																					
7	0.906	0.886	0.896	0.893	0.995	0.895	ID																				
8	0.951	0.869	0.863	0.882	0.866	0.938	0.863	ID																			
9	0.946	0.864	0.859	0.878	0.862	0.933	0.859	0.983	ID																		
10	0.946	0.866	0.860	0.880	0.862	0.934	0.859	0.977	0.963	ID																	
11	0.947	0.866	0.860	0.880	0.865	0.935	0.862	0.935	0.988	0.979	0.970	ID															
12	0.960	0.879	0.874	0.893	0.876	0.947	0.873	0.984	0.970	0.982	0.976	ID															
13	0.965	0.900	0.891	0.900	0.900	0.956	0.897	0.942	0.937	0.937	0.938	0.952	ID														
14	0.958	0.882	0.878	0.896	0.886	0.946	0.883	0.971	0.956	0.966	0.963	0.981	0.970	ID													
15	0.872	0.928	0.840	0.943	0.845	0.860	0.842	0.902	0.889	0.915	0.896	0.907	0.871	0.899	ID												
16	0.723	0.935	0.698	0.780	0.702	0.713	0.700	0.760	0.765	0.765	0.755	0.753	0.722	0.745	0.818	ID											
17	0.880	0.943	0.848	0.950	0.853	0.868	0.850	0.898	0.885	0.919	0.892	0.911	0.879	0.907	0.980	0.821	ID										
18	0.880	0.934	0.846	0.942	0.847	0.868	0.844	0.924	0.913	0.906	0.917	0.914	0.877	0.905	0.964	0.817	0.965	ID									
19	0.880	0.934	0.846	0.942	0.847	0.868	0.844	0.924	0.913	0.906	0.917	0.914	0.877	0.905	0.964	0.817	0.965	1.000	ID								
20	0.847	0.820	0.927	0.834	0.834	0.836	0.831	0.891	0.898	0.890	0.884	0.883	0.848	0.875	0.868	0.757	0.867	0.875	0.875	ID							
21	0.847	0.820	0.927	0.834	0.834	0.836	0.831	0.891	0.898	0.890	0.884	0.883	0.848	0.875	0.868	0.757	0.867	0.875	0.875	1.000	ID						
22	0.853	0.826	0.930	0.840	0.841	0.842	0.838	0.874	0.862	0.894	0.868	0.885	0.854	0.881	0.870	0.728	0.877	0.854	0.854	0.951	0.951	ID					
23	0.867	0.842	0.851	0.856	0.943	0.856	0.940	0.897	0.884	0.917	0.892	0.903	0.872	0.901	0.892	0.747	0.895	0.876	0.876	0.881	0.881	0.886	ID				
24	0.877	0.852	0.861	0.866	0.954	0.866	0.951	0.895	0.882	0.905	0.890	0.908	0.883	0.912	0.885	0.736	0.895	0.874	0.874	0.876	0.876	0.881	0.987	ID			
25	0.790	0.765	0.773	0.778	0.839	0.780	0.838	0.830	0.837	0.836	0.826	0.823	0.795	0.821	0.816	0.790	0.813	0.814	0.814	0.839	0.839	0.809	0.890	0.879	ID		
26	0.890	0.862	0.871	0.877	0.945	0.878	0.944	0.904	0.891	0.900	0.899	0.914	0.896	0.925	0.880	0.729	0.887	0.883	0.883	0.869	0.869	0.874	0.960	0.971	0.887	ID	
27	0.874	0.848	0.859	0.862	0.871	0.862	0.869	0.876	0.863	0.872	0.869	0.887	0.865	0.887	0.852	0.708	0.861	0.857	0.857	0.846	0.846	0.851	0.874	0.884	0.793	0.892	ID

หมายเหตุ หมายเลข 1-27 แทนแต่ละแท่งยีน

4.4 การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว

จากการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว จำนวน 7 ไอโซเลต (KA 01-KA 07) ซึ่งระบุสปีชีส์ได้เป็น *L. plantarum* group จำนวน 2 ไอโซเลต, *L. farciminis*, *L. pantheris*, *L. formosensis* อย่างละ 1 ไอโซเลต และ *L. farraginis* จำนวน 2 ไอโซเลต บนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่อยู่ในภาคน้ำตาลความเข้มข้น 32 องศาบริกซ์ ที่เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1% พีเอช 4.5 เมื่อมีเซลล์ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าใน 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม ทุกไอโซเลตสร้างไบโอฟิล์มได้ ยกเว้น *L. plantarum* group (KA 06) และที่ 48 ชั่วโมงของการบ่ม พบไบโอฟิล์มของแบคทีเรียทุกไอโซเลต โดย *L. plantarum* group #1 (KA 01) สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (3.26 ± 0.02 log CFU/cm²) รองลงมาคือ *L. farraginis* #1 (KA 05) และ *L. farciminis* (KA 02) ที่สร้างไบโอฟิล์มได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และพบไบโอฟิล์มน้อยที่สุดใน *L. plantarum* group #2 (KA 06) รายละเอียดแสดงในภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4-5 ปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลต เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ

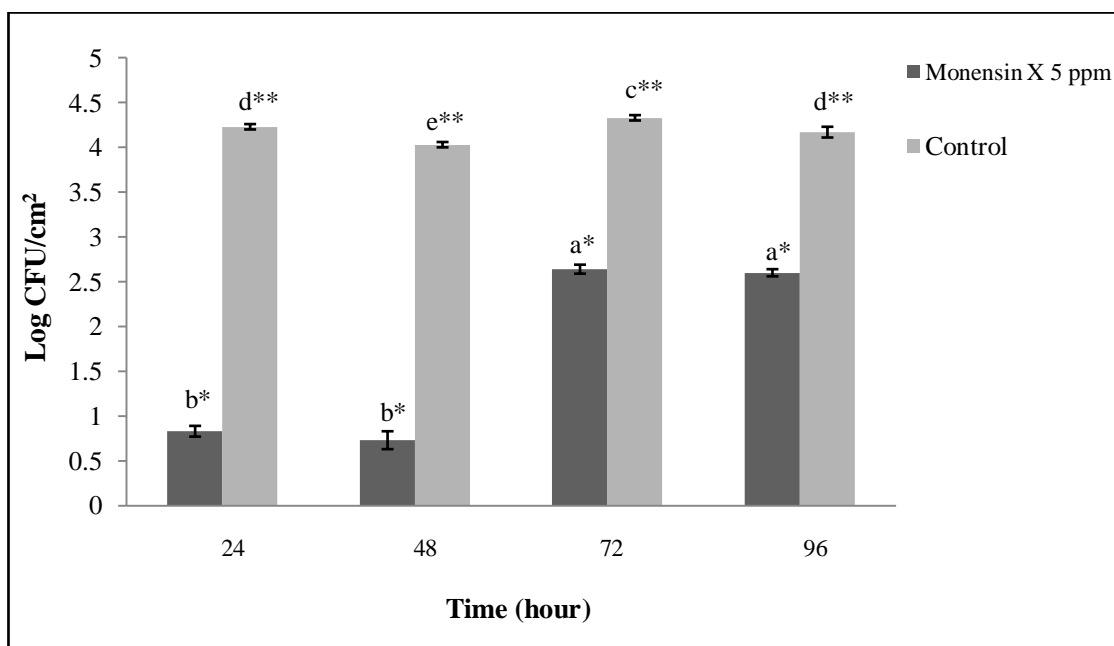
30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน (a, b, c, d หรือ e) หมายถึงปริมาณไบโอฟิล์มที่ 48 ชั่วโมง ของแต่ละไอโซเลต มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

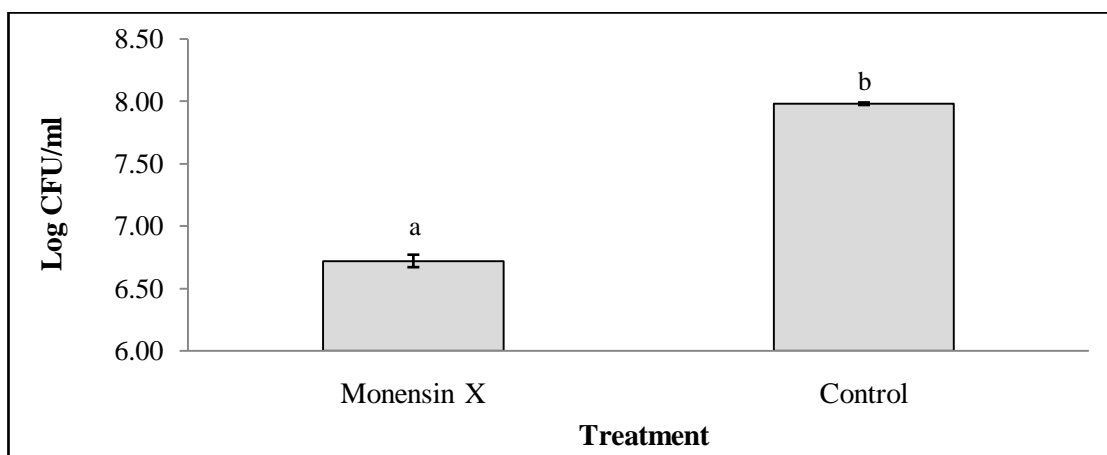
4.5 การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกและการหาปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ในรูป Planktonic cell ในสภาวะการหมักจำลอง

การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมของแบคทีเรียแลคติกแบบสภาวะการหมักเอทานอลจำลองในกากน้ำตาลที่มีแบคทีเรียผสมและยีสต์ เริ่มต้นอยู่ที่ 1.3×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และ 1.3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบในสภาวะที่เติมยา Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm และไม่เติมยา Monensin X (ชุดควบคุม) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าในชุดที่เติมยา Monensin X ปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกน้อยกว่าในชุดควบคุม ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในทุกช่วงเวลา โดยใน 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม มีปริมาณไบโอฟิล์มอยู่ที่ $0.83 \pm 0.06 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ และมีปริมาณไม่เพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณไบโอฟิล์มจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 72 ชั่วโมง เป็น $2.64 \pm 0.05 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ และมีปริมาณไม่เปลี่ยนแปลงที่ 96 ชั่วโมงของการบ่ม ในขณะที่ชุดควบคุม พบไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติก $4.23 \pm 0.03 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ หลังบ่ม 24 ชั่วโมง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 72 จากนั้นจะมีปริมาณลดลง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเติมยา Monensin X สามารถลดปริมาณแบคทีเรียแลคติกในรูปไบโอฟิล์มได้ที่ 24 ชั่วโมง และที่ 48 ชั่วโมง ได้ $3.40 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ และ $3.36 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ หรือคิดเป็นอัตราการยับยั้ง 80.38% และ 81.13% ตามลำดับ รายละเอียดแสดงในภาพที่ 4-6

เมื่อทำการหาปริมาณเซลล์แบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในส่วนกากน้ำตาลที่ 24 ชั่วโมง พบว่าในชุดที่เติมยา Monensin X มีจำนวน $6.72 \pm 0.05 \log \text{CFU}$ ต่อมิลลิลิตร ต่ำกว่าในชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณ $7.98 \pm 0.01 \log \text{CFU}$ ต่อมิลลิลิตร ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ แสดงให้เห็นว่าการเติมยา Monensin X ทำให้จำนวนแบคทีเรียที่แขวนลอยลดลง $1.26 \log \text{CFU}$ ต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 15.79 % ของชุดควบคุม รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 4-7



ภาพที่ 4-6 ปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง ที่มียา Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไบโอฟิล์ม ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ $p < 0.05$ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a, b, c, d หรือ e) แสดงความแตกต่างกันของปริมาณไบโอฟิล์มของแต่ละชุดทดลองที่เวลาต่าง ๆ และสัญลักษณ์ดอกจัน (* หรือ **) แสดงความแตกต่างกันของปริมาณไบโอฟิล์มภายในชั่วโมงของการบ่มของชุดทดลองกับชุดควบคุม




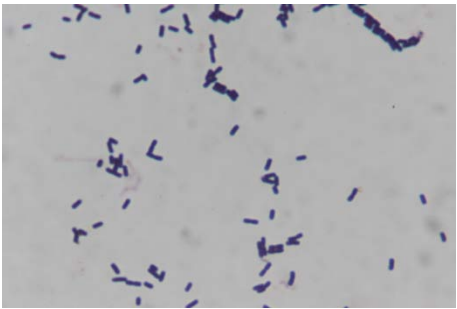

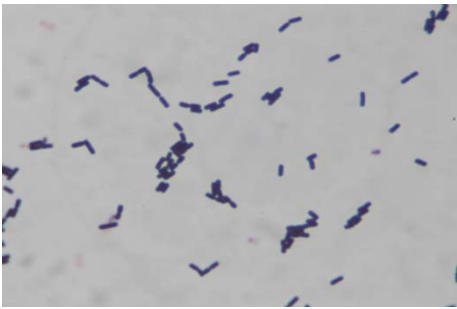

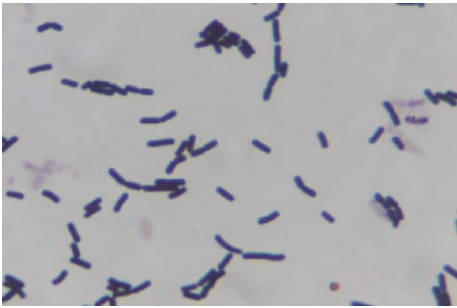
ภาพที่ 4-7 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกแวนดอลยในกากน้ำตาลที่มียา Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ $p < 0.05$ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a หรือ b) แสดงความแตกต่างกันของปริมาณแบคทีเรียแลคติกของแต่ละชุดทดลอง

เมื่อทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียบน MRS agar ที่แยกได้จากไบโอฟิล์ม จากชุดเดิมยา Monensin X และชุดควบคุม ที่มีลักษณะแตกต่างกันอย่างน้อย 2 โคโลนีต่อแบบที่พบในแต่ละอายุของไบโอฟิล์ม มาศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยา พบว่าเป็นแกรมบวก เชลล์รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างเอนไซม์อะคะเตเลส ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียแลคติก โดยคัดเลือกโคโลนีจากไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ได้ 4 ไอโซเลต ได้แก่ BK 01, BK 02, BK 03 และ BK 04 อายุ 48 ชั่วโมง คัดเลือกได้ 5 ไอโซเลต ได้แก่ BK 05, BK 06, BK 07, BK 08 และ BK 09 ในอายุ 72 ชั่วโมง ได้ 4 ไอโซเลต ได้แก่ BK 10, BK 11, BK 12 และ BK 13 และที่อายุ 96 ชั่วโมง คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลต ได้แก่ BK 14, BK 15 และ BK 16 ดังตารางที่ 4-6 โดยรายละเอียดลักษณะพื้นฐานวิทยาของโคโลนีและเชลล์ของแต่ละไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 4-7




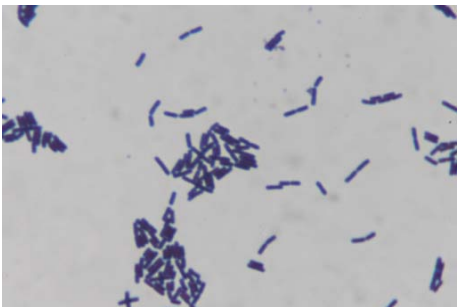

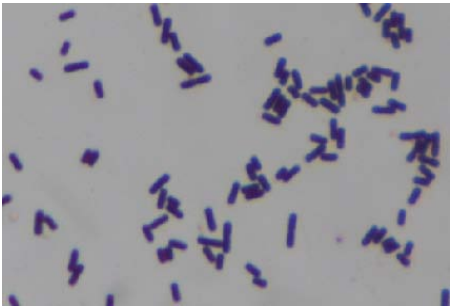
ตารางที่ 4-6 ไอโซเลตของแบคทีเรียแลคติกบน MRS agar ที่แยกได้จากไบโอฟิล์ม

อายุไบโอฟิล์ม	ชุดทดลอง	ไอโซเลต
24 ชั่วโมง	ชุดควบคุม	BK 01
	ชุดเติมยา Monensin X	BK 02
	ชุดควบคุม	BK 03
	ชุดควบคุม	BK 04
48 ชั่วโมง	ชุดเติมยา Monensin X	BK 05
	ชุดควบคุม	BK 06
	ชุดควบคุม	BK 07
	ชุดควบคุม	BK 08
	ชุดควบคุม	BK 09
72 ชั่วโมง	ชุดเติมยา Monensin X	BK 10
	ชุดเติมยา Monensin X	BK 11
	ชุดควบคุม	BK 12
	ชุดควบคุม	BK 13
96 ชั่วโมง	ชุดเติมยา Monensin X	BK 14
	ชุดควบคุม	BK 15
	ชุดควบคุม	BK 16




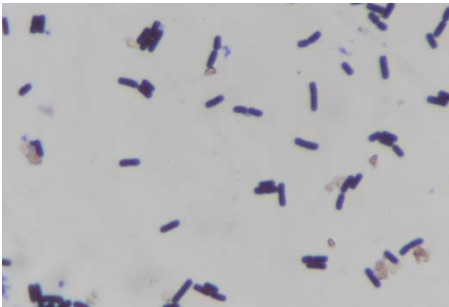

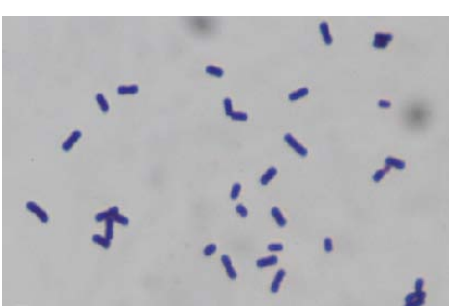
ตารางที่ 4-7 ลักษณะโคโลนีและลักษณะได้กล้องของไอโซเลตที่ก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม ในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง

ไอโซเลต	โคโลนี	เซลล์
BK 01	โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน ปลายมน เรียงตัว แบบอยู่เดี่ยว ไม่สร้างสปอร์
		
BK 02	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก แบน ผิวหน้าไม่เรียบ ขนาด 2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน ปลายมน เรียงตัว แบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์
		
BK 03	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก นูน ผิวมัน ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์
		


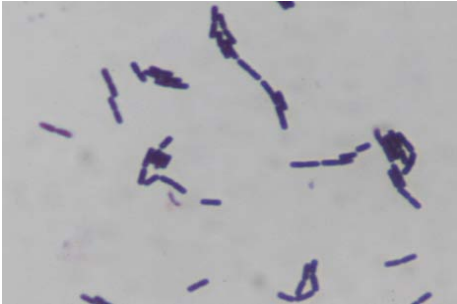

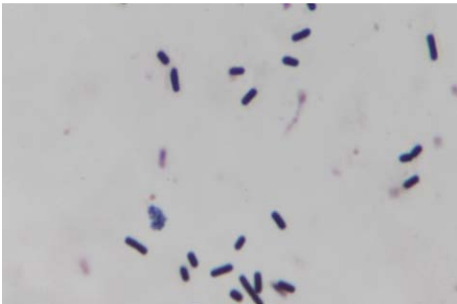


ตารางที่ 4-7 (ต่อ)

ไอโซเลต	โคโลนี	เซลล์
BK 04	โคโลนีสีครีม ขอบหยัก แบน ผิวมัน ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์
		
BK 05	โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ขนาด 0.5 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์
		
BK 06	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก แบน ผิวหน้า ไม่เรียบ ขนาด 2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน ปลายมน เรียงตัว แบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์
		


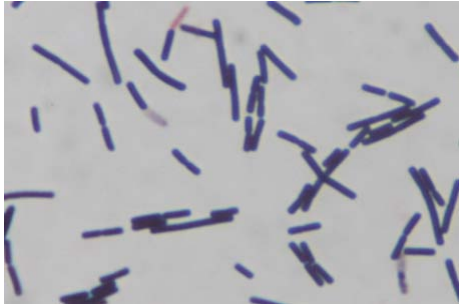

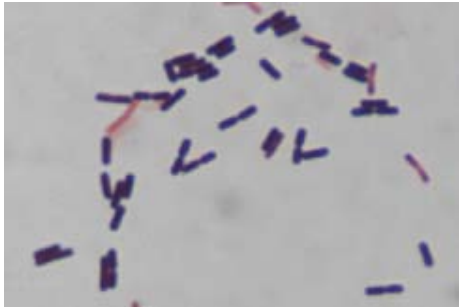

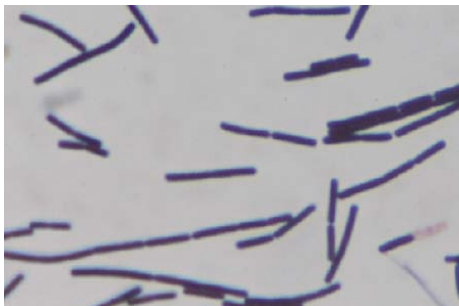
ตารางที่ 4-7 (ต่อ)

ไอโซเลต	โคโลนี	เชลล์
BK 07	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก นูน ผิวมัน ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์
		
BK 08	โคโลนีสีครีม ขอบหยัก แบน ผิวมัน ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว ไม่สร้างสปอร์
		
BK 09	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก นูน ผิวมัน ผิวหน้าไม่เรียบ ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว ไม่สร้างสปอร์
		


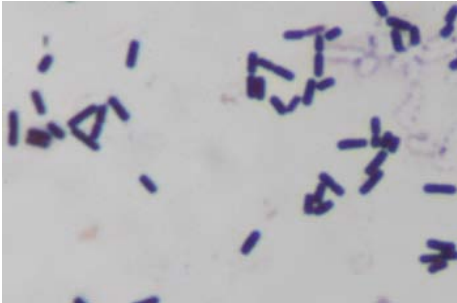
ตารางที่ 4-7 (ต่อ)

ไอโซเลต	โคโลนี	เซลล์
BK 10	โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ ขนาด 0.5-1 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์
		
BK 11	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก แบน ผิวหน้า ไม่เรียบ ขนาด 2-4 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวกระจัด กระจาย ไม่สร้างสปอร์
		
BK 12	โคโลนีสีเทาขุ่น ขอบหยัก แบน ผิวหน้า ไม่เรียบ ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์
		

ตารางที่ 4-7 (ต่อ)

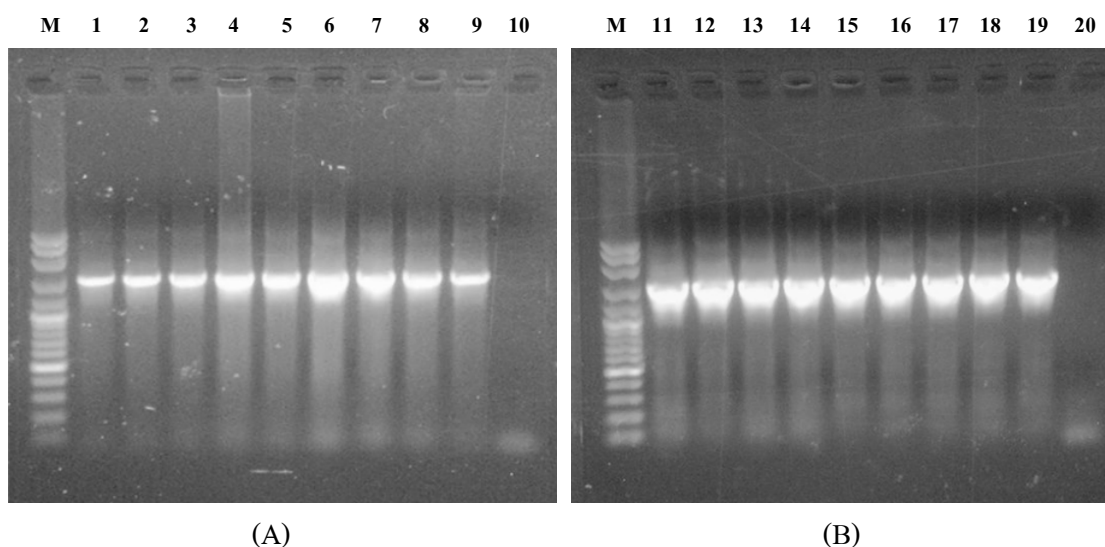
ไอโซเลต	โคโลนี	เซลล์
BK 13	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก แบน ผิวหน้าไม่เรียบ ขนาด 1 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยวหรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์
		
BK 14	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก แบน ผิวหน้าไม่เรียบ ขนาด 2-4 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยวหรือเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์
		
BK 15	โคโลนีสีเทาขุ่น ขอบหยัก แบน ผิวหน้าไม่เรียบ ขนาด 1 มม.	แกรมบวก รูปท่อนยาว เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์
		

ตารางที่ 4-7 (ต่อ)

ไอโซเลต	โคโลนี	เซลล์
BK 16	โคโลนีสีครีม ขอบหยัก แบน ผิวมัน ขนาด 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวแบบอยู่เดี่ยว หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์
		

4.6 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่พบในไบโอฟิล์ม

นำแบคทีเรียแลคติกที่พบในไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง จำนวน 16 ไอโซเลต มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ LAC16F และ LAC16R ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ที่ซีอาร์เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังภาพที่ 4-8 และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก ความยาวประมาณ 1,440 นิวคลีโอไทด์ (ภาคผนวก ง) และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon เช่นเดียวกับในข้อ 4.3 พบว่าทุกไอโซเลตอยู่ในจีนัสของ *Lactobacillus* ซึ่งจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BK 01 ถึง BK 16 (ยกเว้น BK 09) แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99.38 – 100.00 %) กับ *L. farraginis* JCM 14108(T) (BAKI01000097) ส่วนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BK 09 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด (99.86%) กับ *L. parafarraginis* NRIC 0677(T) (AB262734) ดังแสดงในตารางที่ 4-8



ภาพที่ 4-8 ผลึกพันธุฟีซีอาร์ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างไบโอฟิล์ม โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (A): VC 100 plus bp (Lane M), BK 01 (Lane 1), BK 02 (Lane 2), BK 03 (Lane 3), BK 04 (Lane 4), BK 05 (Lane 5), BK 06 (Lane 6), BK 07 (Lane 7), BK 08 (Lane 8), Positive control (Lane 9) และ Negative control (Lane 10)
(B): BK0 9 (Lane 11), BK 10 (Lane 12), BK 11 (Lane 13), BK 12 (Lane 14), BK 13 (Lane 15), BK 14 (Lane 16), BK 15 (Lane 17), BK 16 (Lane 18), Positive control (Lane 19) และ Negative control (Lane 20)

ตารางที่ 4-8 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกจากไบโอฟิล์มที่สร้างในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ EzTaxon

ไอโซเลต	Max coverage	Max identity	แทกซอน	หมายเลข Accession
BK 01	100	99.59	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 02	100	99.52	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 03	100	99.45	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 04	100	99.65	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097

ตารางที่ 4-8 (ต่อ)

ไอโซเลต	Max coverage	Max identity	แทกซอน	หมายเลข Accession
BK 05	100	99.86	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 06	100	99.52	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 07	100	99.59	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 08	100	99.65	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 09	100	99.86	<i>Lactobacillus parafarraginis</i> NRIC 0677(T)	AB262734
BK 10	100	99.86	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 11	100	99.38	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 12	100	99.52	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 13	100	99.52	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 14	100	99.45	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 15	100	99.52	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097
BK 16	100	100.00	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 14108(T)	BAKI01000097

หมายเหตุ แสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดจากผลการเปรียบเทียบ เข้าถึงข้อมูล ณ วันที่ข้อมูล 5 ตุลาคม 2559

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S RNA ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 16 ไอโซเลต มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 33 ข้อมูล ซึ่งปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 4-9) สำหรับแทกซอนนอกกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ *Lactobacillus curiae* สายพันธุ์ S1L19(T) (JQ086550) (ตารางที่ 4-9) พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 16 ไอโซเลต ถูกจัดวางตำแหน่งบนแผนภูมิใน 2 คลัสเตอร์ (ภาพที่ 4-9) โดยในคลัสเตอร์แรก ประกอบด้วยไอโซเลต BK 01, BK 02, BK 03, BK 04, BK 05, BK 06, BK 07, BK 08, BK 10, BK 11, BK 12, BK 13, BK 14, BK 15 และ BK 16 ถูกจัดวางอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *L. farraginis* โดยมีความใกล้เคียงกับ

L. farraginis สายพันธุ์ JCM 14108(T) (BAKI01000097), *L. farraginis* สายพันธุ์ JCM 8627 (AB690214) และ *L. farraginis* สายพันธุ์ JCM 8638 (AB690223) ซึ่งมีค่า Sequence identity ระหว่างแทกซอนที่ถูกจัดวางอยู่ในคลดนี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.940-0.998 (ตารางที่ 4-10) โดยไอโซเลต BK 15 ทั้ง 15 ไอโซเลต มีความเหมือนกันของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ก่อนข้างสูง (Sequence identity เท่ากับ 0.908-1.000, ตารางที่ 4-10) จึงมีโอกาสที่จะเป็นสปีชีส์เดียวกัน

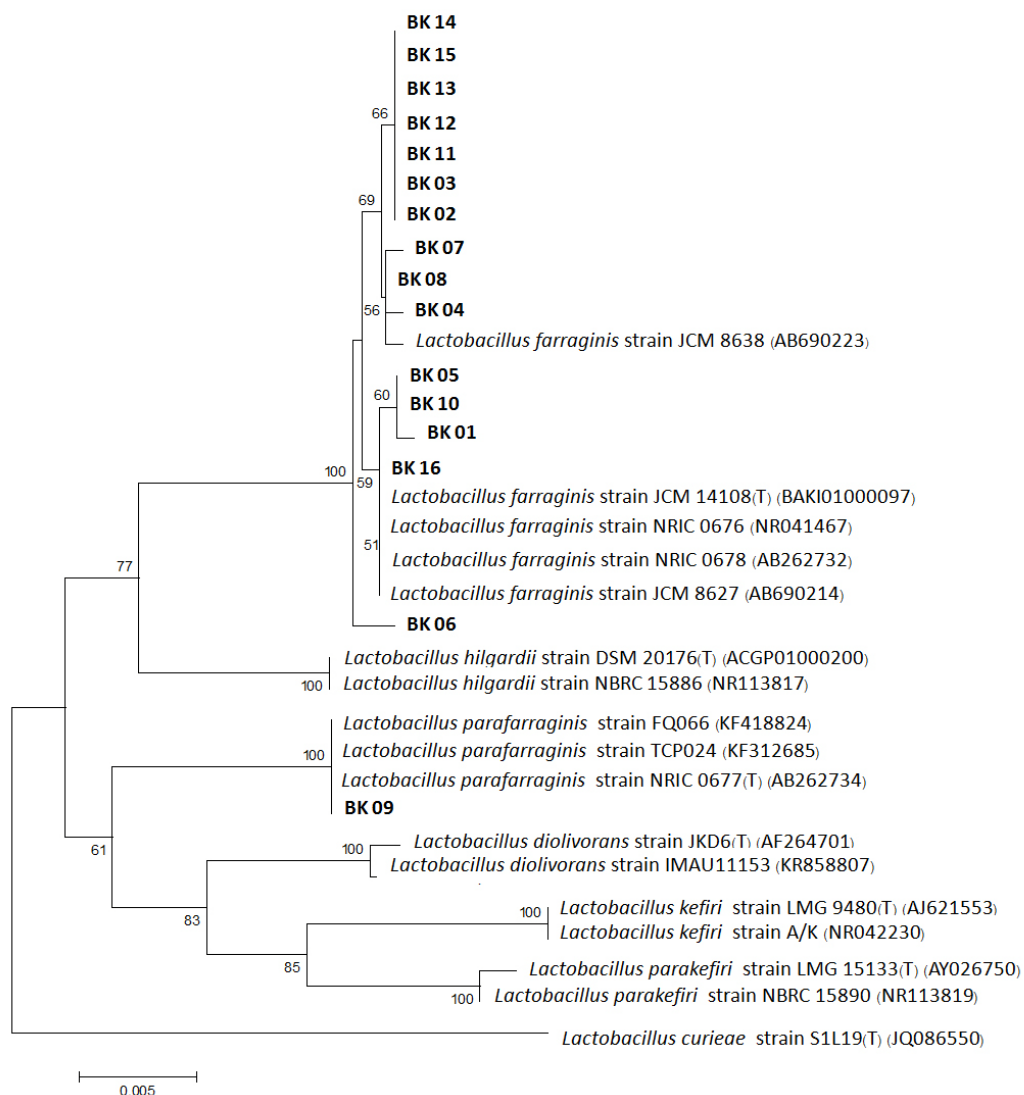
ในขณะที่ ไอโซเลต BK 09 ถูกจัดวางอยู่ในคลดเดียวกับ *L. parafarraginis* และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่สุด *Lactobacillus parafarraginis* สายพันธุ์ NRIC 0677(T) (AB262734) โดยค่า Sequence identity ระหว่างแทกซอนที่ถูกจัดวางอยู่ในคลดนี้มีค่า 0.919 (ตารางที่ 4-10) เมื่อพิจารณาข้อมูลด้านสัณฐานและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ร่วมกับข้อมูลสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ทำให้สามารถระบุแทกซอนของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 16 ไอโซเลตได้ในระดับสปีชีส์

ตารางที่ 4-9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก จากฐานข้อมูลของ GenBank และ EzTaxon

หมายเลข	แทกซอน	หมายเลข Accession	แหล่งที่มา
1	BK 01	-	งานวิจัยนี้
2	BK 02	-	งานวิจัยนี้
3	BK 03	-	งานวิจัยนี้
4	BK 04	-	งานวิจัยนี้
5	BK 05	-	งานวิจัยนี้
6	BK 06	-	งานวิจัยนี้
7	BK 07	-	งานวิจัยนี้
8	BK 08	-	งานวิจัยนี้
9	BK 09	-	งานวิจัยนี้
10	BK 10	-	งานวิจัยนี้
11	BK 11	-	งานวิจัยนี้
12	BK 12	-	งานวิจัยนี้
13	BK 13	-	งานวิจัยนี้
14	BK 14	-	งานวิจัยนี้

ตารางที่ 4-9 (ต่อ)

หมายเลข	แทกซอน	หมายเลข Accession	แหล่งที่มา
15	BK 15	-	งานวิจัยนี้
16	BK 16	-	งานวิจัยนี้
19	<i>Lactobacillus farraginis</i> NRIC 0678	AB262732	GenBank
20	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 8627	AB690214	GenBank
21	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM 8638	AB690223	GenBank
22	<i>Lactobacillus hilgardii</i> DSM 20176(T)	ACGP01000200	EzTaxon
23	<i>Lactobacillus hilgardii</i> NBRC 15886	NR113817	GenBank
24	<i>Lactobacillus parafarraginis</i> NRIC 0677(T)	AB262734	EzTaxon
25	<i>Lactobacillus parafarraginis</i> FQ 066	KF418824	GenBank
26	<i>Lactobacillus parafarraginis</i> TCP 024	KF312685	GenBank
27	<i>Lactobacillus diolivorans</i> JKD6 (T)	AF264701	EzTaxon
28	<i>Lactobacillus diolivorans</i> IMAU11153	KR858807	GenBank
29	<i>Lactobacillus kefir</i> LMG 9480(T)	AJ621553	EzTaxon
30	<i>Lactobacillus kefir</i> A/K	NR042230	GenBank
31	<i>Lactobacillus parakefir</i> LMG 15133(T)	AY026750	EzTaxon
32	<i>Lactobacillus parakefir</i> NBRC 15890	NR113819	GenBank
33	<i>Lactobacillus curieae</i> S1L19(T)	JQ086550	EzTaxon



ภาพที่ 4-9 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียแลคติก 16 ไอโซเลต แผนภูมินี้สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (จำนวนทั้งหมด 1343 ตำแหน่ง) และใช้ Tamura 3-parameter ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแตกซอน โดยมีหน่วยเป็นอัตราการแทนที่คู่เบสในแต่ละตำแหน่งบนยีน เครื่องหมาย อัตราการแปรผันทางพันธุกรรมบนยีน เครื่องหมายคำนวณโดยใช้โมเดล Gamma distribution และทดสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrap test (1000 ซ้ำ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 33 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Lactobacillus curieae* S1L19 (T) (JQ086550) เป็นแตกซอนนอกกลุ่ม

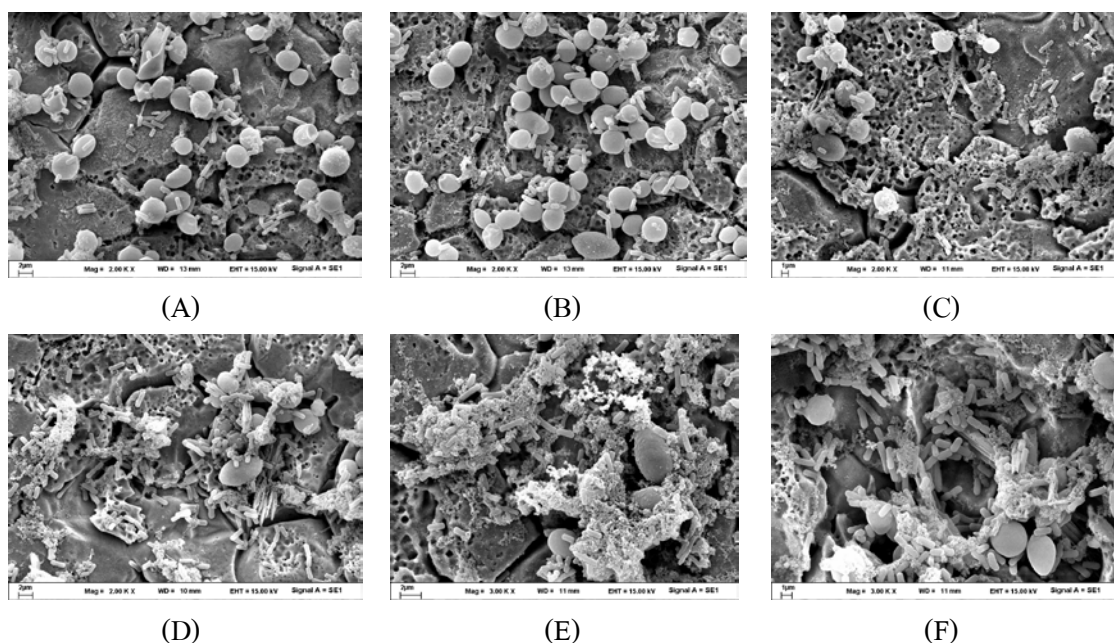
ตารางที่ 4-10 Sequence identity matrix ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์
สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับแบคทีเรียแลคติกจากไบโอฟิล์มที่สร้างในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง 16 ไอโซเลต

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	ID																																
2	0.991	ID																															
3	0.990	0.999	ID																														
4	0.992	0.997	0.996	ID																													
5	0.993	0.991	0.992	0.993	ID																												
6	0.991	0.994	0.993	0.994	0.993	ID																											
7	0.988	0.994	0.993	0.994	0.988	0.991	ID																										
8	0.991	0.996	0.997	0.997	0.995	0.995	0.993	ID																									
9	0.959	0.960	0.960	0.957	0.959	0.958	0.955	0.957	ID																								
10	0.995	0.992	0.993	0.993	0.998	0.992	0.989	0.994	0.959	ID																							
11	0.987	0.996	0.997	0.993	0.989	0.991	0.991	0.994	0.957	0.990	ID																						
12	0.987	0.996	0.995	0.993	0.988	0.991	0.997	0.993	0.956	0.988	0.993	ID																					
13	0.987	0.996	0.995	0.993	0.988	0.991	0.997	0.993	0.956	0.988	0.993	0.993	ID																				
14	0.990	0.999	1.000	0.996	0.992	0.993	0.993	0.997	0.960	0.993	0.997	0.995	0.995	ID																			
15	0.990	0.999	0.998	0.996	0.991	0.993	0.993	0.995	0.959	0.991	0.995	0.995	0.995	0.998	ID																		
16	0.995	0.994	0.993	0.995	0.996	0.994	0.991	0.995	0.960	0.996	0.991	0.991	0.991	0.993	0.993	ID																	
17	0.911	0.910	0.910	0.911	0.913	0.911	0.909	0.912	0.986	0.913	0.911	0.910	0.908	0.908	0.910	0.910	ID																
18	0.951	0.950	0.949	0.951	0.953	0.951	0.948	0.952	0.922	0.953	0.951	0.947	0.947	0.949	0.949	0.954	0.852	ID															
19	0.926	0.924	0.924	0.926	0.928	0.926	0.922	0.926	0.897	0.928	0.926	0.922	0.922	0.924	0.924	0.928	0.872	0.973	ID														
20	0.953	0.951	0.951	0.953	0.955	0.953	0.949	0.953	0.923	0.955	0.953	0.949	0.949	0.951	0.951	0.955	0.851	0.996	0.971	ID													
21	0.940	0.944	0.944	0.945	0.942	0.944	0.942	0.946	0.914	0.942	0.946	0.942	0.942	0.944	0.944	0.944	0.853	0.983	0.973	0.986	ID												
22	0.837	0.838	0.838	0.837	0.839	0.840	0.835	0.838	0.829	0.839	0.840	0.836	0.836	0.838	0.838	0.838	0.907	0.879	0.900	0.878	0.883	ID											
23	0.943	0.945	0.944	0.943	0.946	0.946	0.941	0.944	0.934	0.946	0.946	0.942	0.942	0.944	0.944	0.945	0.828	0.971	0.945	0.972	0.963	0.887	ID										
24	0.904	0.906	0.906	0.905	0.906	0.908	0.904	0.906	0.919	0.906	0.908	0.904	0.904	0.906	0.906	0.906	0.854	0.947	0.962	0.948	0.953	0.901	0.943	ID									
25	0.964	0.964	0.964	0.962	0.964	0.965	0.960	0.964	0.990	0.964	0.961	0.960	0.960	0.964	0.963	0.964	0.792	0.928	0.903	0.929	0.921	0.835	0.941	0.926	ID								
26	0.966	0.967	0.966	0.965	0.967	0.968	0.964	0.966	0.984	0.966	0.966	0.964	0.964	0.966	0.966	0.967	0.796	0.933	0.908	0.935	0.926	0.840	0.946	0.931	0.993	ID							
27	0.941	0.940	0.939	0.939	0.942	0.942	0.938	0.940	0.937	0.942	0.941	0.937	0.937	0.939	0.939	0.941	0.817	0.957	0.931	0.959	0.948	0.865	0.970	0.935	0.944	0.949	ID						
28	0.956	0.957	0.956	0.955	0.957	0.957	0.956	0.955	0.953	0.957	0.953	0.956	0.956	0.956	0.956	0.958	0.781	0.916	0.891	0.917	0.908	0.827	0.932	0.895	0.957	0.958	0.955	ID					
29	0.952	0.952	0.952	0.953	0.954	0.953	0.950	0.954	0.946	0.954	0.952	0.949	0.949	0.952	0.952	0.954	0.791	0.928	0.903	0.929	0.920	0.833	0.939	0.910	0.952	0.955	0.949	0.956	ID				
30	0.952	0.952	0.952	0.953	0.954	0.953	0.950	0.954	0.946	0.954	0.952	0.949	0.949	0.952	0.952	0.954	0.791	0.928	0.903	0.929	0.920	0.833	0.939	0.910	0.952	0.955	0.949	0.956	1.000	ID			
31	0.894	0.894	0.894	0.894	0.895	0.891	0.891	0.895	0.912	0.894	0.893	0.891	0.891	0.894	0.893	0.895	0.760	0.891	0.867	0.892	0.884	0.800	0.901	0.870	0.906	0.903	0.918	0.899	0.896	0.896	ID		
32	0.930	0.931	0.930	0.932	0.933	0.930	0.929	0.932	0.926	0.932	0.932	0.928	0.928	0.930	0.930	0.932	0.817	0.958	0.932	0.959	0.950	0.859	0.968	0.936	0.934	0.939	0.970	0.932	0.949	0.949	0.926	ID	
33	0.900	0.901	0.901	0.900	0.900	0.904	0.898	0.901	0.896	0.900	0.903	0.899	0.899	0.901	0.901	0.901	0.832	0.946	0.947	0.944	0.951	0.875	0.937	0.940	0.901	0.906	0.931	0.890	0.902	0.902	0.865	0.927	ID

หมายเหตุ หมายเลข 1- 33 แทนแต่ละแทกซอน ดังที่ระบุไว้ในตารางที่ 4-9

4.7 การศึกษาไบโอฟิล์ม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ทำการตรวจดูแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่แช่ในกาบน้ำตาลในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองที่มียีสต์และแบคทีเรียผสม เมื่อมี Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า ใน 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม พบเซลล์ยีสต์และเซลล์แบคทีเรียเกาะบนพื้นผิวของแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมทั้ง 2 ชุดการทดสอบ (ภาพที่ 4-10 A และ 4-10 B) โดยเซลล์แบคทีเรียเป็นรูปท่อนอยู่เป็นกลุ่มขนาดเล็ก และใน 72 ชั่วโมง ของการบ่ม พบเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ยีสต์อยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 4-10 C และ 4-10 D) โดยในชุดทดสอบที่เติมยา Monensin X (ภาพที่ 4-10 C) กลุ่มของไบโอฟิล์มที่พบจะมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 4-10 D) และเมื่อตรวจดูที่กำลังขยายเพิ่มขึ้นเป็น 3,000 เท่า (ภาพที่ 4-10 E และ 4-10 F) จะเห็นกลุ่มเซลล์แบคทีเรียและยีสต์อยู่ร่วมกันแบบไม่หนาแน่นในชุดเติมยา ส่วนในชุดควบคุมกลุ่มเซลล์มีความหนาแน่นและยึดเกาะกันหลายชั้นเป็น โครงสร้างไบโอฟิล์มขนาดใหญ่



ภาพที่ 4-10 ลักษณะของไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักจำลองบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม เมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM), (A) ชุดเติมยา Monensin X เมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า, (B) ชุดควบคุม เมื่อบ่ม 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า, (C) ชุดเติมยา Monensin X เมื่อบ่ม 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า, (D) ชุดควบคุม เมื่อบ่ม 72 ชั่วโมงที่ กำลังขยาย 2,000 เท่า, (E) ชุดเติมยา Monensin X เมื่อบ่ม 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า และ (F) ชุดควบคุม เมื่อบ่ม 72 ชั่วโมงที่ กำลังขยาย 3,000 เท่า

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ดังนี้

1. โรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่นำมาศึกษาพบแบคทีเรียแลคติกป็นเป็นในทุกระดับของกระบวนการผลิต โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 6.91 ถึง 8.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแบคทีเรียแลคติกที่พบมากมีเพียงชนิดเดียว คือ จีโนส *Lactobacillus* เมื่อจัดจำแนกโดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าประกอบด้วย *L. farraginis*, *L. pantheris*, *L. farciminis*, *L. formosensis* และ *L. plantarum* group

2. แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมได้แตกต่างกัน โดยเมื่อบ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าใน 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม ทุกไอโซเลตสร้างไบโอฟิล์มได้ ยกเว้น *L. plantarum* group (KA 06) และที่ 48 ชั่วโมงของการบ่ม พบไบโอฟิล์มของแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลต โดย *L. plantarum* group (KA 01) สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด รองลงมาคือ *L. farraginis* (KA 05) และ *L. farciminis* (KA 02) ที่สร้างไบโอฟิล์มได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

3. ยาปฏิชีวนะ Monensin X ความเข้มข้น 5 ppm สามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองได้เฉลี่ย 3.36 log CFU/cm² หรือคิดเป็น 81.13 % เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง

4. แบคทีเรียแลคติกที่พบในไบโอฟิล์มที่ในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง มี 2 สปีชีส์ คือ *L. farraginis* และ *L. parafarraginis* โดยเป็นสปีชีส์ *L. farraginis* คิดเป็นสัดส่วน 93.75% ของไอโซเลตทั้งหมด

อภิปรายผล

การปนเปื้อน จากแบคทีเรียถือว่าเป็นปัญหาสำคัญที่พบในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพ เนื่องจากกระบวนการผลิตไม่ได้ดำเนินการในสภาวะปลอดเชื้อ โดยแบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้มากและพบได้บ่อยที่สุด เนื่องจากสามารถปรับตัวในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลที่สูง ค่าพีเอชต่ำ อุณหภูมิสูง และสภาวะออกซิเจนที่ต่ำในระหว่างการหมักเอทานอลได้ (Narendranath et al., 1997; Beckner et al., 2011) ซึ่งส่งผลต่อปริมาณผลผลิตเอทานอล

เนื่องจากความสามารถในการหมักและการเจริญของเซลล์ยีสต์ลดลง (Basso et al., 2011) นอกจากนั้นแบคทีเรียแลคติกยังก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบนผิววัสดุที่ใช้ทำถังหมักและอุปกรณ์ต่าง ๆ ได้ ทำให้น้ำยาทำความสะอาด สารฆ่าเชื้อ รวมถึงยาปฏิชีวนะผ่านเข้าไปทำลายแบคทีเรียที่อยู่ภายในโครงสร้างของไบโอฟิล์มได้น้อยลง จึงกำจัดได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ที่ไม่ได้อยู่ในรูปไบโอฟิล์ม (Ceri et al., 1999) อีกทั้งแบคทีเรียที่อยู่ในรูปไบโอฟิล์มจะแพร่กระจายไปยังพื้นผิวบริเวณอื่นและก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม ไบโอฟิล์มจึงเป็นแหล่งของการปนเปื้อนซ้ำในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

งานวิจัยนี้ศึกษาการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ซึ่งกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอลชีวภาพของประเทศไทย (อภิชาต จงสกุล, 2555) เนื่องจากมีราคาถูก ซึ่งในโรงงานนี้ได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มโมเนนซินในการควบคุมแบคทีเรียปนเปื้อนและใช้กระบวนการผลิตเอทานอลแบบกึ่งต่อเนื่องที่ใช้ถังหมักจำนวน 6 ถัง ผลการศึกษาพบว่าในทุก ๆ ตัวอย่างตั้งแต่ถังเลี้ยงยีสต์ ถังหมักเอทานอล ถังที่ 1-6 และถังเก็บน้ำหมักรอกัน มีแบคทีเรียแลคติก โดยในถังเลี้ยงยีสต์พบจำนวนแบคทีเรียแลคติกสูงที่สุด คือ 8.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-2) ซึ่งการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลจะนำกากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้นสูง (ประมาณ 80 องศาบริกซ์) มาเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 12-16 องศาบริกซ์ เพื่อใช้ในขั้นตอนการเลี้ยงยีสต์ โดยไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน จึงทำให้แบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนอยู่ในกากน้ำตาลเข้มข้นซึ่งไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ เนื่องจากถูกยับยั้งด้วยแรงดันออสโมติก นอกจากนั้นแบคทีเรียแลคติกส่วนหนึ่งอาจมาจากยีสต์แห้งที่ใช้เป็นหัวเชื้อ (Takeda, Okada, & Kozaki, 1984) ในการหมักเอทานอล อีกทั้งยังพบแบคทีเรียแลคติกในถังหมักทั้ง 6 ถัง ซึ่งคาดว่าเกิดจากการถ่ายน้ำหมักจากถังหนึ่งสู่ถังหนึ่งต่อเนื่องกัน รวมทั้งพบแบคทีเรียแลคติกในถังรอกันด้วย จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้พบแบคทีเรียแลคติกสปีชีส์ที่คล้ายคลึงกันในทุก ๆ ถัง เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นที่รายงานว่าวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตเอทานอล เช่น น้ำอ้อย มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอยู่ที่ 7.4×10^7 - 6.0×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (Lucena et al., 2010)

Lactobacillus เป็นยีสต์ของแบคทีเรียแลคติกที่พบได้บ่อยในโรงงานเอทานอล เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ ซึ่งพบว่าใน 7 ไอโซเลต ที่แยกได้จัดอยู่ในยีสต์นี้และจากการระบุสปีชีส์ของแบคทีเรีย โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบทั้งหมด 5 สปีชีส์ ได้แก่ *L. farraginis*, *L. pantheris*, *L. farciminis*, *L. formosensis* และ *L. plantarum* group (ตารางที่ 4-3, ภาพที่ 4-4) ซึ่ง 4 สปีชีส์แรกไม่เคยมีรายงานการพบในโรงงานเอทานอลมาก่อน ความหลากหลายของแบคทีเรียแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอลเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย รวมทั้งที่ตั้ง ชนิดและขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ มีรายงานที่โรงงานที่ใช้ข้าวโพด หรือเส้นใยไฮโดรไลเซต

(Fiber hydrolysates) เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลประเทศสหรัฐอเมริกา พบการปนเปื้อน *Lactobacillus acidophilus*, *L. agilis*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. fermentum*, *L. plantarum* และ *Weissella paramesenteroides* (Skinner & Leather, 2004; Schell et al., 2007) ในขณะที่โรงงานผลิตเอทานอลของประเทศเกาหลีที่ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ มีการปนเปื้อนจาก *Lactobacillus fermentum*, *L. salivarius* และ *L. casei* (Chang et al., 1995) นอกจากนี้ความแตกต่างของสปีชีส์ที่พบอาจเกี่ยวข้องกับเทคนิคที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ มีรายงานว่าโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบแห่งเดียวกับการศึกษาครั้งนี้พบ *Lactobacillus plantarum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. pantosus*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* และ *Pediococcus damnosus* ซึ่งในการจัดจำแนกสปีชีส์อาศัยลักษณะทางชีวเคมีที่อยู่ในฐานข้อมูลของ API50 CHL (ศิริ โคม พุงเกล้า และพิริยา พัฒนาเจริญสุข, 2557; ศิริ โคม พุงเกล้า และนันทพร เจริญเจริญ; 2558) การระบุสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API50 CHL เป็นวิธีการทางชีวเคมีที่อาศัยความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตในการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก ซึ่งในระดับสปีชีส์อาจให้ผลไม่แม่นยำ สอดคล้องกับ Balcazar et al. (2007) ที่ระบุว่าแบคทีเรียแลคติกจำนวน 13 ไอโซเลต ที่แยกได้จากปลาแซลมอน เมื่อจัดจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบ API50 CHL เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ ยีน 16S rRNA การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA บริเวณ V1 และ V2 ซึ่งเป็นบริเวณแปรผัน (Viable regions) ให้ค่าความคล้ายคลึงของการจัดจำแนกสูงถึง 99.70-100.00% ในขณะที่การใช้ชุดทดสอบ API50 CHL ให้ค่าความคล้ายคลึงเพียง 57.70-90.00% และในการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่พบในช่องคลอดของผู้หญิง จำนวน 135 คน ด้วยชุดทดสอบ API50 CHL พบ *Lactobacillus acidophilus* (34.8%), *L. crispatus* (27.2%) และ *L. fermentum* (13%) ในขณะที่เมื่อใช้วิธีทางพีซีอาร์ พบ *L. crispatus* (32.6%), *L. jensenii* (25%) และ *L. gasseri* (20.6%) นอกจากนี้ยังใช้ชุดทดสอบ API50 CHL กับ *L. jensenii* (ATCC 252580) และ *L. gasseri* (ATCC 9857) ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานจะถูกจัดจำแนกเป็น *L. acidophilus* ส่วน *L. reuteri* (ATCC 53608) จัดจำแนกเป็น *L. fermentum* ในขณะที่ *L. rhamnosus* (ATCC53103) ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ อาจมีสาเหตุจากข้อมูลทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถจัดจำแนกได้ (Brolazo et al., 2011)

แบคทีเรียแลคติกทั้ง 4 สปีชีส์ ได้แก่ *L. farciminis*, *L. pantheris*, *L. formosensis* และ *L. farraginis* ที่พบในโรงงานผลิตเอทานอลในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานการพบในโรงงานเอทานอลมาก่อน โดย *L. farciminis*, *L. pantheris* และ *L. formosensis* จัดเป็นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม Homolactic fermentation ซึ่งเป็นกลุ่มที่สลายน้ำตาลกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติกเพียงชนิดเดียว โดยใช้วิถีไกลโคไลซิส (Paul et al., 2009; Chang, Chen, Lee, Chang, & Yu, 2015) ในขณะที่ *L. farraginis* เป็นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม Heterolactic fermentation ซึ่งหมักน้ำตาล

กลูโคส ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล โดยผ่านวิถี Phospho ketolase นอกจากนี้สามารถสลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นได้อีกหลายชนิด ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก (Endo & Okada, 2007) ดังนั้นการมีแบคทีเรียแลคติกที่เจริญร่วมกับยีสต์ในการหมักเอทานอล นอกจากจะทำให้เกิดการแข่งขันกับยีสต์ในการใช้สารอาหารแล้ว กรดแลคติกและกรดอะซิติกที่แบคทีเรียเหล่านี้ผลิต อาจมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ด้วย (Maiorella, Blanch, & Wilke, 1983)

มีหลายรายงานกล่าวว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบในถังหมักเอทานอลสามารถก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ (Skinner-Nemec et al., 2007; Muthaiyan & Ricke, 2010) ซึ่งเซลล์ในไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่าเซลล์ที่อยู่ในรูป Planktonic cell จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปัญหาการปนเปื้อนแบคทีเรียในถังหมักเอทานอลมีความรุนแรงขึ้น (Stewart et al., 2004) เนื่องจากโครงสร้างนี้ทำให้แบคทีเรียทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมในถังหมัก ส่งผลต่อเชื้อปนเปื้อนที่ยังคงอยู่ในระบบการผลิตแบบเรือร้าง (Skinner-Nemec, et al., 2007) ซึ่งจากการทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของตัวแทนแบคทีเรียแลคติกคัดแยกได้จำนวน 7 ไอโซเลต บนแผ่นเหล็กกล้า ชนิด ASI 304 แบบเชื้อเดี่ยว พบว่าแบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลตสร้างไบโอฟิล์มได้ เมื่อบ่มในกากน้ำตาลนาน 24-48 ชั่วโมง โดยแต่ละสปีชีส์มีความสามารถในการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มที่แตกต่างกันและขึ้นอยู่กับระยะเวลา ความสามารถในการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของพื้นผิว สภาวะการทดสอบ แหล่งของคาร์บอนและสารอาหาร รวมถึงสปีชีส์และสายพันธุ์ของแบคทีเรีย มีหลายงานวิจัยที่พบว่าแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกัน แต่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มแตกต่างกันซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม เช่น ความสามารถในการสร้าง EPS (Extracellular polymeric substances) เนื่องจาก EPS เป็นสารที่แบคทีเรียขับออกมาภายนอกเซลล์ ทำหน้าที่เป็นสารเชื่อมระหว่างเซลล์ด้วยกันเอง และเซลล์กับพื้นผิววัสดุส่งผลทำให้เกิดการรวมตัวในรูปของโคโลนีที่แข็งแรงและความสามารถในการสร้างกรด Lipoteichoic (LTA) ซึ่งเป็นกรด Teichoic ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีส่วนประกอบของกลีเซอรอล ฟอสเฟตในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก มีหน้าที่ในการจับกันของไอออนบวก การยึดเกาะของโปรตีนที่ผนังเซลล์ และทนต่อเปปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides) มีส่วนสำคัญในการยึดเกาะของเซลล์และการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม โดยที่กรด Teichoic เป็นสิ่งจำเป็นที่ใช้ในการยึดเกาะเริ่มต้นของแบคทีเรียกับพื้นผิว (กุลสุชา ปิ่นเงิน และคณะ, 2559; Lebeer, Verhoeven, Ve'lez, Vanderleyden, & Keersmaecker, 2007; Andersson, Rajarao, Land, & Dalhammar, 2008; Bremer, Flint, Brooks, & Palmer, 2015) สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าปริมาณไบโอฟิล์มของ

Lactobacillus สปีชีส์เดียวกัน คือ *L. farraginis* (ไอโซเลต KA 05 และ KA 07) มีความแตกต่างกันเมื่อบ่มที่ระยะเวลาเท่ากัน

เนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลสามารถดำเนินในสภาวะไม่ปลอดเชื้อได้ ดังนั้นเพื่อควบคุมระดับของแบคทีเรียปนเปื้อนไม่ให้เกิดผลเสียต่อการผลิต โรงงานเอทานอลจึงมีการใช้วิธีการต่างๆ ในการจัดการกับปัญหา รวมทั้งการเติมยาปฏิชีวนะ โดยโรงงานเอทานอลที่นำมาศึกษาเลือกใช้ยา Monensin X เติมลงในถังหมักให้มีความเข้มข้นประมาณ 5 ppm ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไป จึงทดสอบประสิทธิภาพของยาชนิดนี้ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียแลคติกอยู่ร่วมกับยีสต์สามารถสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมได้เช่นเดียวกัน โดยไบโอฟิล์มประกอบด้วยเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ยีสต์เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มียา Monensin X พบว่าไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกในน้ำหมักที่เติมยา Monensin X มีความหนาแน่นน้อยกว่าในสภาวะที่ไม่ได้เติมยาปฏิชีวนะ โดยมีปริมาณน้อยลงถึง 80.38% ภายในเวลา 24 ชั่วโมงแรก และยับยั้งได้จนถึง 96 ชั่วโมง รวมถึงการใช้ยา Monensin X ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ลดลง และปริมาณเซลล์แบคทีเรียแลคติกในรูป Planktonic cell ในน้ำหมักที่เติมยา Monensin X มีปริมาณเซลล์ลดลง 15.79 % แสดงให้เห็นว่ายา Monensin X สามารถลดปริมาณการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกได้ ซึ่งอาจเกิดจากที่ Monensin X มีฤทธิ์ยับยั้งและทำลายแบคทีเรียแลคติก ทำให้มีจำนวนในกาน้ำตาลลดลง ส่งผลให้การก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมลดลง สอดคล้องกับการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งในกลุ่มโมเนนซินของโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบในอเมริกาใต้ เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 3 ppm สามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียแลคติกจาก 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ภายใน 96 ชั่วโมงและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติกลดลงเมื่อมีระยะเวลาในการหมักนานขึ้น โดยมี ปริมาณอยู่ที่ 1.5×10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง (7 วัน) (Paul, 2010) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะมีผลเพียงลดการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติก แต่ไม่สามารถป้องกันการสร้างไบโอฟิล์ม

แบคทีเรียแลคติกที่พบมากในไบโอฟิล์มของเชื้อผสมมี 2 สปีชีส์ ได้แก่ *L. farraginis* และ *L. parafarraginis* (ตารางที่ 4-7 และภาพที่ 4-8) คิดเป็นสัดส่วน 93.75% และ 6.25% ของไอโซเลตที่นำมาระบุสปีชีส์ ตามลำดับ การที่พบสปีชีส์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักจำลองเพียง 2 สปีชีส์นั้น อาจมีสาเหตุมาจากความจำเพาะในการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มร่วมกันของเซลล์แบคทีเรียแลคติกและเซลล์ยีสต์ ซึ่งจากการศึกษาของ Furukawa, Yoshida, Ogihara, Yamasaki, & Morinaga (2010) พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกเพียง 13 สปีชีส์ จาก 76 สปีชีส์

ที่ก่อตัวเป็น ไบโอฟิล์มร่วมกันกับเซลล์ยีสต์ได้ และมีเพียงยีสต์บางสปีชีส์เท่านั้น ที่สามารถเกิด ไบโอฟิล์มร่วมกันกับแบคทีเรียเช่นเดียวกัน เนื่องจากกระบวนการก่อตัวเป็น ไบโอฟิล์มนั้น ต้องอาศัยการเกาะกันของเซลล์ (Cell-cell adhesion) ระหว่าง โปรตีน DnaK บนพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรียแลคติกและน้ำตาลแมนโนส (Mannose-rich polysaccharide) หรือแมนแนน ที่อยู่บนพื้นผิวของเซลล์ยีสต์ เกิดเป็นกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ยีสต์ (Co-aggregation) (Furukawa et al., 2011)

โรงงานผลิตเอทานอลชีวภาพที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่นำมาศึกษามีการใช้ยา Monensin X ในการควบคุมแบคทีเรียปนเปื้อน ซึ่งแม้ว่ายาปฏิชีวนะนี้จะได้รับการประเมินผลกระทบในด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การย่อยสลายของยาในดิน และผลของยาปฏิชีวนะต่อพืช พบว่า Monensin X สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในดิน โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อพืช เมื่ออยู่ที่อัตรา 1.12 – 2.24 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ (Paul, 2010) แต่ผลการศึกษายืนยันได้ว่ายาปฏิชีวนะชนิดนี้ไม่สามารถกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนให้หมดไปจากกระบวนการผลิตได้ ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียพัฒนาการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อใช้เป็นระยะเวลาาน ถ้าหากมียาปฏิชีวนะจากกระบวนการผลิตลงสู่สิ่งแวดล้อมก็มีโอกาสจะมียาปฏิชีวนะตกค้างอยู่ด้วยอาจไปกระตุ้นให้แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมเกิดการดื้อยาขึ้นมาและแบคทีเรียเหล่านี้ก็มีโอกาสจะถ่ายทอดการดื้อยาไปสู่แบคทีเรียอื่นๆ ได้ จึงต้องมีการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม รวมทั้งแบคทีเรียแลคติกยังสามารถก่อตัวเป็น ไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม ซึ่งเป็นวัสดุชนิดเดียวกับที่ใช้ในถังหมักของโรงงาน ซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพในการทำมาสะอาดและฆ่าเชื้ออุปกรณ์การผลิตลดลงและเกิดการปนเปื้อนซ้ำภายในโรงงาน ในขณะที่การใช้ยีน 16S rRNA จัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก พบว่ามีบางไอโซเลต (KA 01 และ KA 06) จัดอยู่ใน *L. plantarum* group และไม่สามารถระบุเป็นสปีชีส์ได้ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีความหลากหลายและมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูง อาจไม่สามารถจำแนกเป็นสปีชีส์ได้ด้วยเพียงยีน 16S rRNA เพียงอย่างเดียว ในหลายการศึกษาจึงได้มีการใช้เทคนิคอื่น ๆ มาจัดจำแนกสปีชีส์ด้วย เช่น การใช้ DNA hybridization หรือใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน 16S rRNA ร่วมกับ ยีน *atpA* (Song & Leff, 2005; Ao et al., 2012)

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่มีการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลมาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติก รวมทั้งศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม เพื่อนำข้อมูลจากการศึกษามาหาแนวทางในการควบคุมการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีอื่นๆ นอกเหนือจากการใช้ยาปฏิชีวนะหรือใช้ในปริมาณที่น้อยลง เพื่อลดการสูญเสียผลผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลชีวภาพ รวมถึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมให้น้อยที่สุด

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแลคติกและปริมาณเซลล์แบคทีเรียแลคติกในสภาวะการหมักจำลองที่เติมยา Monensin X และไม่ได้เติมเป็นชุดควบคุม ควรติดตามผลปริมาณไบโอฟิล์มและปริมาณเซลล์ในน้ำหมักควบคู่กันจนถึง 96 ชั่วโมง เพื่อดูแนวโน้มและลักษณะการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม

บรรณานุกรม

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. (ม.ป.ป.). *คู่มือการพัฒนาและการลงทุน ผลิตภัณฑ์พลังงานทดแทนชนิดที่ 7 เชื้อเพลิงเอทานอล*. เข้าถึงได้จาก <http://webkc.dede.go.th/testmax/sites/default/files/%E0%B9%80%E0%B8%8A%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B9%80% A5.pdf>.
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. (2551). *เอทานอล Ethanol*. เข้าถึงได้จาก http://www.tapiocathai.org/Articles/51_1.pdf.
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. (2558). *รายงานคุณภาพพลังงานของประเทศไทย*. เข้าถึงได้จาก http://www.dede.go.th/download/state_59/Thailand%20alternative%20energy%202015.pdf.
- กุลสุชา ปิ่นเงิน, อัฐพงษ์ กิตติชัยวัชร, อภิสัทธ์ โฆษิตชัยยงค์, สันติ มิตรประเสริฐพร, เอกชัย วิมลมาลา และณรงค์ฤทธิ์ สมบัติสมภพ. (2559). การเกิดไบโอฟิล์มบนพอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำเชิงเส้นที่เติมสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเอชพีคิวเอ็ม. ใน *งานประชุม มสธ. วิจัยประจำปี 2558 (STOU Research 2015)* (หน้า 94-105). นนทบุรี: มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.
- จักรพันธ์ ถาวรธิดา และจันทนีย์ นพรัตน์อาภากุล. (2552). *การเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยาสำหรับการศึกษาค้นคว้ากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน*. เข้าถึงได้จาก <http://www.microscopic.center.sci.buu.ac.th/images/website/Sample%20Prepare.pdf>.
- ณฐนนท์ ทรายชู. (2551). *จุลินทรีย์ในแผ่นชีวะ*. มหาสารคาม: อภิชาติการพิมพ์.
- เดือนรุ่ง เบญจมาศ, ถาวร นิยมเลี้ยง, นิพนธ์ วุฒิชัย และจิรพร สวัสดิการ. (2549). *การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากผลผลิตทางการเกษตรคุณภาพต่ำในจังหวัดนนทบุรี*. นนทบุรี: มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี.
- ธนาคารแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. (2558). *รายงานสถานการณ์เอทานอลปี 2558 และแนวโน้มปี 2559*. เข้าถึงได้จาก https://www.bot.or.th/Thai/MonetaryPolicy/NorthEastern/Doclib_CommodityYearly/Y2558_Ethanol.pdf.
- นุชนาด ลอยจิว. (2551). *การวิเคราะห์ผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมตลอดวัฏจักรชีวิตของระบบผลิตเอทานอลสำหรับเชื้อเพลิงแก๊สโซฮอล์ในประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิศวกรรมพลังงาน, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ และเค โช ขุนนคร. (ม.ป.ป.). *เอทานอล : พลังงานทดแทนในวิถีพอเพียง*. เข้าถึงได้จาก http://www.csr.chula.ac.th/sufficiency_economy/images/stories/file/article_sujita.pdf.
- สุภารัตน์ สวนจิตร. (2555). *บทปฏิบัติการ การจัดจำแนกจุลินทรีย์โดยอาศัยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ*. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สุวัฒน์ หนูคีรี. (ม.ป.ป.). *น้ำมันแก๊สโซฮอล์: Gasohol Fuel*. เข้าถึงได้จาก <http://www.neutron.rmutphysics.com/physicsboard/forum/index.php?topic=865.0;wap2>.
- นคร ทิพย์วงศ์. (2552). *เทคโนโลยีการแปลงสภาพชีวมวล*. กรุงเทพฯ: พิมพ์ดีการพิมพ์.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. (2551). *เราไม่ถั่งน้ำมัน*. กรุงเทพฯ: ฐานการพิมพ์.
- สำนักงานสรรพสามิตภาคที่ 3. (2554). *คลังความรู้เรื่องเอทานอล*. เข้าถึงได้จาก <http://www3.excise.go.th/ebook/dep3/data/atanol.pdf>.
- ปฏิพล ชัยเทพ, ไพรัช สาใจ และ รัชฎาภรณ์ ปวงก้องตัน. (2555). *การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อน*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร, วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.
- ปนนท์ ธนเจริญวัชร และละณี สุขถิ่นไทย. (2547). ผลของโมเนนซินต่อการเจริญเติบโตของไก่ และการตกค้ำในเนื้อไก่. *สัตวแพทยสาร*, 55, 28-36.
- ปริยดา ตันจักร. (2550). *การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติก*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รุจรักษ์ ฐระกิจ. (2552). *ผลของน้ำมันปาล์มเกรดมาติก และ โมเนนซินต่อประสิทธิภาพการหมักและการย่อยได้ของโภชนะของโคระยะแห่งนม และสมรรถภาพการผลิตของโคนเนื้อ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาสัตวศาสตร์, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศิริ โฉม ทุ่งแก้ว และพิริยา พัฒนาเจริญสุข. (2557). การปนเปื้อนและการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติกในโรงงานผลิตเอทานอล. ใน *งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Burapha University International Conference 2014)* (หน้า 206). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

- ศิริ โฉม พุงเกล้า และนันทพร เจริญเจริญ. (2558). อุบัติการณ์และการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบของประเทศไทย . ใน *งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Burapha University International Conference 2015)* (หน้า 743-749). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อัจฉรา เพิ่ม. (2549). *แบคทีเรียแลคติก Lactic acid bacteria*. สงขลา: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- อภิชาติ จงสกุล. (2555). *เอทานอล : อนาคตพลังงานทดแทนไทย*. เข้าถึงได้จาก http://www.aftc.or.th/report_pub/ethanol.pdf.
- Abed, T. A. (2013). Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA of cultured *Lactobacillus* colony isolated from dairy products. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 1, 20-35.
- Afifi, N. A. (2014). *Anticoccideal Drugs*. Retrieved from http://scholar.cu.edu.eg/nehalaafifi/files/anticoccideal_drugs.pdf.
- Andersson, S., Rajarao, G. K., Land, C. J., & Dalhammar, G. (2008). Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letter*, 283, 83–90.
- Ao, X., Zhang, X., Zhang, X., Shi, L., Zhao, K., Yu, J., Dong, L., Cao, Y., & Cai, Y. (2012). Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. *Journal of dairy science*, 95, 1073-1084.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria. In S. Salminen, A. V. Wright & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded* (pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.
- Balcazar, J. L., Blas, I. D., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O., & Muzquiz, J. L. (2007). Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 30, 111–118.
- Basso, L. C., Amorim, H. V., Oliveira, A. J., & Lopes, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *Federation of European Microbiological Societies*, 8, 1155–1163.

- Basso, L. C., Basso, T. O., & Rocha, S. N. (2011). *Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation*. Retrieved from <http://ebookbrowse.net/intech-ethanol-production-in-brazil-the-industrial-process-and-its-impact-on-yeast-fermentation-pdf-d174596929>.
- Beckner, M., Lvey, M. L., & Phister, T. G. (2011). Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 387–394.
- Bremer, P., Flint, S., Brooks, J., & Palmer, J. (2015). Bacteria outer surface and attachment. In K. H. Teh, S. Flint, J. Brooks & G. Knight (Eds.), *Biofilms in the Dairy Industry* (pp. 22-23). UK: John Wiley & Son.
- Brolazo, E. M., Leite, D. S., Tiba, M. R., Villarroel, M., Marconi, C., & Simoes, J. A. (2011). Correlation between api 50 ch and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 225-232.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D. W., & Buret, A. G. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities in bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1771–1776.
- Chang, C. H., Chen, Y. S., Lee, T. T., Chang, Y. C., & Yu, B. (2015). *Lactobacillus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from fermented soybean meal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 101–106.
- Chang, I., Kim, B. H., Shin, P. K., & Lee, W. (1995). Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5, 309–314.
- Choi, N. Y., Baek, S. Y., Yoon, J. H., Choi, M. R., Kang, D. H., & Lee, S. Y. (2012). Efficacy of aerosolized hydrogen peroxide-based sanitizer on the reduction of pathogenic bacteria on a stainless steel surface. *Food Control*, 27, 57-63.
- de Oliva-Neto, P., & Yokoya, F. (2001). Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 10-14.

- Desai, M., Bühler, T., Weller, P. H., & Brown, M. R. (1998). Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *42*, 153–160.
- Endo, A., & Dicks, L. M. T. (2014). Physiology of the LAB . In W. H. Holzapfel & B. J. B. Wood (Eds.), *Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy* (pp. 2-30). UK: John Wiley & Son.
- Fankhauser, D. B. (2002). *Preparation of wet mount slide*. Retrieved from http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/Wet_Mount/Wet_Mount.htm.
- Ferreira, C., Pereira, A. M., Melo, L. F., & Simões, M. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 845-854). Spain: Formatex.
- Furukawa, S., Nojima, N., Yoshida, K., Hirayama, S., Ogihara, H., & Morinaga, Y. (2011). The importance of inter-species cell-cell co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in mixed-species biofilm formation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *75*, 1430–1434.
- Furukawa, S., Yoshida, K., Ogihara, H., Yamasaki, M., & Morinaga, Y. (2010). Mixed-species biofilm formation by direct cell-cell contact between brewing yeasts and lactic acid bacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *74*, 2316-2319.
- Gilbert, P., & Brown, M. R. W. (1995). Mechanisms of the protection of bacterial biofilms from antimicrobial agents. In H. M. Lappin-Scott, J. W. Costerton & J. Lynch (Eds.), *Microbial Biofilms. Plant and Microbial Biotechnology Research Series, vol. 5*. (pp. 118–130). Cambridge : Cambridge University Press.
- Gibbons, W. R., & Westby, C. A. (1996). Use of potassium metabisulfite to control bacterial contaminants during fermentation of fodder beet cubes for fuel ethanol. *Biomass*, *11*, 99-113.
- Hoffman, T. L. (2006). *Counting Cells*. Retrieved from <http://digitus.itk.ppke.hu/cseri/edu/Books/Cell%20Biology/Volume%201/Part%20A/Chapter03.pdf>.

- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 36–73.
- Joseph, O. R., Timothy, D. L., Melinda, S. N., & Kenneth, M. B. (2011). Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. *Bioresource Technology*, 102, 1124–1130.
- Kawarai, M. Y. T., Furukawa, S., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2007). Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4673–4676.
- Khan, Z., & Dwivedi, A. K. (2012). Fermentation of biomass for production of ethanol: A review. *Universal journal of environmental research and technology*, 3, 1-13.
- Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M. J., Procop, G. W., & Bauer, T. W. (2009). Improved detection of biofilm-formative Bacteria by vortexing and sonication. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 467, 1360–1364.
- Knittel, C. R., & Smith, A. (2012). *Ethanol Production and Gasoline Prices: A Spurious Correlation*. Retrieved from http://web.mit.edu/knittel/www/papers/knittelsmith_latest.pdf.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 381–386.
- Leathers, T. D., Bischoff, K. M., Rich, J. O., Price, N. P. J., Manitchotpisit, P., Nunnally, M., & Anderson, A. M. (2014). Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. *Bioresource Technology*, 169, 45–51.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Ve'lez, M. P., Vanderleyden, J., & Keersmaecker, S. C. J. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6768–6775.
- Liu, W., Bao, Q., Jirimutua, Qing, M., Sirigulenga, Chen, X., Sun, T., Li, M., Zhang, J., Yu, J., Bilige, M., Sun, T., & Zhang, H. (2012). Isolation and identification of lactic acid

- bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological Research*, 167, 110–115.
- Lopes, N. P., Almeida-Paz, F. A., & Gates, P. J. (2006). Influence of the alkali metal cation on the fragmentation of monensin in ESI-MS/MS. *The Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 363-367.
- Lucena, B. T. L., Santos, B. M., Moreira, J. L. S., Moreira, A. P. B., Nunes, A. C., Azevedo, V., Miyoshi, A., Thompson, F. L., & Morais Junior, M. A. (2010). Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *Biomedcentral microbiology*, 10, 298.
- Maiorella, B., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 103–121.
- Makanjuola, D. B., Tymon, A., & Springham, D. G. (1992). Some effects of lactic acid bacteria on laboratory scale yeast fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 351–357.
- Mattila, K. (2002). *Biofilms on stainless steels exposed to process waters*. Doctoral dissertation, Department of applied chemistry and microbiology, Division of microbiology, University of Helsinki Finland.
- Marques, S. C., Silva Rezende, J. G. O., Freitas Alves, L. A., Silva, B. C., Alves, E., Abreu, L. R., & Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilm by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surface and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 538-543.
- Muthaiyan, A., & Ricke, S. C. (2010). Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermentors. *Bioresource Technology*, 101, 5033–5042.
- Narendranath, N. V., Hynes, S. H., Thomas, K. C., & Ingledew, W. M. (1997). Effects of *Lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4158-4163.
- Narendranath, N. V., & Power, R. (2004). Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 581–584.
- Narendranath, N. V., Thomas, K. C., & Ingledew, W. M. (2000). Urea hydrogen peroxide reduces

- the numbers of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4187-4192.
- Narendranath, N. V., & Power, R. (2004). Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 581–584.
- Oxoid. (1998). *The Oxoid manual*. Retrieved from http://sst-web.tees.ac.uk/external/u0003076/Food_micro/oxoidmanual.pdf.
- Paul, D. V., George, M. G., Dorothy, J., Noel, R. K., Wolfgang, L., Fred, A. R., Karl-Heinz, S., & William, B. W. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology second edition volume Three: The firmicutes*. New York: Springer.
- Paul, J. (2010). *Controlling Bacterial Contamination in Ethanol fermentation Processes*. Retrieved from <http://www.ungda.com/upload/File/kamoran/Kam%20full%20Tech%20data.pdf>.
- Rich, J. O., Leathers, T. D., Nunnally, M. S., & Bischoff, K. M. (2011). Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. *Bioresource Technology*, 102, 1124-1130.
- Robert, W. (2012). *Brazil ethanol developments & implications for the u.s. ethanol industry*. Retrieved from http://www.agmrc.org/renewable_energy/ethanol/brazil-ethanol-developments--implications-for-the-us-ethanol-industry/.
- Rochex, A., & Lebeault, J. M. (2007). Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine. *Water Research*, 2885 – 2892.
- Romani, A., Pereirab, F., Johanssonb, B., & Dominguesa, L. (2015). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2nand CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. *Bioresource Technology*, 179, 150–158.
- Rossoni, E. M. M., & Gaylarde, C. C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 81–85.

- Russell, J. B. (1987). A proposed mechanism of monensin action in inhibiting rumen bacterial growth : effects on ion flux and protonmotive force. *Journal of Animal Science*, *64*, 1519-1525.
- Schell, D. J., Dowe, N., Ibsen, K. N., Riley, C. J, Ruth, M. F., & Lumpkin, R. E. (2007). Contaminant occurrence identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. *Bioresource Technology*, *98*, 2942-2948.
- Schneider, S. H., Easterling, W. E., & Mearns, L. O. (2000). Adaptation: Sensitivity to natural variability, agent assumptions, and dynamic climatic changes. *Climatic Change*, *45*, 203–221.
- Shunmugaperumal, T. (2010). *Biofilm eradication and prevention*. Singapore: Wiley & Sons.
- Skinner, K. A., & Leather, T. D. (2004). Bacteria contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *9*, 401-408.
- Skinner-Nemec, K. A., Nichols, N. N., & Leathers, T. D. (2007). Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Biotechnology*, *29*, 379–383.
- Song, B., & Leff, L. G. (2005). Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station. *Microbiological Research*, *160*, 111—117.
- Stambuk, B. U. (2013). Biotechnology strategies with industrial fuelethanol *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient 1st and 2nd generation bioethanol production from sugarcane. *BioMed Central*, *8*, 1-2.
- Stewart, P. S. (1994). Biofilm accumulation model that predicts antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *38*, 1052–1058.
- Stewart, P. S., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2004). Biofilm antimicrobial resistance. In M. Ghannoum & G. A. O’Toole (Eds.), *Microbial Biofilms*. (pp. 250–268). Washington : ASM Press.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, *36*, 1–29.
- Stroppa, C. T., Andrietta, M. G. S., Andrietta, S. R., Steckelberg, C., & Serra, G. E. (2000). Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentation. *International Sugar Journal*, *102*, 78-82.

- Takeda, T., Okada, S., & Kozaki, M. (1984). Characteristics of lactic acid bacteria isolated from bread-dough, compressed-yeast and active dry-yeast. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, *31*, 642-648.
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 1-15.
- Welch, K., Cai, Y., & Strømme, M. (2012). A Method for quantitative determination of biofilm viability. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, *3*, 418-431.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหาร de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) (Oxoid, 1998)

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Polysorbate	80	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหาร de Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth) (Oxoid, 1998)

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Polysorbate	80	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ช่วงส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์
ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. Ethylene diamine tetraacetic (EDTA) 0.5 โมลาร์

EDTA (disodium salt, MW = 372.24)	18.6 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยแม่เหล็กค้อยๆ เติมเกล็ด NaOH ลงจนกระทั่งได้พีเอชเท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่ละลายหมดพอดี ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Tris-HCl (พีเอช 8.0) 1 โมลาร์

Tris-base	121.1 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย Tris-base ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชด้วย HCl เข้มข้น จนมีพีเอชเท่ากับ 8.0 (ใช้ HCl เข้มข้น ปริมาตร 42 มิลลิลิตร) เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. TE buffer (Tris-Cl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0)

Tris-Cl 1 โมลาร์	1 มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์	2 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 97 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน (สูตรรัตน์ สวนจิตร, 2557)

4. สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- 4.1 Osmium tetroxide เข้มข้น 1%
- 4.2 สารละลาย PBS 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4
- 4.3 เอทานอลความเข้มข้น 50, 70, 80, 90 และ 100%

ภาคผนวก ก
การเตรียมยาปฏิชีวนะ

การเตรียมยาปฏิชีวนะ

1. การเตรียมยา Stock ยาปฏิชีวนะ Cycloheximide 0.01% (0.1 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร)

1.1 ชั่งยาปฏิชีวนะ Cycloheximide 0.5 กรัม นำมาละลายในน้ำ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.2 กรองยาปฏิชีวนะด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน บรรจุลงในขวดแก้วที่ปราศ
จากเชื้อ

1.3 เติมยาปฏิชีวนะลงในอาหาร MRS agar โดยที่ ยาปฏิชีวนะ 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น
ของยาอยู่ที่ 0.01 กรัม

ภาคผนวก ง
การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกซึ่งแยกได้จากกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพ จำนวน 7 ไอโซเลต คือ KA 01, KA 02, KA 03, KA 04, KA 05, KA 06 และ KA 07 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LAC16F และ LAC16R และนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลต ความยาว 1,445, 1,431, 1,446, 1,447, 1,447, 1,434 และ 1,449 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ดังแสดงรายละเอียดต่อไปนี้

(1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KA 01 ความยาว 1,445 นิวคลีโอไทด์

1	ATACATGCAA	GTCGAACGAA	CTCTGGTATT	GATTGGTGCT	TGCATCATGA
51	TTTACATTTG	AGTGAGTGGC	GAAGTGGTGA	GTAACACGTG	GGAAACCTGC
101	CCAGAAGCGG	GGGATAACAC	CTGAAAACAG	ATGCTAATAC	CGCATAACAA
151	CTTGACC CGC	ATGGTCCGAG	TTTGAAAGAT	GGCTTCGGCT	ATCACTTTTG
201	GATGGTCCCG	CGGCGTATTA	GCTAGATGGT	GGGGTAACGG	CTCACCATGG
251	CAATGATACG	TAGCCGACCT	GAGAGGGTAA	TCGGCCACAT	TGGGACTGAG
301	ACACGGCCCA	AACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTAGGGAATC	TTCCACAATG
351	GACGAAAAGTC	TGATGGAGCA	ACGCCGCGTG	AGTGAAGAAG	GGTTTCGGCT
401	CGTAAAACCTC	TGTTGTAAAA	GAAGAACATA	TCTGAGAGTA	ACTGTTCAAGG
451	TATTGACGGT	ATTTAACCAG	AAAGCCACGG	CTAACTACGT	GCCAGCAGCC
501	GCGGTAATAC	GTAGGTGGCA	AGCGTTGTCC	GGATTTATTG	GGCGTAAAGC
551	GAGCGCAGGC	GGTTTTTTAA	GTCTGATGTG	AAAGCCTTCG	GCTCAACCGA
601	AGAAGTG CAT	CGGAAAACCTG	GAAACTTGAG	TGCAGAAGAG	GACAGTGGAA
651	CTCCATGTGT	AGCGGTGAAA	TGCGTAGATA	TATGGAAGAA	CACCAGTGGC
701	GAAGGCGGCT	GTCTGGTCTG	TAAGTACGCG	TGAGGCTCGA	AAGTATGGGT
751	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ATACCGTAAA	CGATGAATGC
801	TAAGTGTGG	AGGGTTTCCG	CCCTTCAGTG	CTGCAGCTAA	CGCATTAAAGC
851	ATTCCGCTG	GGGAGTACGG	CCGCAAGGCT	GAAACTCAA	GGAATTGACG
901	GGGGCCCGCA	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTCGAA	GCTACGCGAA
951	GAACCTTACC	AGGTCTTGAC	ATACTATGCA	AATCTAAGAG	ATTAGACGTT
1001	CCCTTCGGGG	ACATGGATAC	AGGTGGTGCA	TGGTTGTCGT	CAGCTCGTGT
1051	CGTGAGATGT	TGGGTAAAGT	CCCACAACGA	GCGCAACCCT	TATTATCAGT
1101	TGCCAGCATT	AAGTTGGGCA	CTCTGGTGAG	ACTGCCGGTG	ACAAACCGGA
1151	GGAAGGTGGG	GATGACGTCA	AATCATCATG	CCCCTTATGA	CCTGGGCTAC
1201	ACACGTGCTA	CAATGGATGG	TACAACGAGT	TGCGAACTCG	CGAGAGTAAG
1251	CTAATCTCTT	AAAGCCATTC	TCAGTTCGGA	TTGTAGGCTG	CAACTCGCCT
1301	ACATGAAGTC	GGAATCGCTA	GTAATCGCGG	ATCAGCATGC	CGCGGTGAAT
1351	ACGTTCCCGG	GCCTTG TACA	CACCGCCCGT	CACACCATGA	GAGTTTG TAA
1401	CACCCAAAAGT	CGGTGGGGTA	ACCTTTAGGA	ACCAGCCGCC	TAAGG

(2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KA 02 ความยาว 1,431 นิวคลีโอไทด์

1	AGTCGAACGA	ACCATCCTGT	TGATTGAAGC	TTGCTTCATG	ATTCAGATTT
51	TGGTGAGTGG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	GGGTAACCTG	CCCAAAAGTG
101	GGGGATAACA	TTTGGAAACA	AGTGCTAATA	CCGCATAACA	ACTACTTTCA
151	CATGATCGTA	GCTTGAAAGA	TGGCTCTGCT	ATCGCTTTTG	GATGGACCCG
201	CGGCGTATTA	GCTAGTTGGT	GAGGTAATGG	CTCACCAAGG	CAATGATACG
251	TAGCCGACCT	GAGAGGGTAA	TCGGCCACAT	TGGGACTGAG	ACACGGCCCA
301	AACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTAGGGAATC	TTCCACAATG	GGCGAAAGCC
351	TGATGGAGCA	ATGCCGCGTG	AGTGAAGAAG	GTTTTCGGAT	CGTAAAACTC
401	TGTTGTTGAA	GAAGAACATG	CGTGAGAGTA	ACTGTTACAG	TACTGACGGT
451	ATTCAACCAG	AAAGCCACGG	CTAACTACGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC
501	GTAGGTGGCA	AGCGTTGTCC	GGATTTATTG	GGCGTAAAGA	GAATGTAGGC
551	GGTTTATTAA	GTTTGAAGTG	AAAGCCCTCG	GCTCAACTGA	GGAAGTGCTT
601	CGAAAACCTGG	TAAACTTGAG	TGCAGAAGAG	GAAAGTGGAA	CTCCATGTGT
651	AGCGGTGGAA	TGCGTAGATA	TATGGAAGAA	CACCAGTGGC	GAAGGCGGCT
701	TTCTGGTCTG	TAACTGACGC	TGAGATTCGA	AAGCATGGGT	AGCAAACAGG
751	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ATGCCGTAAA	CGATGAGTGC	TAAGTGTGG
801	AGGGTTTCCG	CCCTTCAGTG	CTGCAGCTAA	CGCATTAAAGC	ACTCCGCCTG
851	GGGAGTACGA	CCGCAAGGTT	GAAACTCAAA	GGAATTGACG	GGGGCCCGCA
901	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTCGAA	GCAACGCGAA	GAACCTTACC
951	AGGTCTTGAC	ATACCATGAA	AAGCTAAGAG	ATTAGTCTTT	CCCTTCGGGG
1001	ACATGGATAC	AGGTGGTGCA	TGGTTGTCGT	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT
1051	TGGGTAAAGT	CCCACAACGA	GCGCAACCTT	TATTATCAGT	TGCCAGCATT
1101	CAGTTGGGCA	CTCTGGTGAG	ACTGCCGGTG	ACAAACCGGA	GGAAGGTGGG
1151	GACGACGTCA	AATCATCATG	CCCCTTATGA	CCTGGGCTAC	ACACGTGCTA
1201	CAATGGTCGG	TACAACGTGT	TGCGAACTCG	CGAGGGCAAG	CAAATCACTT
1251	AAAACCGATC	TCAGTTCGGA	TTGCAGGCTG	CAACTCGCCT	GCATGAAGCT
1301	GGAATCGCTA	GTAATCGCGG	ATCAGCATGC	CGCGGTGAAT	ACGTTCCCGG
1351	GCCTGTACA	CACCGCCCGT	CACACCATGA	GAGTTTGTA	CACCCAAAGT
1401	CGGTGGGGTA	ACCCTTCGGG	AACTAGCCGC	C	

(3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KA 03 ความยาว 1,446 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	GCGAACTTAA	CTAAATGAAT	GCGGTGCTTG	CACCAAGTGA
51	TTTAGAGCG	GTGAGCGGCG	GATGGGTGAG	TAACACGTGG	GTAACCTGCC
101	TCTAAGCAGG	GGATAACATT	TGGAAACAGA	TGCTAATACC	GTATAAATCC
151	TAAAACCACA	TGGTTTTAGG	CTGAAAGGCG	GCTTCGGCTG	TCACTTAGAG
201	ATGGACCCGC	GGCGTATTAG	CTAGTTGGTG	AGGTAATGGC	TCACCAAGGC
251	AATGATACGT	AGCCGAACTG	AGAGGTTGAT	CGGCCACATT	GGGACTGAGA
301	CACGGCCCAA	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	TAGGGAATCT	TCCACAATGG
351	ACGCAAGTCT	GATGGAGCAA	CGCCGCTGA	GTGAAGAAGG	CTTTCGGGTC
401	GTAAAACCTCT	GTTGTTGAAG	AAGAACACGT	TTGAGAGTAA	CTGTTACAGC
451	GTTGACGGTA	TTCAACCAGA	AAGCCACGGC	TAACACGTG	CCAGCAGCCG
501	CGGTAATACG	TAGGTGGCAA	GCGTTATCCG	GATTTATTGG	GCGTAAAGCG
551	AGCGCAGGCG	GTTTTTTAAG	TCTGATGTGA	AAGCCCTCGG	CTTAACCGAG
601	GAAGTGCATC	GGAAACTGGG	AAACTTGAAT	GCTGAAGAGG	ACAGTGGAA
651	TCCATGTGTA	GCGGTGAAAT	GCGTAGATAT	ATGGAAGAAC	ACCAGTGGCG
701	AAGCGGCTG	TCTGGTCAGT	TATTGACGCT	GAGGCTCGAA	AGCATGGGTA

751	GCGAACAGGA	TTAGATACCC	TGGTAGTCCA	TGCCGTAAAC	GATGAATACT
801	AGGTGTTGGA	GGGTTTCCGC	CCTTCAGTGC	CGCAGCTAAC	GCATTAAGTA
851	TTCCGCCTGG	GGAGTACGAC	CGCAAGGTTG	AAACTCAAAG	GAATTGACGG
901	GGGCCCGCAC	AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT	TAATTCGAAG	CAACGCGAAG
951	AACCTTACCA	GGTCTTGACA	TCTTCTGCTA	TTTCTAGAGA	TAGAAAGTTC
1001	CCTTCGGGGA	CGGAATGACA	GGTGGTGCAT	GGTTGTCGTC	AGCTCGTGTC
1051	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCTT	ATGACTAGTT
1101	GCCAGCATTA	AGTTGGGCAC	TCTAGTAAGA	CTGCCGGTGA	CAAACCGGAG
1151	GAAGGTGGGG	ACGACGTCAA	ATCATCATGC	CCCTTATGAC	CTGGGCTACA
1201	CACGTGCTAC	AATGGTTGGT	ACAACGAGTT	GCGAACTCGC	GAGGGTAAGC
1251	TAATCTCTTA	AAGCCAATCT	CAGTTCGGAC	TGTAGGCTGC	AACTCGCCTA
1301	CACGAAGTCG	GAATCGCTAG	TAATCGCGGA	TCAGCATGCC	GCGGTGAATA
1351	CGTTCCCGGG	CCTTGACAC	ACCGCCCGTC	ACACCATGAG	AGTTTGTAAC
1401	ACCCAAAGCC	GGTGGGGCAA	CCCTTCGGGG	AGCTAGCCGT	CTAAGG

(4) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KA 04 ความยาว 1,447 นิวคลีโอไทด์

1	TGCCTATAAT	GCAGTCGACG	AACCATCCTG	AAGATTGAAG	CTTGCTTCAT
51	GATTCAGATC	TTGGTGAGTG	GCGGACGGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACCT
101	GCCCAAAAGT	GGGGGATAAC	ATTTGGAAAC	AAGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACTACTTTC	ACATGATCGT	AGCTTAAAAG	ATGGCTCTGC	TATCACTTTT
201	GGATGGACCC	GCGGCGTATT	AGCTAGTTGG	TGAGGTAATG	GCTCACCAAG
251	GCAATGATAC	GTAGCCGACC	TGAGAGGGTA	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
301	GACACGGCCC	AAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT
351	GGGCGAAAGC	CTGATGGAGC	AATGCCGCGT	GAGTGAAGAA	GGTTTTCCGA
401	TCGTAAAACT	CTGTGTGTGA	AGAAGAACAT	GCGTGAGAGT	AACTGTTAC
451	GTAATGACGG	TATTCAACCA	GAAAGCCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
501	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
551	AGAATGTAGG	CGGTTTATTA	AGTTTGAAGT	GAAAGCCCTC	GGCTCAACCG
601	AGGAAGTGCT	TCGAAAACCTG	GTAAACTTGA	GTGCAGAAGA	GGAAAGTGGA
651	ACTCCATGTG	TAGCGGTGGA	ATCGGTAGAT	ATATGGAAGA	ACACCAGTGG
701	CGAAGGCGGC	TTTCTGGTCT	GTAACGACG	CTGAGATTCG	AAAGCATGGG
751	TAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CATGCCGTAA	ACGATGAGTG
801	CTAAGTGTG	GAGGGTTTCC	GCCCTTCAGT	GCTGCAGCTA	ACGCATTAAG
851	CACTCCGCCT	GGGGAGTACG	ACCCAAGGT	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC
901	GGGGCCCCGC	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	TTTAATTCGA	AGCAACGCGA
951	AGAACCTTAC	CAGGTCTTGA	CATACCATGA	CAAGCTAAGA	GATTAGTCTT
1001	TCCCTTCGGG	GACATGGATA	CAGGTGGTGC	ATGGTTGTCG	TCAGTCTGTG
1051	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TTATTATCAG
1101	TTGCCAGCAT	TCAGTTGGGC	ACTCTGGTGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG
1151	AGGAAGGTGG	GGACGACGTC	AAATCATCAT	GCCCCTTATG	ACCTGGGCTA
1201	CACACGTGCT	ACAATGGTGC	GTACAACGTG	TTGCGAACTC	GCGAGGGCAA
1251	GCAAATCACT	TAAAACCGAT	CTCAGTTCGG	ATTGCAGGCT	GCAACTCGCC
1301	TGCATGAAGC	TGGAATCGCT	AGTAATCGCG	GATCAGCATG	CCGCGGTGAA
1351	TACGTTCCCG	GGCCTTGAC	ACACCGCCCG	TCACACCATG	AGAGTTTGTA
1401	ACACCCAAAG	TCGGTGGGGT	AACCTTCGG	GAAC TAGCCG	CCTAAGG

(5) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KA 05 ความยาว 1,447 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCGG	TTGATGGAAG	TTGAGTGCTT	GCACTTGATT
51	GATTCAACTT	GGTGACGAGT	GGCGAACTGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
101	TGCCCGAAG	CGGGGGATAA	CATTTGGAAG	CAGGTGCTAA	TACCGCATAA
151	CAACCAAAAC	CACCTGGTTT	TGGTTTGAAG	GACGGCTTCG	GCTGTCACTT
201	TGGGATGGAC	CCGCGGCGTA	TTAGCTAGTT	GGTGAGGTAA	CGGCTCACCA
251	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCCA	CATTGGGACT
301	GAGACACGGC	CCAAACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA
351	ATGGACGCAA	GTCTGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAACGTGTTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGGTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG
751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCTGCTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGTACTGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGGTCTT	GACATCTTCT	GCTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCGCAA	CGAGCGCAAC	CCTTATTGTC
1101	AGTTGCCAGC	ATTGAGTTGG	GCACTCTGGC	GAGACTGCCG	GTGACAAACC
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACC	TCAAATCATC	ATGCCCTTA	TGACCTGGGC
1201	TACACACGTG	CTACAATGGA	CGGTACAACG	AGTCGCGAAA	CCGCGAGGTC
1251	AAGCTAATCT	CTGAAAGCCG	TTCTCAGTTC	GGATTGCAGG	CTGCAACTCG
1301	CCTGCATGAA	GTTGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA	TGCCACGGTG
1351	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACGCC	CGTCACACCA	TGAGAGTTTG
1401	TAACACCCAA	AGCCGGTGAG	GTAACCTTCG	GGGCCAGCCG	TCTAAGG

(6) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KA 06 ความยาว 1,434 นิวคลีโอไทด์

1	GCTATAATGC	AGTCGAACGA	ACTCTGGTAT	TGATTGGTGC	TTGCATCATG
51	ATTACATTT	GAGTGAGTGG	CGAACTGGTG	AGTAACACGT	GGGAAACCTG
101	CCCAGAAGCG	GGGGATAACA	CCTGGAACA	GATGCTAATA	CCGCATAACA
151	ACTTGACCG	CATGGTCCGA	GTTTGAAGA	TGGCTTCGGC	TATCACTTTT
201	GGATGGTCCC	GCGGCGTATT	AGCTAGATGG	TGGGGTAACG	GCTCACCATG
251	GCAATGATAC	GTAGCCGACC	TGAGAGGGTA	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
301	GACACGGCCC	AAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT
351	GGACGAAAGT	CTGATGGAGC	AACGCCCGT	GAGTGAAGAA	GGGTTTCGGC
401	TCGTAAACT	CTGTTGTAA	AGAAGAACAT	ATCTGAGAGT	AACTGTTTCT
451	GTATTGACGG	TATTTAACCA	GAAAGCCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
501	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
551	CGAGCGCAGG	CGGTTTTTTA	AGTCTGATGT	GAAAGCCTTC	GGCTCAACCG
601	AAGAAGTGCA	TCGGAAACTG	GGAAACTTGA	GTGCAGAAGA	GGACAGTGGA
651	ACTCCATGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATATGGAAGA	ACACCAGTGG
701	CGAAGGCGGC	TGTCTGGTCT	GTAACCTTCG	CTGAGGCTCG	AAAGTATGGG

751	TAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CATACCGTAA	ACGATGAATG
801	CTAAGTGTG	GAGGGTTTCC	GCCCTTCAGT	GCTGCAGCTA	ACGCATTAAG
851	CATTCGCCT	GGGGAGTACG	GCCGCAAGGC	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC
901	GGGGCCCCG	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	TTTAATTCGA	AGCTACGCGA
951	AGAACCTTAC	CAGGTCTTGA	CATACTATGC	AAATCTAAGA	GATTAGACGT
1001	TCCCTTCGGG	GACATGGATA	CAGGTGGTGC	ATGGTTGTCTG	TCAGCTCGTG
1051	TCGTGAGATG	TTGGGTAAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TTATTATCAG
1101	TTGCCAGCAT	TAAGTTGGGC	ACTCTGGTGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG
1151	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	AAATCATCAT	GCCCCTTATG	ACCTGGGCTA
1201	CACACGTGCT	ACAATGGATG	GTACAACGAG	TTGCGAACTC	GCGAGAGTAA
1251	GCTAATCTCT	TAAAGCCATT	CTCAGTTCGG	ATTGTAGGCT	GCAACTCGCC
1301	TACATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	GATCAGCATG	CCGCGGTGAA
1351	TACGTTCCCG	GGCCTTGAC	ACACCGCCCG	TCACACCATG	AGAGTTTGTA
1401	ACACCCAAAG	TCGGTGGGGT	AACCTTGA	ACCA	

(7) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KA 07 ความยาว 1,449 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCCGG	TTGATGAAGT	TGAGTGCTTG	CACTTGATTG
51	ATTCAACTTG	GTGACGAGTG	GCGAACTGGT	GAGTAACACG	TGGGTAAACCT
101	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGAAAC	AGGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACCAAAACC	ACCTGGTTTT	GGTTTGAAAG	ACGGTCTCGG	CTGTCACTTT
201	GGGATGGACC	CGCGGCGTAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA
251	GGCGATGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301	AGACACGGCC	CAAACCTCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTCCACAA
351	TGGACGCAAG	TCATGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAAGTTGTTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGTTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG
751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTAATTC	GATGTACGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGGTCTT	GACATCTTCT	GCTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCCAGTGA	GATGTTGGGT	TAAGTCCCGC	AACGAGCGCA	ACCCTTATTG
1101	TCAGTTGCCA	GCATTCAGTT	GGGCACTCTG	GCGAGACTGC	CGGTGACAAA
1151	CCGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAATCA	TCATGCCCTT	TATGACCTGG
1201	GCTACACACG	TGCTACAATG	GACGGTACAA	CGAGTCGCGA	AACCGCGAGG
1251	TCAAGCTAAT	CTCTGAAAGC	CGTTCTCAGT	TCGGATTGCA	GGTGCAACT
1301	CGCTGCATG	AAGTTGGAAT	CGTAGTAAT	CGTGGATCAG	CATGCCACGG
1351	TGAATACGTT	CCCGGGCCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGAGAGTT
1401	TGTAACACCC	AAAGCCGGTG	AGGTAACCTT	CGGGGCCAGC	CGTCTAAGG

จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกซึ่งแยกได้จากแบคทีเรียแลคติกที่สามารถก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม จำนวน 16 ไอโซเลต คือ BK 01, BK 02, BK 03, BK 04, BK 05, BK 06, BK 07, BK 08, BK 09, BK 10, BK 11, BK 12, BK 13, BK 14, BK 15 และ BK 16 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LAC16F และ LAC16R และนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 16 ไอโซเลต ความยาว 1,447, 1,446, 1,446, 1,446, 1,448, 1,448, 1,447, 1,447, 1,432, 1,448, 1,450, 1,447, 1,447, 1,446, 1,447 และ 1,445 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ดังแสดงรายละเอียดต่อไปนี้

(1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 01 ความยาว 1,447 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCCGG	TTGATGAAGT	TGAGTGCTTG	CAC TTGGTTG
51	ATTTAACTTG	GTGACGAGTG	GCGAACTGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACTT
101	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGGAAAC	AGGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACCAAAACC	ACCTGGTTTT	GGTTTGAAAG	ACGGCTTCGG	CTGTCACTTT
201	GGGATGGACC	CGCGGCGTAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA
251	GGCGATGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301	AGACACGGCC	CAAACCTCCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA
351	TGGACGCAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGATGA	AGGGTTTCGG
401	CTCGTAA AAC	TCTGTTGTTG	GAGAAGAACG	GGTGT CAGAG	TA ACTGTTGA
451	CATCGTGACG	GTATCCAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG
501	CCGCGGTAAT	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGGATTAT	TGGGCGTAAA
551	GCGAGCGCAG	GCGGTTTTTT	AGGTCTGATG	TGAAAGCCTT	CGGCTTAACC
601	GGAGAAGTGC	ATCGGAAACC	GGGAGACTTG	AGTGCAGAAG	AGGACAGTGG
651	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG	AACACCAGTG
701	GCGAAGGCGG	CTGTCTGGTC	TGCAACTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG
751	GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGAGT
801	GCTAAGTGTT	GGAGGGTTTC	CGCCCTCAG	TGCTGCAGCT	AACGCATTAA
851	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA
901	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG	ATGCTACGCG
951	AAGAACCCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCTCTG	CTAACCTAAG	AGATTAGGCG
1001	TTCCCTTCGG	GGACGGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT
1051	GTCGTGAGAT	GTTGGGT TAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTATTGTCA
1101	GTTGCCAGCA	TTCAGTTGGG	CACTCTGGCG	AGACTGCCGG	TGACAAAACCG
1151	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCTTAT	GACCTGGGCT
1201	ACACACGTGC	TACAATGGAC	GGTACAACGA	GTCGCGAAAC	CGCGAGGTCA
1251	AGCTAATCTC	TGAAAGCCGT	TCTCAGTTCG	GATTGCAGGC	TGCAACTCGC
1301	CTGCATGAAG	TTGGAATCGC	TAGTAATCGT	GGATCAGCAT	GCCACGGTGA
1351	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACACCAT	GAGAGTTTGT
1401	AACACCCAAA	GCCGGTGAGG	TAACCTTCGG	GTGCCAGCGT	TCTAGGG

(2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 02 ความยาว 1,446 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCCGG	TTGATGAAGT	TGAGTGCTTG	CACTTGACTG
51	ATTCAACTTG	GTGACGAGTG	GCGAACTGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACCT
101	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGGAAAC	AGGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACCAAAACC	TCCTGGTTTT	GGTTTAAAAG	ACGGCTTCGG	CTGTCACTTT
201	GGGATGGACC	CGCGGCGTAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA
251	GGCGATGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301	AGACACGGCC	CAAACCTCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA
351	TGGACGCAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGATGA	AGGGTTTCGG
401	CTCGTAAAAC	TCTGTTGTTG	GAGAAGAACG	GGTGCAGAG	TAAGTGTGA
451	CATCGTGACG	GTATCCAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG
501	CCGCGTAAT	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGATTTAT	TGGGCGTAAA
551	GCGAGCGCAG	GCGGTTTTTT	AGGTCTGATG	TGAAAGCCTT	CGGCTTAACC
601	GGAGAAGTGC	ATCGGAAACC	GGGAGACTTG	AGTGCAGAAG	AGGACAGTGG
651	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG	AACACCAGTG
701	GCGAAGGCGG	CTGTCTGGTC	TGCAACTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG
751	GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGAGT
801	GCTAAGTGTT	GGAGGGTTTC	CGCCCTTCAG	TGCTGCAGCT	AACGCATTA
851	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA
901	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG	ATGCTACGCG
951	AAGAACCTTA	CCAGTCTTGG	ACATCTTCTG	CTAACCTAAG	AGATTAGGCG
1001	TTCCCTTCGG	GGACGGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT
1051	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTATTGTCA
1101	GTTGCCAGCA	TTTAGTTGGG	CACTCTGGCG	AGACTGCCCG	TGACAAACCG
1151	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCTTAT	GACCTGGGCT
1201	ACACACGTGC	TACAATGGAC	GGTACAACGA	GTCGCGAAAC	CGCGAGGTCA
1251	AGCTAATCTC	TGAAAGCCGT	TCTCAGTTCG	GATTGCAGGC	TGCAACTCGC
1301	CTGCATGAAG	TTGGAATCGC	TAGTAATCGT	GGATCAGCAT	GCCACGGTGA
1351	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACGCCCC	GTCACCCAT	GAGAGTTTGT
1401	AACACCCAAA	GCCGGTGAGG	TAACCTTCGG	AATCAGCCGT	CTAAGG

(3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 03 ความยาว 1,446 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCCGG	TTGATGAAGT	TGAGTGCTTG	CACTTGACTG
51	ATTCAACTTG	GTGACGAGTG	GCGAACTGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACCT
101	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGGAAAC	AGGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACCAAAACC	TCCTGGTTTT	GGTTTAAAAG	ACGGCTTCGG	CTGTCACTTT
201	GGGATGGACC	CGCGGCGTAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA
251	GGCGATGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301	AGACACGGCC	CAAACCTCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA
351	TGGACGCAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGATGA	AGGGTTTCGG
401	CTCGTAAAAC	TCTGTTGTTG	GAGAAGAACG	GGTGCAGAG	TAAGTGTGA
451	CATCGTGACG	GTATCCAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG
501	CCGCGTAAT	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGATTTAT	TGGGCGTAAA
551	GCGAGCGCAG	GCGGTTTTTT	AGGTCTGATG	TGAAAGCCTT	CGGCTTAACC
601	GGAGAAGTGC	ATCGGAAACC	GGGAGACTTG	AGTGCAGAAG	AGGACAGTGG
651	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG	AACACCAGTG
701	GCGAAGGCGG	CTGTCTGGTC	TGCAACTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG

751	GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGAGT
801	GCTAAGTGTT	GGAGGGTTTC	CGCCCTTCAG	TGCTGCAGCT	AACGCATTAA
851	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA
901	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG	ATGCTACGCG
951	AAGAACCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCTTCTG	CTAACCTAAG	AGATTAGGCG
1001	TTCCCTTCGG	GGACGGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT
1051	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTATTGTCA
1101	GTTGCCAGCA	TTTAGTTGGG	CACTCTGGCG	AGACTGCCGG	TGACAAACCG
1151	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCTTAT	GACCTGGGCT
1201	ACACACGTGC	TACAATGGAC	GGTACAACGA	GTCGCGAAAC	CGCGAGGTCA
1251	AGCTAATCTC	TGAAAGCCGT	TCTCAGTTCG	GATTGCAGGC	TGCAACTCGC
1301	CTGCATGAAG	TTGGAATCGC	TAGTAATCGT	GGATCAGCAT	GCCACGGTGA
1351	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACGCCCC	GTCACACCAT	GAGAGTTTGT
1401	AACACCCAAA	GCCGGTGAGG	TAACCTTCGG	AATCAGCCGT	TTAAGG

(4) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 04 ความยาว 1,446 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCCGG	TTGATGAAGT	TGAGTGCTTG	CACCTGATTG
51	ATTCAACTTG	GTGACGAGTG	GCGAACTGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACTT
101	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGAAAC	AGGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACCAAAACC	TCCTGGTTTT	GGTTTAAAG	ACGGCTTCGG	CTGCACTTT
201	GGGATGGACC	CGCGGCGTAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA
251	GGCGATGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301	AGACACGGCC	CAAACCTCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA
351	TGGACGCAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCC	TGAGTGATGA	AGGGTTTCGG
401	CTCGTAAAC	TCTGTTGTTG	GAGAAGAACG	GGTGCAGAG	TAAGTGTGA
451	CATCGTGACG	GTATCCAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG
501	CCGCGGTAAT	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGGATTAT	TGGGCGTAAA
551	GCGAGCGCAG	GCGGTTTTTT	AGGTCTGATG	TGAAAGCCTT	CGGCTTAAAC
601	GGAGAAGTGC	ATCGGAAACC	GGGAGACTTG	AGTGCAGAAG	AGGACAGTGG
651	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG	AACACCAGTG
701	GCGAAGGCCG	CTGTCTGGTC	TGCAACTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG
751	GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGAGT
801	GCTAAGTGTT	GGAGGGTTTC	CGCCCTTCAG	TGCTGCAGCT	AACGCATTAA
851	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA
901	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG	ATGCTACGCG
951	AAGAACCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCTTCTG	CTAACCTAAG	AGATTAGGCG
1001	TTCCCTTCGG	GGACGGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT
1051	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTATTGTCA
1101	GTTGCCAGCA	TTCAGTTGGG	CACTCTGGCG	AGACTGCCGG	TGACAAACCG
1151	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCTTAT	GACCTGGGCT
1201	ACACACGTGC	TACAATGGAC	GGTACAACGA	GTCGCGAAAC	CGCGAGGTCA
1251	AGCTAATCTC	TGAAAGCCGT	TCTCAGTTCG	GATTGCAGGC	TGCAACTCGC
1301	CTGCATGAAG	TTGGAATCGC	TAGTAATCGT	GGATCAGCAT	GCCACGGTGA
1351	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACGCCCC	GTCACACCAT	GAGAGTTTGT
1401	AACACCCAAA	GCCGGTGAGG	TAACCTTCGG	AACCAGCCGT	CTAAGG

(5) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 05 ความยาว 1,448 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	ACGCGTCCCA	GGTTGATGAA	GTTGAGTGCT	TGCACTTGAT
51	TGATTTAACT	TGGTGACGAG	TGGCGAACTG	GTGAGTAACA	CGTGGGTAAC
101	CTGCCCCGAA	GCGGGGATA	ACATTTGGAA	ACAGGTGCTA	ATACCGCATA
151	ACAACCAAAA	CCACCTGGTT	TTGGTTTGAA	AGACGGCTTC	GGCTGTCACT
201	TTGGGATGGA	CCC GCGCGT	ATTAGCTAGT	TGGTGAGGTA	ACGGCTCACC
251	AAGGCGATGA	TACGTAGCCG	ACCTGAGAGG	GTAATCGGCC	ACATTGGGAC
301	TGAGACACGG	CCCAAACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATCTTCCAC
351	AATGGACGCA	AGTCTGATGG	AGCAACGCCG	CGTGAGTGAT	GAAGGGTTTC
401	GGCTCGTAAA	ACTCTGTTGT	TGGAGAAGAA	CGGGTGTCAG	AGTAACTGTT
451	GACATCGTGA	CGGTATCCAA	CCAGAAAGCC	ACGGCTAACT	ACGTGCCAGC
501	AGCCGCGGTA	ATACGTAGGT	GGCAAGCGTT	GTCCGGATTT	ATTGGGCGTA
551	AAGCGAGCGC	AGGCGGTTTT	TTAGGTCTGA	TGTGAAAGCC	TTCGGCTTAA
601	CCGGAGAAGT	GCATCGGAAA	CCGGGAGACT	TGAGTGCAGA	AGAGGACAGT
651	GGAACTCCAT	GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA	GATATATGGA	AGAACCACAG
701	TGGCGAAGGC	GGCTGTCTGG	TCTGCAACTG	ACGCTGAGGC	TCGAAAGCAT
751	GGGTAGCGAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCATGCCG	TAAACGATGA
801	GTGCTAAGTG	TTGGAGGGTT	TCCGCCCTTC	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
851	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGACCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT
901	GACGGGGGCC	CGCACAAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGATGCTACG
951	CGAAGAACCT	TACCAGGTCT	TGACATCTTC	TGCTAACCTA	AGAGATTAGG
1001	CGTTCCTTC	GGGGACGGAA	TGACAGGTGG	TGCATGGTTG	TCGTCAGCTC
1051	GTGTCGTGAG	ATGTTGGGTT	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCCTTATTGT
1101	CAGTTGCCAG	CATTCAGTTG	GGCACTCTGG	CGAGACTGCC	GGTGACAAAC
1151	CGGAGGAAGG	TGGGGATGAC	GTCAAATCAT	CATGCCCTTC	ATGACCTGGG
1201	CTACACACGT	GCTACAATGG	ACGGTACAAC	GAGTCGCGAA	ACCGCGAGGT
1251	CAAGCTAATC	TCTGAAAGCC	GTTCTCAGTT	CGGATTGCAG	GCTGCAACTC
1301	GCCTGCATGA	AGTTGGAATC	GCTAGTAATC	GTGGATCAGC	ATGCCACGGT
1351	GAATACGTTT	CCGGGCCCTG	TACACACCGC	CCGTCACACC	ATGAGAGTTT
1401	GTAACACCCA	AAGCCGGTGA	GGTAACTTTC	GGGGCCAGCC	GTTTAAAGG

(6) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 06 ความยาว 1,448 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	ACGCGTCCCG	GTTGATGAAG	TTGAGTGCTT	GCACTTGATT
51	GATTCAACTT	GGTGACGAGT	GGCGAACTGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
101	TGCCCGAAG	CGGGGATAA	CATTTGAAA	CAGGTGCTAA	TACCGCATAA
151	CAACCAAAAC	CTCCTGGTTT	TGGTTTGAAA	GATGGTTTCG	GCTGTCACTT
201	TGGGATGGAC	CCGCGGCGTA	TTAGCTAGTT	GGTGAGGTAA	CGGCTCACCA
251	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCCA	CATTGGGACT
301	GAGACACGGC	CCAAACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA
351	ATGGACGCAA	GTCTGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAAGTTGTTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGGTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG

751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCTACGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGGTCTT	GACATCTTCT	GTTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC	CCTTATTGTC
1101	AGTTGCCAGC	ATTTAGTTGG	GCACTCTGGC	GAGACTGCCG	GTGACAAACC
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAATCATC	ATGCCCTTA	TGACCTGGGC
1201	TACACACGTG	CTACAATGGA	CGGTACAACG	AGTCGCGAAA	CCGCGAGGTC
1251	AAGCTAATCT	CTGAAAGCCG	TTCTCAGTTC	GGATTGCAGG	CTGCAACTCG
1301	CCTGCATGAA	GTTGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA	TGCCACGGTG
1351	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	TGAGAGTTTG
1401	TAACACCCAA	AGCCGGTGAG	GTAACCTTCG	GGAACCAGCC	GTCTAAGG

(7) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 07 ความยาว 1,447 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	ACGCGTCCCG	GTTGATGAGG	TTGAGTGCTT	GCACTTGATT
51	GATTCAACTT	GGTGACGAGT	GGCGAACTGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
101	TGCCCCGAAG	CGGGGGATAA	CATTTGAAA	CAGGTGCTAA	TACCCATAA
151	CAACCAAAAC	CTCCTGGTTT	TGGTTAAAA	GACGGCTTCG	GCTGCACTT
201	TGGGATGGAC	CCGCGGCGTA	TTAGCTAGTT	GGTGAGGTAA	CGGCTCACCA
251	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCCA	CATTGGGACT
301	GAGACACGGC	CCAAACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA
351	ATGGACGCAA	GTCTGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAAGTTTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGGTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG
751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCTACGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGGTCTT	GACATCTTCT	GCTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC	CCTTATTGTC
1101	AGTTGCCAGC	ATTTAGTTGG	GCACTCTGGC	GAGACTGCCG	GTGACAAACC
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAATCATC	ATGCCCTTA	TGACCTGGGC
1201	TACACACGTG	CTACAATGGA	CGGTACAACG	AGTCGCGAAA	CCGCGAGGTC
1251	AAGCTAATCT	CTGAAAGCCG	TTCTCAGTTC	GGATTGCAGG	CTGCAACTCG
1301	CCTGCATGAA	GTTGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA	TGCCACGGTG
1351	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	TGAGAGTTTG
1401	TAACACCCAA	AGCCGGTGAG	GTAACCTTCG	GAACCAGCCG	TCTAAGG

(8) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 08 ความยาว 1,447 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	ACGCGTCCCG	GTTGATGAAG	TTGAGTGCTT	GCACTTGATT
51	GATTCAACTT	GGTGACGAGT	GGCGAACTGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
101	TGCCCCAAG	CGGGGATAA	CATTTGAAA	CAGGTGCTAA	TACCCATAA
151	CAACCAAAAC	CTCCTGGTTT	TGGTTAAAA	GACGGCTTCG	GCTGCACTT
201	TGGGATGGAC	CCGCGGCGTA	TTAGCTAGTT	GGTGAGGTAA	CGGCTCACCA
251	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCCA	CATTGGGACT
301	GAGACACGGC	CCAAACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA
351	ATGGACGCAA	GTCTGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAACGTGTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGTAACATA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGGTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG
751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTAATTC	GATGCTACGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGGTCTT	GACATCTTCT	GCTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTAA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC	CCTTATTGTC
1101	AGTTGCCAGC	ATTCAGTTGG	GCACTCTGGC	GAGACTGCCG	GTGACAAACC
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAATCATC	ATGCCCTTA	TGACCTGGGC
1201	TACACACGTG	CTACAATGGA	CGGTACAACG	AGTCGCGAAA	CCGCGAGGTC
1251	AAGCTAATCT	CTGAAAGCCG	TTCTCAGTTC	GGATTGCAGG	CTGCAACTCG
1301	CCTGCATGAA	GTTGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA	TGCCACGGTG
1351	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACGCC	CGTCACACCA	TGAGAGTTTG
1401	TAACACCCAA	AGCCGGTGAG	GTAACCTTCG	GAACCAGCCG	TTTAAGG

(9) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 09 ความยาว 1,432 นิวคลีโอไทด์

1	CTATAATGCA	GTCGACGCGT	CTTGGTTAAT	GATGTTAGGT	GCTTGCAATT
51	AACTGATTTA	ACATTGAGAC	GAGTGGCGAA	CTGGTGAGTA	ACACGTGGGT
101	AACCTGCCCT	GAAGTGGGGG	ATAACACTTG	GAAACAGGTG	CTAATACCGC
151	ATAACAACGA	AAACCACATG	GTTTTCGTTT	GAAAGATGGC	TTCGGCTGTC
201	ACTTTTGGAT	GGACCCGCGG	CGTATTAGCT	TGTTGGTGAG	GTAACGGCTC
251	ACCAAGGCCA	TGATACGTAG	CCGACCTGAG	AGGGTAATCG	GCCACATTGG
301	GA CTGAGACA	CGGCCAAAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTA	GGGAATCTTC
351	CACAATGGAC	GAAAGTCTGA	TGGAGCAACG	CCGCGTGAGT	GATGAAGGGT
401	TTCGGCTCGT	AAAACCTCTGT	TGTTGGAGAA	GAACAGGTGA	TAGAGTAACT
451	GTTATCATCT	TGACGGTATC	CAACCAGAAA	GCCACGGCTA	ACTACGTGCC
501	AGCAGCCGCG	GTAATACGTA	GGTGGCAAGC	GTTGTCCGGA	TTTATTGGGC
551	GTAAAGCGAG	CGCAGGCGGT	TTTTTAGTTC	TGATGTGAAA	GCCTTCGGCT
601	TAACCGGAGA	AGGGCATCGG	AAACCGGGAG	ACTTGAGTGC	AGAAGAGGAC
651	AGTGGAATC	CATGTGTAGC	GGTGAAATGC	GTAGATATAT	GGAAGAACAC
701	CAGTGGCGAA	GGCGGCTGTC	TGGTCTGTAA	CTGACGCTGA	GGCTCGAAAG

751	CATGGGTAGC	GAACAGGATT	AGATACCCTG	GTAGTCCATG	CCGTAAACGA
801	TGAGTGCTAA	GTGTTGGAGG	GTTTCCGCC	TTCAGTGCTG	CAGCTAACGC
851	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	AGTACGACCG	CAAGGTTGAA	ACTCAAAGGA
901	ATTGACGGGG	GCCCGCACAA	GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA	ATTGATGCT
951	ACGCGAAGAA	CCTTACCAGG	TCTTGACATC	TTCTGCTAAC	CTAAGAGATT
1001	AGGCGTTCCC	TTCGGGGACG	GAATGACAGG	TGGTGCATGG	TTGTCGTGAG
1051	CTCGTGTCTG	GAGATGTTGG	GTTAAGTCCC	GCAACGAGCG	CAACCCTTAT
1101	TGTCAGTTGC	CAGCATTTAG	TTGGGCACTC	TGGCGAGACT	GCCGGTGACA
1151	AACCGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAAT	CATCATGCC	CTTATGACCT
1201	GGGTACACA	CGTGCTACAA	TGGACGGTAC	AACGAGTCGC	GAAACCGCGA
1251	GGTCAAGCTA	ATCTCTTAAA	GCCGTTCTCA	GTTGCGATTG	CAGGTGCAA
1301	CTCGCCTGCA	TGAAGTTGGA	ATCGCTAGTA	ATCGTGGATC	AGCATGCCAC
1351	GGTGAATACG	TTCCCGGGCC	TTGTACACAC	CGCCCGTCAC	ACCATGAGAG
1401	TTTGTAAACAC	CCAAAGCCGG	TGAGGTAACC	TT	

(10) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 10 ความยาว 1,448 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCAG	GTTGATGAAG	TTGAGTGCTT	GCACTTGATT
51	GATTAACTT	GGTGACGAGT	GGCGAACTGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
101	TGCCCGAAG	CGGGGATAA	CATTTGAAA	CAGGTGCTAA	TACCCATAA
151	CAACCAAAAC	CACCTGGTTT	TGGTTTAAA	GACGGCTTCG	GCTGCACTT
201	TGGGATGGAC	CCGCGCGTA	TTAGCTAGTT	GGTGAGGTAA	CGGCTCACCA
251	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCA	CATTGGGACT
301	GAGACACGGC	CCAAACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA
351	ATGGACGCAA	GTCTGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAATGTTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGGTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG
751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCTACGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGGTCTT	GACATCTTCT	GCTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC	CCTTATTGTC
1101	AGTTGCCAGC	ATTCAGTTGG	GCACTCTGGC	GAGACTGCCG	GTGACAAACC
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAATCATC	ATGCCCTTA	TGACCTGGGC
1201	TACACACGTG	CTACAATGGA	CGGTACAACG	AGTCGCGAAA	CCGCGAGGTC
1251	AAGCTAATCT	CTGAAAGCCG	TTCTCAGTTC	GGATTGCAGG	CTGCAACTCG
1301	CCTGCATGAA	GTTGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA	TGCCACGGTG
1351	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	TGAGAGTTTG
1401	TAACACCCA	AGCCGGTGAG	GTAACCTTCG	GGGGCCAGCC	GTTTAAGG

(11) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 11 ความยาว 1,450 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAAGTCG	ACGCGTCCCG	GTTGATGAAG	TTGAGTGCTT	GCACTTGACT
51	GATTCAACTT	GGTGACGAGT	GGCGAACTGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
101	TGCCCCGAAG	CGGGGGATAA	CATTTGGA AAA	CAGGTGCTAA	TACCGCATAA
151	CAACCAAAAC	CTCCTGGTTT	TGGTTTAAAA	GACGGCTTCG	GCTGTCACCT
201	TGGGATGGAC	CCGCGGCGTA	TTAGCTAGTT	GGTGAGGTAA	CGGCTCACCA
251	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCCA	CATTGGGACT
301	GAGACACGGC	CCAAACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA
351	ATGGACGCAA	GTCTGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAAGTGTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGGTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG
751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTAATTC	GATGCTACGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGTCTT	GACATCTTCT	GCTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCAGCA	CGAGCGCAAC	CCTTATTGTC
1101	AGTTGCCAGC	ATTTAGTTGG	GCACTCTGGC	GAGACTGCCG	GTGACAAACC
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAATCATC	ATGCCCTTA	TGACCTGGGC
1201	TACACACGTG	CTACAATGGA	CGGTACAACG	AGTCGCGAAA	CCGCGAGGTC
1251	AAGCTAATCT	CTGAAAGCCG	TTCTCAGTTC	GGATTGCAGG	CTGCAACTCG
1301	CCTGCATGAA	GTTGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA	TGCCACGGTG
1351	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	TGAGAGTTTG
1401	TAACACCCAA	AGCCGGTGAG	GTAACCTTCG	GAATCAGCCG	TTTAAGGGGG

(12) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 12 ความยาว 1,447 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	ACGCGTCCCG	GTTGATGAAG	TTGAGTGCTT	GCACTTGACT
51	GATTCAACTT	GGTGACGAGT	GGCGAACTGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
101	TGCCCCGAAG	CGGGGGATAA	CATTTGGA AAA	CAGGTGCTAA	TACCGCATAA
151	CAACCAAAAC	CTCCTGGTTT	TGGTTTAAAA	GACGGCTTCG	GCTGTCACCT
201	TGGGATGGAC	CCGCGGCGTA	TTAGCTAGTT	GGTGAGGTAA	CGGCTCACCA
251	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCCA	CATTGGGACT
301	GAGACACGGC	CCAAACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA
351	ATGGACGCAA	GTCTGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAAGTGTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGGTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG

751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCTACGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGGTCTT	GACATCTTCT	GCTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC	CCTTATTGTC
1101	AGTTGCCAGC	ATTTAGTTGG	GCACTCTGGC	GAGACTGCCG	GTGACAAACC
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAATCATC	ATGCCCTTA	TGACCTGGGC
1201	TACACACGTG	CTACAATGGA	CGGTACAACG	AGTCGCGAAA	CCGCGAGGTC
1251	AAGCTAATCT	CTGAAAGCCG	TTCTCAGTTC	GGATTGCAGG	CTGCAACTCG
1301	CCTGCATGAA	GTTGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA	TGCCACGGTG
1351	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	TGAGAGTTTG
1401	TAACACCCAA	AGCCGGTGAG	GTAACCTTCG	GAATCAGCCG	TCTAAGG

(13) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 13 ความยาว 1,447 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	ACGCGTCCCG	GTTGATGAAG	TTGAGTGCTT	GCACTTGACT
51	GATTCAACTT	GGTGACGAGT	GGCGAACTGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
101	TGCCCGAAG	CGGGGGATAA	CATTTGGAAA	CAGGTGCTAA	TACCCATAA
151	CAACCAAAAC	CTCCTGGTTT	TGGTTTAAAA	GACGGCTTCG	GCTGTCACTT
201	TGGGATGGAC	CCGCGGCGTA	TTAGCTAGTT	GGTGAGGTAA	CGGCTCACCA
251	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TAATCGGCCA	CATTGGGACT
301	GAGACACGGC	CCAAACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCACA
351	ATGGACGCAA	GTCTGATGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGGTTTCG
401	GCTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	GGAGAAGAAC	GGGTGTCAGA	GTAAGTTTG
451	ACATCGTGAC	GGTATCCAAC	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG	TCCGGATTTA	TTGGGCGTAA
551	AGCGAGCGCA	GGCGTTTTTT	TAGGTCTGAT	GTGAAAGCCT	TCGGCTTAAC
601	CGGAGAAGTG	CATCGGAAAC	CGGGAGACTT	GAGTGCAGAAG	AGGACAGTG
651	GAATCCATG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATATGGAA	GAACACCAGT
701	GGCGAAGGCG	GCTGTCTGGT	CTGCAACTGA	CGCTGAGGCT	CGAAAGCATG
751	GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCATGCCGT	AAACGATGAG
801	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA	GTGCTGCAGC	TAACGCATTA
851	AGCACTCCGC	CTGGGGAGTA	CGACCGCAAG	GTTGAAACTC	AAAGGAATTG
901	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCTACGC
951	GAAGAACCTT	ACCAGGTCTT	GACATCTTCT	GCTAACCTAA	GAGATTAGGC
1001	GTTCCCTTCG	GGGACGGAAT	GACAGGTGGT	GCATGGTTGT	CGTCAGCTCG
1051	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCGCAA	CGAGCGCAAC	CCTTATTGTC
1101	AGTTGCCAGC	ATTTAGTTGG	GCACTCTGGC	GAGACTGCCG	GTGACAAACC
1151	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAATCATC	ATGCCCTTA	TGACCTGGGC
1201	TACACACGTG	CTACAATGGA	CGGTACAACG	AGTCGCGAAA	CCGCGAGGTC
1251	AAGCTAATCT	CTGAAAGCCG	TTCTCAGTTC	GGATTGCAGGC	TGCAACTCG
1301	CCTGCATGAA	GTTGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA	TGCCACGGTG
1351	AATACGTTCC	CGGGCCTTGT	ACACACCGCC	CGTCACACCA	TGAGAGTTTG
1401	TAACACCCAA	AGCCGGTGAG	GTAACCTTCG	GAATCAGCCG	TCTAAGG

(14) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 14 ความยาว 1,446 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCCGG	TTGATGAAGT	TGAGTGCTTG	CACTTGACTG
51	ATTCAACTTG	GTGACGAGTG	GCGAACTGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACCT
101	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGAAAC	AGGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACCAAAACC	TCCTGGTTTT	GGTTTAAAG	ACGGCTTCGG	CTGTCACTTT
201	GGGATGGACC	CGCGGCGTAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA
251	GGCGATGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301	AGACACGGCC	CAAACCTCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA
351	TGGACGCAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGATGA	AGGGTTTCGG
401	CTCGTAAAAC	TCTGTTGTTG	GAGAAGAACG	GGTGCAGAG	TAAGTGTGA
451	CATCGTGACG	GTATCCAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG
501	CCGCGTAAT	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGATTTAT	TGGGCGTAAA
551	GCGAGCGCAG	GCGGTTTTTT	AGGTCTGATG	TGAAAGCCTT	CGGCTTAACC
601	GGAGAAGTGC	ATCGGAAACC	GGGAGACTTG	AGTGCAGAAG	AGGACAGTGG
651	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG	AACACCAGTG
701	GCGAAGGCGG	CTGTCTGGTC	TGCAACTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG
751	GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGAGT
801	GCTAAGTGTT	GGAGGGTTTC	CGCCCTTCAG	TGCTGCAGCT	AACGCATTAA
851	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA
901	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG	ATGCTACGCG
951	AAGAACCTTA	CCAGTCTTTG	ACATCTTCTG	CTAACCTAAG	AGATTAGGCG
1001	TTCCCTTCGG	GGACGGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT
1051	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTATTGTCA
1101	GTTGCCAGCA	TTTAGTTGGG	CACTCTGGCG	AGACTGCCGG	TGACAAACCG
1151	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCTTAT	GACCTGGGCT
1201	ACACACGTGC	TACAATGGAC	GGTACAACGA	GTCGCGAAAC	CGCGAGGTCA
1251	AGCTAATCTC	TGAAAGCCGT	TCTCAGTTCG	GATTGCAGGC	TGCAACTCGC
1301	CTGCATGAAG	TTGGAATCGC	TAGTAATCGT	GGATCAGCAT	GCCACGGTGA
1351	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACGCCCC	GTCACCCAT	GAGAGTTTGT
1401	AACACCCAAA	GCCGGTGAGG	TAACCTTCGG	AATCAGCCGT	TTAAGG

(15) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 15 ความยาว 1,447 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCCGG	TTGATGAAGT	TGAGTGCTTG	CACTTGACTG
51	ATTCAACTTG	GTGACGAGTG	GCGAACTGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACCT
101	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGAAAC	AGGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACCAAAACC	TCCTGGTTTT	GGTTTAAAG	ACGGCTTCGG	CTGTCACTTT
201	GGGATGGACC	CGCGGCGTAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA
251	GGCGATGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301	AGACACGGCC	CAAACCTCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA
351	TGGACGCAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGATGA	AGGGTTTCGG
401	CTCGTAAAAC	TCTGTTGTTG	GAGAAGAACG	GGTGCAGAG	TAAGTGTGA
451	CATCGTGACG	GTATCCAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG
501	CCGCGTAAT	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGATTTAT	TGGGCGTAAA
551	GCGAGCGCAG	GCGGTTTTTT	AGGTCTGATG	TGAAAGCCTT	CGGCTTAACC
601	GGAGAAGTGC	ATCGGAAACC	GGGAGACTTG	AGTGCAGAAG	AGGACAGTGG
651	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG	AACACCAGTG
701	GCGAAGGCGG	CTGTCTGGTC	TGCAACTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG

751	GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGAGT
801	GCTAAGTGTT	GGAGGGTTTC	CGCCCTTCAG	TGCTGCAGCT	AACGCATTAA
851	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA
901	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG	ATGCTACGCG
951	AAGAACCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCTTCTG	CTAACCTAAG	AGATTAGGCG
1001	TTCCCTTCGG	GGACGGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT
1051	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTATTGTCA
1101	GTTGCCAGCA	TTTAGTTGGG	CACTCTGGCG	AGACTGCCGG	TGACAAACCG
1151	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCTTAT	GACCTGGGCT
1201	ACACACGTGC	TACAATGGAC	GGTACAACGA	GTCGCGAAAC	CGCGAGGTCA
1251	AGCTAATCTC	TGAAAGCCGT	TCTCAGTTCG	GATTGCAGGC	TGCAACTCGC
1301	CTGCATGAAG	TTGGAATCGC	TAGTAATCGT	GGATCAGCAT	GCCACGGTGA
1351	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACGCCCC	GTCACCCAT	GAGAGTTTGT
1401	AACACCCAAA	GCCGGTGAGG	TAACCTTCGG	AATCAGCCGT	CCTAAGG

(16) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต BK 16 ความยาว 1,445 นิวคลีโอไทด์

1	ATGCAGTCGA	CGCGTCCCGG	TTGATGAAGT	TGAGTGCTTG	CACTTGATTG
51	ATTCAACTTG	GTGACGAGTG	GCGAACTGGT	GAGTAACACG	TGGGTAACCT
101	GCCCCGAAGC	GGGGGATAAC	ATTTGGAAAC	AGGTGCTAAT	ACCGCATAAC
151	AACCAAAACC	ACCTGGTTTT	GGTTTGAAAG	ACGGCTTCGG	CTGTCACTTT
201	GGGATGGACC	CGCGGCGTAT	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAC	GGCTCACCAA
251	GGCGATGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG
301	AGACACGGCC	CAAACCTCCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA	TCTTCCACAA
351	TGGACGCAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGATGA	AGGGTTTCGG
401	CTCGTAA AAC	TCTGTTGTTG	GAGAAGAACG	GGTGCAGAG	TAAGTGTGA
451	CATCGTGACG	GTATCCAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG
501	CCGCGGTAAT	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	CCGGATTTAT	TGGGCGTAAA
551	GCGAGCGCAG	GCGGTTTTTT	AGGTCTGATG	TGAAAGCCTT	CGGCTTAACC
601	GGAGAAGTGC	ATCGGAAACC	GGGAGACTTG	AGTGCAGAAG	AGGACAGTGG
651	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG	AACACCAGTG
701	GCGAAGGCGG	CTGTCTGGTC	TGCAACTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG
751	GTAGCGAACA	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGAGT
801	GCTAAGTGTT	GGAGGGTTTC	CGCCCTTCAG	TGCTGCAGCT	AACGCATTAA
851	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAGG	TTGAAACTCA	AAGGAATTGA
901	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG	ATGCTACGCG
951	AAGAACCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCTTCTG	CTAACCTAAG	AGATTAGGCG
1001	TTCCCTTCGG	GGACGGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT
1051	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTATTGTCA
1101	GTTGCCAGCA	TTCAGTTGGG	CACTCTGGCG	AGACTGCCGG	TGACAAACCG
1151	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCTTAT	GACCTGGGCT
1201	ACACACGTGC	TACAATGGAC	GGTACAACGA	GTCGCGAAAC	CGCGAGGTCA
1251	AGCTAATCTC	TGAAAGCCGT	TCTCAGTTCG	GATTGCAGGC	TGCAACTCGC
1301	CTGCATGAAG	TTGGAATCGC	TAGTAATCGT	GGATCAGCAT	CCACGGTGA
1351	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACGCCCC	GTCACCCAT	GAGAGTTTGT
1401	AACACCCAAA	GCCGGTGAGG	TAACCTTCGG	GCCAGCCGTC	TAAGG

ภาคผนวก จ
ผลงานเผยแพร่วิชาการวิจัย

Identification of Lactic Acid Bacteria Contaminated in a Molasses - Based Ethanol Plant in Thailand

Nuntaporn Reanjaroen^{1*}, Sudarat Suanjit² and Sirichom Thungkao³

¹Environmental Science Graduate Program, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

^{2,3}Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

**Corresponding author. E-mail: nun_0425@hotmail.com*

ABSTRACT

*A commercial ethanol plant using molasses as the raw material was surveyed for contamination of lactic acid bacteria (LAB). Molasses samples were obtained from one yeast propagation unit, six fermentation tanks, and one fermented mash storage tank in March 2015. The numbers of LAB in the samples were determined by colony counting on MRS agar supplemented with 0.01% cycloheximide. It was found that all samples were contaminated with LAB, ranging from 6.91 to 8.24 log CFU/mL. Seven predominant LAB isolates were subjected to 16S rRNA gene analysis. According to the degree of sequence similarity and phylogenetic relationships, *Lactobacillus farraginis*, *Lactobacillus pantheris*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus formosensis* and *Lactobacillus plantarum* group were identified.*

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, 16S rRNA gene analysis, Ethanol production

INTRODUCTION

In Thailand, the utilization of renewable sources of energy including biofuel has continuously increased. By the year 2016, usage of 3.55 million liters/day bioethanol as fuel has been targeted (Department of Alternative Energy Development and Efficiency, 2016).

Bioethanol is produced from fermentation of agricultural materials, such as corn, cassava, and sugarcane by certain yeast strains, particularly *Saccharomyces cerevisiae*. At present, about 21 commercial ethanol plants are being operated in Thailand, 14 of which use molasses as raw material and a sum of about 3.2 million liters ethanol are produced daily (Bank of Thailand, 2016; Department of Alternative Energy Development and Efficiency, 2015). Although the fermentation technology for ethanol production has been well-developed, microbial contamination remains the major obstacle limiting the production efficiency by inhibiting yeast growth and lower ethanol yield (Beckner et al., 2011).

Among the contaminants, lactic acid bacteria (LAB) are considered a primary rival due to their great adaptation to high ethanol concentration, low pH and low oxygen derived in ethanol fermentation conditions (Basso et al., 2011). Several reports have stated *Lactobacillus* as the main genus of LAB found in ethanol production process (Lucena et al., 2010). In industry, regular cleaning of fermenters and equipment has been adopted to reduce the contamination. In some cases, addition of selected chemical sanitizers as well as antibiotics in the fermenters has been reported. However, continual application of these agents may result in bacterial resistance development and reduce the efficacy of sanitization.

Since information on LAB contamination in the commercial ethanol plants in Thailand has not been widely reported, our research will focus on isolation and identification of LAB

contaminants in a plant producing ethanol from molasses in order to address the problem and to gain basic knowledge on their diversity for further implementation of appropriate control measures to this issue.

MATERIAL AND METHODS

Sample Collection

The ethanol plant employed in our study was a molasses-based plant located in the north east of Thailand. A total of eight samples were collected in March, 2015. They comprised one sample from yeast propagation tank (pre-fermenter), six samples from each fermenter, and one sample from fermented mash tank. Each sample (about 200 ml per sample) was stored in a plastic bottle and was analyzed within 24 hours after collection.

Direct Observation and Enumeration of LAB

First, the samples were examined directly using wet mounted technique and observed microscopically with a light microscope. Then, the samples were serially diluted in 0.85% normal saline and spread on de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar; Difco, USA) containing 0.01% cycloheximide (Merck, US) for yeast growth suppression (Lucena et al., 2010). The MRS agar plates were incubated at 30 °C anaerobically for 48 hours. After incubation, the colonies were counted and randomly checked for Gram characteristic and catalase. All LAB colonies displayed Gram-positive, non-spore forming rod, coccobacilli or cocci and exhibited catalase-negative. The LAB counts were reported as colony forming units per mL sample (CFU/mL) and were converted to \log_{10} CFU/mL. LAB isolates with distinguishing colony and cell morphology were selected and were purified by streaking on the same medium. The pure isolates were maintained in 30% glycerol at -80 °C for further studies.

Identification of LAB

Genomic DNA of each pure culture was extracted by TIANamp Bacteria DNA Kit (Tiangen Biotech, Beijing). Genomic DNA of each isolate was used as a template for PCR amplification of 16S rRNA gene using a pair of primers MAS2F (5'-TCCTGGCTCAGATTGAACGCT-3') and MAS1R (5'CTTGTTACGACTTCACCCCAG-3') (Saunjit, 2014). The reaction mixture comprised of 50 µl, 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each of dNTP, 0.5 µM forward primer and reverse primer, 0.05 units/µl *Taq* polymerase and template DNA (500 ng). PCR amplifying procedure was as follows: 3 min at 94 °C, 35 cycles of 45 sec at 94 °C, 30 sec at 55 °C, 1.30 min at 72 °C and then 10 min at 72 °C and was carried out on the automatic thermal cycler (Biometra, Germany). The PCR products were purified with E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega, USA). The nucleotide sequences of 16S rRNA gene were determined (First BASE Laboratories SdnBhd, Malaysia). Editing and contig assembly of the DNA sequences were performed using BioEdit software (Version 7.2.5). Sequence similarity searching was conducted on GenBank database using the standard nucleotide-nucleotide BLAST search algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The evolutionary relationships among species of LAB was analyzed and phylogenetic tree was reconstructed using MEGA software version 6.0. The identities of LAB were specified to the genus and species levels according to the criteria of similarity cutoff at 97% and 99%, respectively, as well as their evolutionary lineages.

RESULTS

Direct Observation and Enumeration of LAB

Bacteria of diverse cell shapes along with yeast cells were microscopically observed in all collected samples, as shown in Figure 1. This revealed bacterial contamination throughout the entire fermentation process of this ethanol plant. The density of yeast cells in six fermenter tanks (Figure 1 B-G) varied with lesser in fermenter No. 4 and 5 (Figure 1 E and F, respectively).

The viable counts of LAB obtained on MRS agar containing 0.01% cycloheximide were in accordance with the results of direct observation. The numbers varied from 6.91 log CFU/mL in fermenter No. 2 to 8.24 log CFU/mL in pre-fermenter (Figure 2).

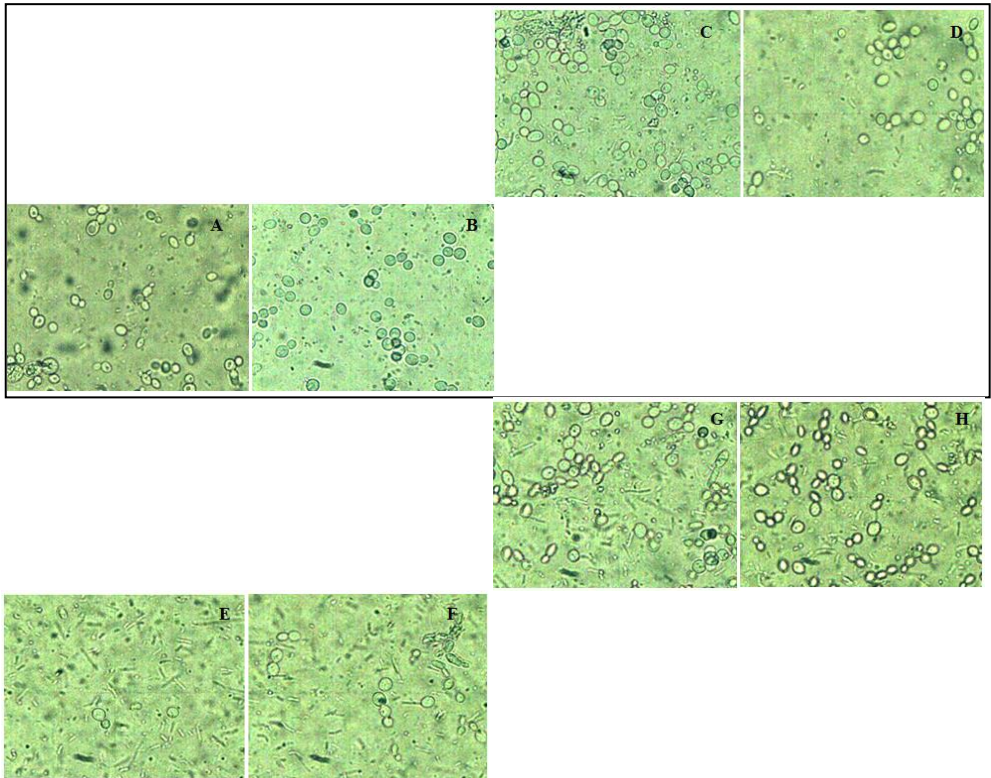


Figure 1. Wet mount microscopic observation of molasses samples from pre-fermenter; (A), Fermenter No.1 to Fermenter No.6; (B-G, respectively) and Fermented mash tank; (H).

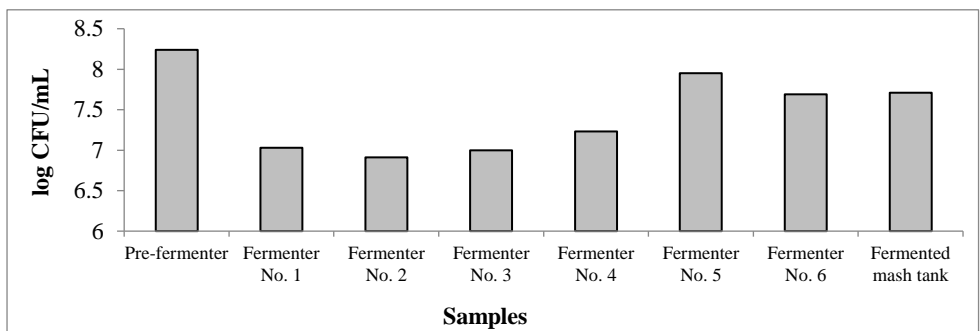


Figure 2. Numbers of LABs (log CFU/mL) in samples from pre-fermenter, fermenters and fermented mash tank of a molasses-based ethanol plant. Counts were obtained by plating the samples on MRS agar containing 0.01% cycloheximide and incubated anaerobically at 30 °C for 48 hours.

According to the colony and microscopic appearance, seven LAB isolates were selected for species identification and were designated as KA01, KA02, KA03, KA04, KA05, KA06, and KA07. KA01 was the most prevalent isolate, followed by KA05 and KA07, as shown in Table 1.

Table 1. Prevalence of LAB isolates found in various steps of the represent ethanol production plant.

Sources of sample	Isolate found
Pre-fermenter	KA03, KA06
Fermenter No.1	KA01, KA02, KA06
Fermenter No.2	KA01
Fermenter No.3	KA01, KA05, KA07
Fermenter No.4	KA01, KA03, KA05, KA07
Fermenter No.5	KA01, KA03, KA05, KA07
Fermenter No.6	KA01, KA03, KA05, KA07
Storage tank	KA01, KA05, KA07

Identification of LAB

An approximately 1,200 bp of 16S rRNA gene sequence was obtained from each isolate of LAB. BLASTn results suggested that all isolates belong to the genus *Lactobacillus* (Table 2) . Subsequently, the identities of these LAB isolates were consolidated by analyzing their phylogeny with taxa of high-scored rRNA sequences in BLAST searches. The Neighbor-Joining (NJ) tree of 16S rRNA gene sequence (n=29) showed clearly relationships among species of LAB. The seven isolates of *lactobacilli* were separated into two clusters. The more diverse cluster comprises isolates KA01, KA02, KA04, KA05, KA06, and KA07. The isolates KA01 and KA06 were placed in the *L. plantarum* group, which included *L. pentosus*, *L. plantarum*

subsp. *plantarum*, *L. plantarum* subsp. *argentoratensis*, and *L. paraplantarum*. Isolates KA02 and KA04 shared the same common recent ancestor which announced *L. farciminis* and *L. formosensis*, respectively, as a closest relatives, while KA05 and KA07 were grouped with strains of *L. farraginis*, which were highly supported with a bootstrap value of 100%. Remarkably, KA03 was the solely isolate distantly descended into another cluster and its closest neighbor was strains of *L. pantheris* (Figure 3)

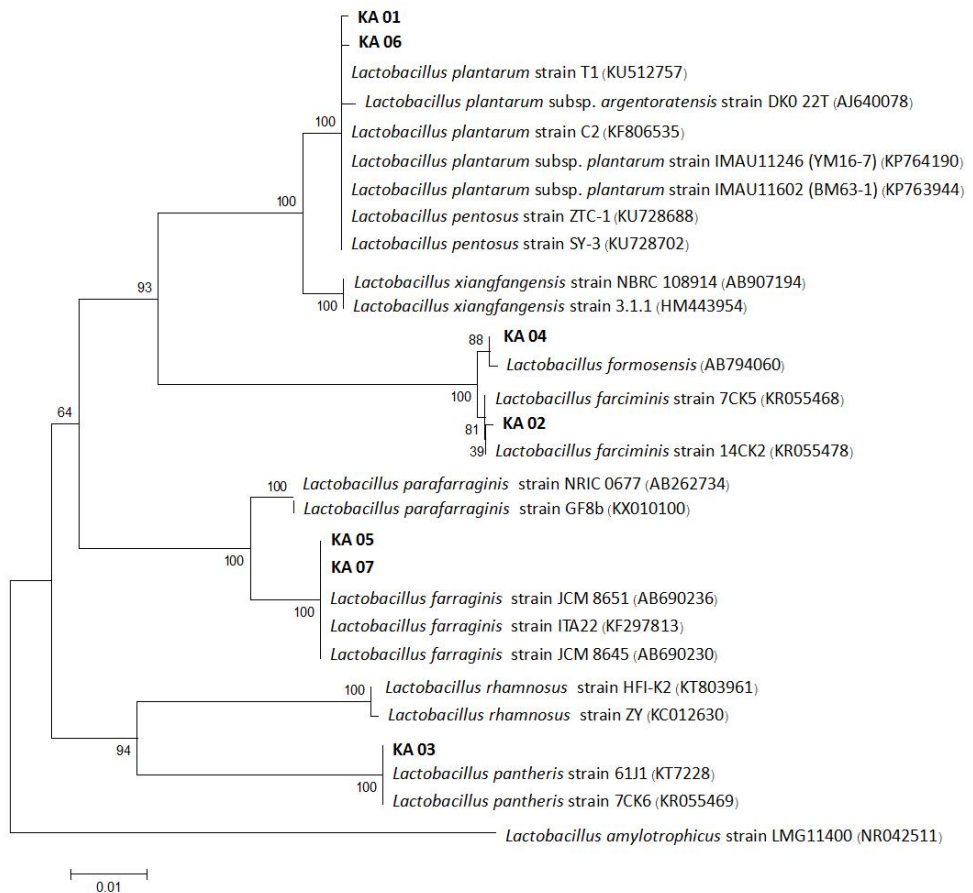


Figure 3. Phylogenetic tree inferred from 16S rRNA gene sequences of LAB. The tree were reconstructed by Neighbor-Joining method using Tamura 3-parameter algorithm in MEGA6.

Branch lengths, which indicated evolutionary distance, are proportional to the scale given. The strengths of the internal branches of the resultant trees were statistically evaluated by bootstrap analysis with 1000 replications. The analysis involved 29 nucleotide sequences by which *Lactobacillus amylotrophicus* LMG11400 (NR042511) was used as the outgroup taxon.

Table 2. BLAST results of isolates from the ethanol production plant.

Isolate	Closest taxon	Accession no.	% Similarity
KA 01	<i>L. plantarum</i> strain C2	KF806535	99
KA 02	<i>L. farciminis</i> strain 14CK2	KR055478	99
KA 03	<i>L. pantheris</i> strain 61J1	KT722831	100
KA 04	<i>L. formosensis</i>	AB794060	99
KA 05	<i>L. parafarraginis</i> strain 56LAB7	KR055510	100
KA 06	<i>L. plantarum</i> stain NL-1	LC164155	99
KA 07	<i>L. parafarraginis</i> strain 56LAB7	KR055510	100

DISCUSSION

Lactic acid bacteria are described as the most common bacterial contaminants in bioethanol production process (Beckner et al., 2011). Raw materials are considered the main source of contamination as they usually enter the process in non-steriled state. In Thailand, molasses is a cost-effective feedstock for industrial ethanol production and is used without heat treatment. As a result, chances of bacterial contamination in the process are obvious.

From the direct observation of the samples and the viable plate counts, LAB were found in all samples, starting from yeast propagation tank to fermented mash tank (Figure 1 and 2). To produce ethanol from cane molasses, the raw molasses (about 80 °Brix) is diluted with water to 12-16 °Brix and 30-35 °Brix for yeast starter cultivation and ethanol production, respectively, and are used without heat sterilization. Usually, raw molasses is not a

good substrate to support microbial growth due to its high osmotic pressure and presence of concentrated inhibitors. However, when subjected to dilution, chances of microbial multiplication are likely to occur. Hence, LAB contamination in the ethanol production line is possibly the result of molasses dilution and direct use without pasteurization. Moreover, a relatively high level of LAB at 8.24 log CFU/mL found in the pre-fermenter revealed contamination carried over from this unit to the fermenters.

The content and diversity of LAB in a bioethanol plant rely on many factors such as types and preparation of raw materials, plant location as well as sanitation practices. A study in corn ethanol facilities in US showed LAB contamination reaching 8 log CFU/mL (Skinner and Leather, 2004). In sugar cane juice and sugar molasses ethanol plant in Brazil, ca. 5-8 log CFU/mL of LAB were found (Lucena et al., 2010). In our study, a range of 6.91 to 8.24 log CFU/mL LAB was detected along the production line (Figure 2). Since we were informed by the producer that a monensin antibiotic has been used to control bacterial contamination in this ethanol plant, resistance to this antibiotic by LAB may be emerged, as evidenced by the relatively high numbers of LAB existing in the process.

Interestingly, our results of LAB identification were not in agreement with other authors who also investigated LAB contamination in Thailand's molasses ethanol production plants (Thungkao and Pattanachareonsuk, 2014; Thungkao and Roencharoen, 2015). In these reports, *Lactobacillus plantarum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. pantosus*, *L. fermentum* and *Pediococcus damnosus* were found whereas *L. farraginis*, *L. pantheris*, *L. farciminis*, *L. formosensis* and *L. plantarum* group were identified in our study. Furthermore, *L. pantheris*, *L. farciminis* and *L. formosensis* were first reported as LAB contaminant in the bioethanol process. The difference in LAB diversity at species level revealed here may relate to many factors including plant location, sampling interval and identification

technique. While the other authors employed API 50 CHL which is a biochemical- based method to identify LAB, we used 16S rRNA gene sequencing. Phenotypic identification based on carbohydrate fermentation profiles such as the API 50CHL may give some doubts to lactobacilli identification at the species level and genetic analyses of bacteria may be more reliable (Brolazo et al., 2011). Using both API 50CHL and 16S rRNA methods, some differences in species of lactic acid bacteria isolated from Indonesian fermented foods were reported by some authors (Suhartatik et al., 2014).

Although, there are some enquiry about species diversity of lactic acid bacterial flora dominating in the commercial molasses ethanol plants in Thailand, our report is the first to apply molecular method to identify the LAB. More researches such as a molecular fingerprint of bacterial contaminants should be performed in the future to provide better information on the LAB community in this type of fermentation process, and therefore, to effectively control the contamination problem.

CONCLUSION

Lactic acid bacteria ranging from 6.91 to 8.24 log CFU/mL were contaminated along the production line of a molasses bioethanol commercial plant. Seven represent major isolates were shown to be the genus *Lactobacillus* and according to the 16S rRNA gene analysis *L. farraginis*, *L. pantheris*, *L. farciminis*, *L. formosensis* and *L. plantarum* group were identified.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants funded by The National Research Council of Thailand (NRCT). We wish to thank Suanjit S. for expert technical and instrument assistance.

REFERENCES

- Basso, L.C., Amorim, H.V., Oliveira, A. J. and Lopes, M.L. 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *Federation of European Microbiological Societies*. 8:1155–1163.
- Bank of Thailand, 2016. Report rates of ethanol in Thailand. Retrieved July, 2016 from https://www.bot.or.th/Thai/MonetaryPolicy/NorthEastern5_9_Ethanol.pdf.
- Beckner, M., Ivey, M.L. and Phister, T.G. 2011. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*. 53:387–394.
- Eliane, M.B., Domingos, S.L., Monique, R.T., Marina, V., Camila, M. and Jose, A.S. 2011. Correlation between Api 50 CH and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1): 225–232.
- Department of Alternative Energy Development and Efficiency, 2015. The situation of ethanol plant in Thailand. Retrieved July, 2016 from http://www.dede.go.th/Table_Thailand_of_Energy_Balance_2015.
- Department of Alternative Energy Development and Efficiency, 2016. The situation of ethanol plant in Thailand. Retrieved July, 2016 from http://www.dede.go.th/download/state_59/EnergyThailand2015_Reports.pdf.
- Lucena, B.T.L., Santos, B.M., Moreira, L.S., Moreira, P.B., Nunes, A.C., Azevedo, V., Miyoshi, A., Thompson, F.L. and Morais Junior, M.A. 2010. Diversity of lactic acid bacteria of the

bioethanol process. *BioMed Central Microbiology*, 298(10): 1471-1478.

- Skinner, K.A. and Leathers, T.D. 2004. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31: 401–408.
- Suanjit, S. 2014. Molecular genetic identification of microorganisms and phylogenetic tree analysis. Faculty of Science, Burapha University.
- Suhartatik, N., Cahyanto, M.N., Rahardjo, S., Miyashita, M. and Rahayu, E. S. 2014. Isolation and identification of lactic acid bacteria producing β glucosidase from Indonesian fermented foods. *International Food Research Journal*, 21(3): 973-978.
- Thungkao, S. and Pattanachareonsuk, P. 2014. Contamination and antibiotic susceptibility tests of lactic acid bacteria in an ethanol production plant. p 206(Abstract). In Burapha University International Conference, Burapha University.
- Thungkao, S. and Roancharoen, N. 2015. The occurrence and identification of lactic acid bacteria in molasses-based ethanol production plants in Thailand. p 743-749. In Burapha University International Conference, Burapha University.