รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพสำหรับปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

The study of genes involving in Biogas Production for improving bacterial strain

นางสาวญาณิศา ละอองอุทัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802111
สัญญาเลขที่ 152/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพสำหรับปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

The study of genes involving in Biogas Production for improving bacterial strain

นางสาวญาณิศา ละอองอุทัย
คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 152/2559 รวมไปถึงคณะวิศวกรรมศาสตร์ และภาควิชาวิศวกรรมเคมีที่อำนวยสถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัย รวมไปถึงคณาจารย์และนิสิตของภาควิชาวิศวกรรมเคมีที่ให้คำแนะนำและทำการทดลองทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวญาณิศา ละอองอุทัย

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร
(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.ญาณิศา ละอองอุทัย ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุกหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัย เรื่อง การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพสำหรับปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ (The study of genes involving in Biogas Production for improving bacterial strain) รหัสโครงการ 2559A10802111 สัญญาเลขที่ 152/2559 (งานวิจัยต่อเนื่อง) ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 425,000 บาท (สี่แสนสองหมื่นห้าพันบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 3 ปี 9 เดือน (ระหว่าง ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง กันยายน พ.ศ. 2562)

กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพจากการหมักของเสียนับว่าเป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับตัวแปรหลายตัวแปรที่มีผลกระทบซึ่งกันและกัน จึงมีผลกระทบต่อเนื่องกับปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ หนึ่งในนั้นคือชนิดของจุลชีพที่เกี่ยวข้องซึ่งบางชนิดโตได้ยากและจะเจริญเติบโตในสภาวะที่จำเพาะเจาะจงเท่านั้น จึงทำให้ในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงนั้นจำเป็นจะต้องควบคุมสภาวะให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลชีพ ซึ่งอาจทำให้กระบวนการผลิตมีต้นทุนที่สูงตามไปด้วย ดังนั้นหากทราบถึงชนิดของจุลชีพ และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวรวมถึงหน้าที่ของกลุ่มยีนเหล่านั้น ก็จะสามารถนำยีนที่สำคัญมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลชีพให้มีศักยภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงขึ้นในสภาวะแวดล้อมทั่วไป ก็จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้

งานวิจัยนี้จึงสนใจทำการศึกษาการผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนเลนบ่อกุ้งจากฟาร์มกุ้งในภาคตะวันออกในการผลิตไบโอแก๊สเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อจุลชีพที่อาศัยอยู่ในตะกอนเลนบ่อกุ้งในถังหมักพบว่าสามารถผลิตแก๊สชีวภาพที่มี มีเทนเป็นองค์ประกอบ 68% ซึ่งค่อนข้างสูง จากนั้นทำการแยกเชื้อที่สำคัญในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพพบว่าได้เชื้อที่มีความสำคัญในกระบวนการกระบวนการไฮโดรไลซิสและกระบวนการอะซิโดเจนนีซีส โดยเชื้อหลักแยกได้ คือ *Exiguobacterium Bacillus, Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* และจากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรวม (mixed culture) ที่โตในถังหมักเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนเป้าหมายนั่น คือ mcrA, hydA และ HoxE ที่มีความสำคัญในการผลิตมีเทนและไฮโดรเจน แต่เมื่อทำการโคลนนิ่งและหาลำดับเบสแล้วจำนวนสามรอบการทดลอง (โดยการปรับกระบวนการสกัดดีเอนเอ สภาวะการทำ PCR, primer, etc.) ใช้เวลาในการปรับสภาวะดังกล่าว รวมถึงเพิ่มชนิดของยีนเป้าหมาย มาแล้วสองปีกว่า ก็ยังไม่สามารถผลิตเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณสมบัติในการผลิตมีเทนหรือไฮโดรเจนได้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะ ดีเอนเอต้นแบบที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นแบบดีเอนเอรวม (pool DNA) ซึ่งมาจากหลายสปีชีส์รวมกันในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพอาจจะเป็นการยากที่จะได้ยีนเป้าหมายเดี่ยวๆ หรือ/และ ในระบบมีเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนอยู่ในระบบน้อยจึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายได้ หรือ/และ ตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอนั่นก็

คือตะกอนเลนบ่อกุ้งมีสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งหรือทำลายดีเอนเอเป้าหมายที่สนใจทำให้ขัดขวางการโคลนนิ่งได้ ดังนั้น ถึงแม้ตะกอนเลนบ่อกุ้งจะเป็นแหล่งผลิตแก๊สชีวภาพที่ดี แต่ก็เป็นตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมในการนำมาเป็นแหล่งสังเคราะห์ยีนที่สำคัญต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ จึงจำเป็นต้องหาแหล่งตัวอย่างแหล่งอื่น หรือเทคนิคอื่นที่มีความทันสมัยเข้ามาช่วย เช่น การทำ metagenomics library เพื่อให้บรรลุวัตถุที่ตั้งไว้ต่อไป

ผลงานตีพิมพ์ที่เกิดจากโครงการวิจัย : เป็นส่วนหนึ่งในงานดังต่อไปนี้ แต่ไม่ได้ระบุแหล่งทุนหรือสัญญาทุนที่ชัดเจนลงไป

1. ชื่อเรื่อง : Effect of light and microorganism on biogas production from shrimp pond sediment using *mcrA* AND *16S rRNA* gene expression profile
   วารสารงานประชุม : The 7th ITIChE 2017, Bangkok, Thailand, October 18-20, 2017
Impact Factor : -
   สถานะการตีพิมพ์ : Published
2. ชื่อเรื่อง : อิทธิพลของแสงและจุลชีพต่อกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนเลนบ่อกุ้งโดยกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน และการแสดงออกของยีน mcrA และ HoxE ต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ (โครงงานทาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต)
   สถานะการตีพิมพ์ : Published

ข้อเสนอแนะ

1. อาจจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นในการทำโคลนนิ่งเพื่อให้ได้ยีนเป้าหมาย เช่น การสร้าง metagenomics library โดยเลือกใช้ vector ที่เหมาะในการทำ library มากกว่า Topo vector

2. ควรเลือกวิธีในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่จำเพาะเจาะจงกว่านี้เพื่อให้ได้เชื้อที่มียีนเป้าหมายที่สนใจสำหรับทำโคลนนิ่ง

3. เปลี่ยนแหล่งของสารสารตั้งต้น หรือ/และ หัวเชื้อ สำหรับผลิตแก๊สชีวภาพ เพื่อให้ได้กลุ่มประชากรหรือจุลินทรีย์ที่มียีนเป้าหมายที่สนใจ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นศึกษาการผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนเลนบ่อกุ้งจากฟาร์มกุ้งในภาคตะวันออกและเพื่อเพิ่มจำนวนจุลชีพในถังหมักพบว่าสามารถผลิตแก๊สชีวภาพที่มีมีเทนเป็นองค์ประกอบ 68% ซึ่งค่อนข้างสูง จากนั้นทำการแยกเชื้อที่สำคัญในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพพบว่าได้เชื้อที่มีความสำคัญในกระบวนการกระบวนการไฮโดรไลซิสและกระบวนการอะซิโดเจนนีซีส โดยเชื้อหลักแยกได้ คือ *Exiguobacterium Bacillus, Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* และจากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรวมที่โตในถังหมักเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนเป้าหมายนั่น คือ mcrA, hydA และ HoxE ที่มีความสำคัญในการผลิตมีเทนและไฮโดรเจน ซึ่งสังเคราะห์ได้ตามขนาดที่คาดหวัง แต่เมื่อทำการโคลนนิ่งและหาลำดับเบสแล้วไม่ใช่ยีนดังกล่าว โดยทำการศึกษาหาสาเหตุและทำการปรับสภาวะต่างๆ คือ กระบวนการสกัดดีเอนเอ สภาวะการทำ PCR primer รวมถึงชนิดของยีนเป้าหมาย โดยใช้เวลาร่วมแล้วสองปีกว่า ก็ยังไม่สามารถผลิตเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณสมบัติในการผลิตมีเทนหรือไฮโดรเจนได้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะ ดีเอนเอต้นแบบที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นแบบดีเอนเอรวม (pool DNA) ซึ่งมาจากหลายสปีชีส์รวมกันในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ อาจจะเป็นการยากที่จะได้ยีนเป้าหมายเดี่ยวๆ หรือ/และ ในระบบมีเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนอยู่ในระบบน้อยจึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายได้ หรือ/และ ตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอนั่นก็คือตะกอนเลนบ่อกุ้งมีสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งหรือทำลายดีเอนเอเป้าหมายที่สนใจทำให้ขัดขวางการโคลนนิ่งได้ ดังนั้น ถึงแม้ตะกอนเลนบ่อกุ้งจะเป็นแหล่งผลิตแก๊สชีวภาพที่ดี แต่ก็เป็นตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมในการนำมาเป็นแหล่งสังเคราะห์ยีนที่สำคัญต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ จึงจำเป็นต้องหาแหล่งตัวอย่างแหล่งอื่น หรือเทคนิคอื่นที่มีความทันสมัยเข้ามาช่วย เช่น การทำ metagenomics library เพื่อให้บรรลุวัตถุที่ตั้งไว้ต่อไป

คำสำคัญ : ยีน, แก๊สชีวภาพ, จุลชีพ, พันธุวิศวกรรม

Abstract

This research aimed to study the biogas production from shrimp pond sediment in eastern part of Thailand. The microbe in shrimp pond was grown during the fermentation process. The high methane was revealed 68% of gas composition. The microbe involving in biogas production was isolated which related to hydrolysis and acidogenesis processes. *Exiguobacterium Bacillus, Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* were main microorganism. The total DNA of microbial population was extracted from the fermenter after biogas production. These DNA was used as the template of mcrA, hydA and HoxE synthesis. These target genes are important in methane and hydrogen production. The expected size was shown in gel electrophoresis. However, it showed that none of them were expect genes after cloning and sequencing. The research group tried to solve the problem and looked for all possibilities that might cause the negative result. We adjusted many conditions such as methods for DNA extraction, PCR conditions, primers and change the target gene etc. But the recombinant clone was still could not constructed. This might be because (1) the DNA template was pool DNA from many species which might difficult to get the only specific gene and/or (2) in the fermenter had small amount of methane and hydrogen producing microbe and/or (3) shrimp sediment samples might contain substance which binded to target gene and formed a complex that blocked the cloning process resulting of none target genes were clone. However, shrimp pond sediment could be a good source for biogas production but this sample was not suitable for synthesis the biogas production genes. It need to look for other sources for microbial DNA template or using other techniques such as construct the metagenomics library. These may help we meeting our objective.

Keywords: gene, biogas, microorganism, genetic Engineering

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร ..... ข
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 1
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 1
1.5 คำสำคัญของการวิจัย 2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลักตามประเด็นให้ครอบคลุมเรื่องที่วิจัย 3
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม 7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 8
3.1 วัตถุดิบ 8
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย 8
บทที่ 4 ผลการวิจัย 9
4.1 การผลิตแก๊สชีวภาพ 9
4.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนเลนที่ผ่านการหมัก 11
4.3 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (Chromosomal DNA) 11
4.4 การสังเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 12
4.5 การวิเคราะห์ผลลำดับดีเอ็นเอ 12
4.6 ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนที่ผลิตแก๊สชีวภาพ 14
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 17
5.1 สรุปผลการวิจัย 17
5.2 ข้อเสนอแนะ 17
5.3 ผลผลิต 17

รายงานการเงิน 19
เอกสารอ้างอิง 20
ภาคผนวก 21
ประวัตินักวิจัย 22

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงองค์ประกอบของแก๊สชีวภาพที่ได้จากการหมักตะกอนเลนบ่อเลี้ยงกุ้ง 10
4.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนเลนบ่อกุ้ง 13
4.3 กลุ่มชนิดของแบคทีเรียในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพที่พบในตะกอนเลนบ่อกุ้ง 14

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 กลไกทางชีวเคมี และยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตมีเทน 6
2.2 กลไกทางชีวเคมีและกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตไฮโดรเจน 7
4.1 ปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ต่อวันจากกระบวนการหมัก 9
4.2 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สชีวภาพสะสมที่เกิดขึ้น 10
4.3 แสดงการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth 11
4.4 แสดงโครโมโซมองดีเอนเอจากเชื้อที่แยกได้จากตะกอนเลนบ่อกุ้งหลังกระบวนการหมักแก๊สชีวภาพ 11
4.5 ยีน 16s rRNA ที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ที่แยกได้ ในข้อ 4.2 12
4.6 การเพิ่มจำนวนยีน mcrA และ hydA หรือ hg จากดีเอในตะกอนเลยบ่อกุ้ง (ก, ข, ค) PCR product จาก primer ชุดที่ 1, 2 และ 3 15
4.7 DNA ของยีน HoxE จากตัวอย่างตะกอนเลนที่ทำการหมัก ณ เวลาต่างๆ 15

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพจากการหมักของเสียนับว่าเป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับตัวแปรหลายตัวแปรที่มีผลกระทบซึ่งกันและกัน จึงมีผลกระทบต่อเนื่องกับปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ หนึ่งในนั้นคือชนิดของจุลชีพที่เกี่ยวข้องซึ่งบางชนิดโตได้ยากและจะเจริญเติบโตในสภาวะที่จำเพาะเจาะจงเท่านั้น จึงทำให้ในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงนั้นจำเป็นจะต้องควบคุมสภาวะให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลชีพ ซึ่งอาจทำให้กระบวนการผลิตมีต้นทุนที่สูงตามไปด้วย ดังนั้นหากทราบถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวรวมถึงหน้าที่ของกลุ่มยีนเหล่านั้น ก็จะสามารถนำยีนที่สำคัญมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลชีพให้มีศักยภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงขึ้นในสภาวะแวดล้อมทั่วไป ก็จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้

ในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีความสนใจในการศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ และโคลนยีนดังกล่าวเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน เพื่อนำยีนที่สำคัญไปใช้ปรับปรุงสายพันธุ์จุลชีพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.ศึกษาและเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

2.โคลนยีนที่สนใจและศึกษาหน้าที่ของยีนดังกล่าว

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ตะกอนเลนบ่อกุ้งจากฟาร์มกุ้งในภาคตะวันออกถูกเลือกมาเป็นสารตั้งต้นและแหล่งของจุลชีพในการผลิตไบโอแก๊สเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อจุลชีพในถังหมัก จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อที่โตในถังหมัดเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนเป้าหมาย ทำการโคลนยีนที่สนใจในเซลล์อีโคไล ศึกษารูปแบบการเจริญเติบของเซลล์ลูกผสมดังกล่าว

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1 การผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนเลนบ่อกุ้งทะเลมาทำการหมักเป็นเวลา 30 วัน

2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนเลนที่ผ่านการหมัก

3 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (Chromosomal DNA)

4 การสังเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

5 การทำบริสุทธิ์ PCR product โดยใช้ Purification Kit

6 การวิเคราะห์ผลลำดับดีเอ็นเอ

7 ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศ และชีวโมเลกุล

8 ปรับปรุงสายพันธ์อีโคไลด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม

1.5 คำสำคัญของการวิจัย

ยีน (Gene) แก๊สชีวภาพ (Biogas) จุลชีพ (Microorganism) พันธุวิศวกรรม (Genetic Engineering)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวารสาร:

ข้อมูลการทดลองที่ได้จากโครงการวิจัยคาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่ในงานประชุมทางวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ หรือวารสารวิชาการระดับชาติ

ผลงานวิจัยดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการผลิตพลังงานทางเลือกให้กับชุมชน หรือแม้โรงงานอุตสาหกรรมในการที่จะนำเอาของเสียอินทรีย์มาใช้ให้เกิดประโยชน์ เพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์:

งานวิจัยนี้จะเกิดประโยชน์อย่างยิ่งทั้งต่อผู้ประกอบการด้านการเกษตร หรืออุตสาหกรรมที่ใช่สารอินทรีย์ รวมถึงสถาบันการศึกษา อีกทั้งยังเป็นฐานข้อมูลสำหรับการพัฒนากระบนการผลิตแก๊สชีวภาพและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลักตามประเด็นให้ครอบคลุมเรื่องที่วิจัย

1. ก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพ คือ ก๊าซที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic digestion)โดยทั่วไปก๊าซชีวภาพจะประกอบด้วย ก๊าซมีเทน (CH_4) ประมาณร้อยละ 50-70 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณร้อยละ 30-40 ส่วนที่เหลือจะเป็นก๊าซชนิดอื่นๆ เช่น แอมโมเนีย (NH_4) ไฮโดรเจน (H_2) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) แต่จะมีอยู่ในปริมาณที่น้อย ก๊าซมีเทนเป็นก๊าซที่ให้ค่าพลังงานความร้อนสูง โดยสามารถให้พลังงานความร้อนได้ประมาณ 9,000 กิโลแคลอรีต่อลูกบาศก์เมตร หรือ 21,000 กิโลจูนต่อลูกบาศก์เมตร ดังนั้นจึงสามารถนำก๊าซชีวภาพไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง เช่น เผาเพื่อใช้ประโยชน์จากความร้อนโดยตรง ใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ หรือใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้า เป็นต้น [1]

2. กระบวนการเกิดก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพ (Biogas) คือ ก๊าซที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนด้วยแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรด (Acid forming bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มผลิตมีเทน (Methane producing bacteria) โดยแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรด จะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลใหญ่ ให้กลายเป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเล็กลง จากนั้นแบคทีเรียกลุ่มผลิตมีเทนจะใช้สารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเล็กเป็นสารอาหารและย่อยสลายให้เกิดเป็นก๊าซมีเทน (CH_4) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) โดยมีก๊าซอื่นๆ เกิดขึ้นในปริมาณเล็กน้อย เช่น ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) เป็นต้น กระบวนการเกิดชีวภาพต้องระวังไม่ให้อากาศเข้าไปสัมผัสกับแบคทีเรียกลุ่มผลิตมีเทน เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซมีเทนลดลง ก๊าซชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ เมื่อมีแบคทีเรีย สารอินทรีย์ และอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมในสภาวะไร้อากาศ ในธรรมชาตินั้น ก๊าซชีวภาพมักจะเกิดขึ้นบริเวณที่มีการหมัก เช่น ก้นบ่อ ก้นแม่น้ำ ก้นทะเลสาบ หนองน้ำ บึง และนาข้าวที่มีน้ำท่วมขัง เป็นต้น [2]

2.1 กระบวนการย่อยสลายในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

ในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

เป็นการกระบวนการที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์เซลล์แบคทีเรีย โดยสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่จะถูกแบคทีเรียย่อยสลายโดยใช้เอมไซม์ปล่อยออกมาภายนอนเซลล์ (Extracellular enzyme) ให้กลายสภาพเป็นสารประกอบเชิงเดี่ยว (Monomer) สำหรับใช้ในกระบวนการสร้างกรด แบคทีเรียที่หน้าที่ในการย่อยสลาย คือ แบคทีเรียจำพวกแฟคคัลเททีฟแอนโรบิคแบคทีเรีย (Facultative anaerobic bacteria) โดยกลุ่ม

ของแบคทีเรียในขั้นตอนนี้จะแบ่งได้ตามชนิดของเอมไซม์ที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ คือ Cellulytic, Lipolytic และ Proeolytic [1]

ขั้นตอนที่ 2 กระบวนการสร้างกรด (Acidogenesis)

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย การย่อยสลายในขั้นตอนนี้จะใช้สารที่ได้จากการย่อยในขั้นตอนแรกเป็นสารตั้งต้นสำหรับแบคทีเรียประเภทสร้างกรด โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนสารอาหารดังกล่าวให้เป็นกรดอินทรีย์โมเลกุลขนอดเล็ก เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดโพรไพโอนิก (Propionic acid) กรดวาเลอริก (Valeric acid) และกรดแลคติก (Lactic acid) เป็นต้น โดยกรดที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะมีสัดส่วนของกรดซิกสูงสุด นอกจากนี้ยังมีการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นในขั้นตอนนี้ด้วย [1]

ขั้นตอนที่ 3 กระบวนการสร้างกรดอะซิติก (Acetogenesis)

เป็นขั้นตอนที่แบคทีเรียสร้างสารอะซิติกจำพวกอะซิโตน (Acettone) จะเปลี่ยนสารจำพวก กรดไขมันระเหยง่าย ให้เป็นสารอะซิเตต ,ฟอร์เมต ,ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสารอาหารตั้งต้นของแบคทีเรียขั้นต่อไป [3]

ขั้นตอนที่ 4 กระบวนการสร้างมีเทน (Methanogenesis)

กรดอินทรีย์โมเลกุลขนาดเล็ก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ที่เกิดจากขั้นตอนการสร้างกรดจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยแบคทีเรียสร้างมีเทน (Methane forming bacteria) การเกิดก๊าซมีเทนเกิดได้ 2 แบบ แบบแรก คือ เกิดจากการเปลี่ยนกรดอินทรีย์ไปเป็นก๊าซมีเทน และอีกส่วนหนึ่งจะเกิดจากการรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนให้กลายเป็นก๊าซมีเทน โดยแบคทีเรียประเภท Hydrogen-Utilizing Methane Bacteria ดังสมการที่ 1 และ 2 [1]

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \quad (1)$$

$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \quad (2)$$

2.2 แบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลายในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

ในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน ต้องอาศัยการทำงานของแบคทีเรียหลายชนิดรวมกัน ซึ่งแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรด (Acid forming bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มผลิตก๊าซมีเทน (Methane producing bacteria)

2.2.1 แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรด (Acid forming bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Facultative anaerobic bacteria ซึ่งสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยรับพลังงานจากการย่อยสลายของสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่ให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กรดไขมัน กรดอินทรีย์ระเหยง่าย ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซแอมโมเนีย เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1) อะซิโดเจนนิคแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน เนื่องจากสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารได้หลายชนิดและมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเดียวที่ละลายน้ำได้ เช่น กรดอะซิติก กรดไพรพิออนิก กรดบิวทีริก เป็นต้น

2) อะซิโตเจนิคแบคทีเรีย

แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นพวกที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ได้จากการย่อยสลายของแบคทีเรียกลุ่มอะซิโดเจนนิคแบคทีเรีย แล้วเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

Hydrogen producing acetogenic bacteria แบคทีเรียในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในขั้นตอนไฮโดรไลซีส ซึ่งได้แก่ แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ ได้เป็นกรดอะซิติก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการที่ 3, 4 และ 5 (กรมโรงงานอุสาหกรรม, 2553)

$$C_2H_5OH + H_2O \rightarrow CH_3 + 2H_2 \quad (3)$$

$$C_2H_5COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2 \quad (4)$$

$$C_3H_7COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2 \quad (5)$$

Homoacetogenic bacteria แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1) Autotroph ได้แก่ แบคทีเรียที่ใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนในการเจริญเติบโต และได้ผลสุดท้ายเป็นกรดอะซิเตต ดังสมการที่ 6

$$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O \quad (6)$$

2) Heterotroph ได้แก่ แบคทีเรียที่ใช้สารประกอบที่มีคาร์บอนหลายอะตอมในการเจริญเติบโต ผลผลิตที่ได้มี ทั้งอะซิเตต และโพรพิออเนต ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการผลิตก๊าซมีเทน ดังสมการที่ 7

$$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4C_2H_5COOH + 2CO_2 + 2H_2O \quad (7)$$

2.2.2 แบคทีเรียกลุ่มผลิตมีเทน (Methane producing bacteria)

แบคทีเรียที่สร้างผลิตมีเทนจะเจริญเติบโตได้ช้า และยังความไวต่อการเปลี่ยนแปลงมาก โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตมีเทนแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ

1) Hydrogenotrophic methanogen ซึ่งเปลี่ยนก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นก๊าซมีเทน ดังสมการที่ 8

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \quad (8)$$

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญคือจะใช้ก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไม่ใช้อากาศในกระบวนการสร้างกรด โดยช่วยคงสภาวะให้มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนต่ำลง ซึ่งมีผลต่อการเกิดอะซิเตตอย่างต่อเนื่อง

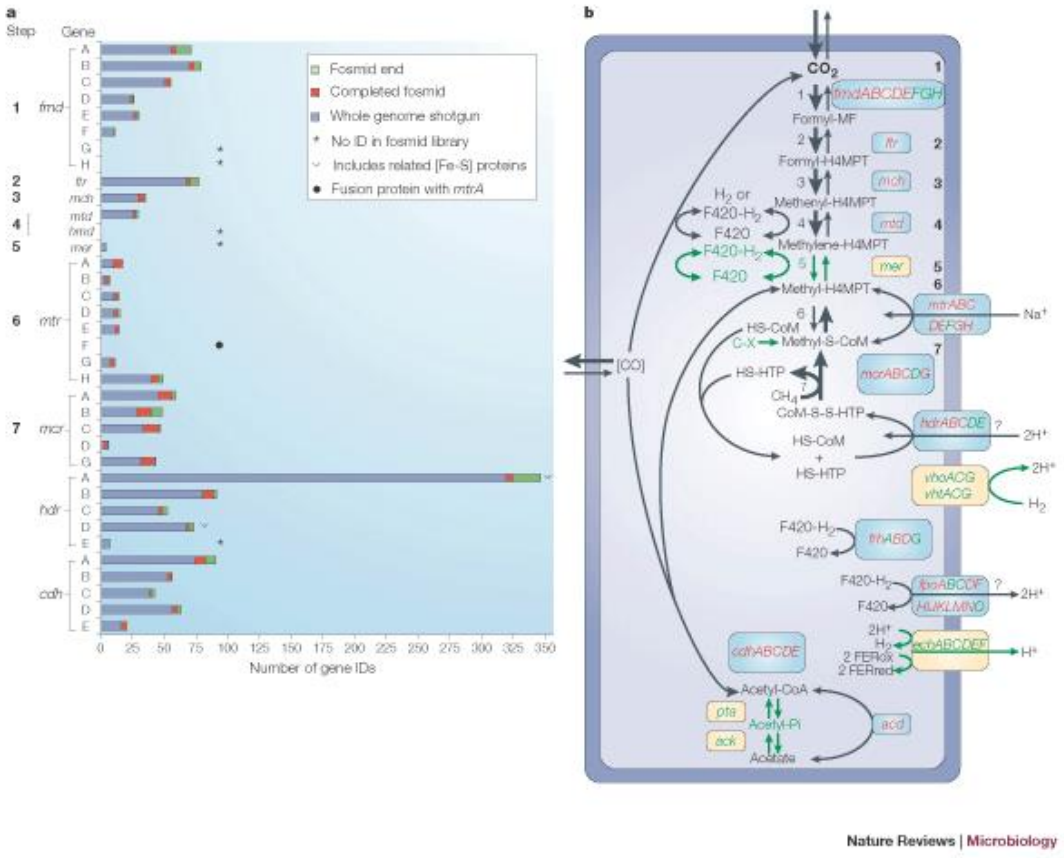
2) Acetotrophlc methanogens จะเปลี่ยนอะซิเตตไปเป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการที่ 9

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \quad (9)$$

ปริมาณก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นประมาณ 2 ใน 3 เกิดจากการเปลี่ยนอะซิเตตไปเป็นก๊าซมีเทนโดยแบคทีเรียกลุ่ม Acetotrophic methanogens และที่เหลือเป็นผลของปฏิกิริยาระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียกลุ่ม Hydrogenotrophic methanogens [2]

จากกระบวนการดังกล่าวพบว่ามีกลไกทางชีวเคมี และยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตมีเทนดังภาพที่ 1

จากกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพดังกล่าวเราจะเห็นว่ามีหลายกระบวนการที่ให้แก๊สไฮโดรเจนออกมา เช่น ในกระบวนการอะซิโตเจเนซิส ด้วยแบคทีเรียกลุ่ม Hydrogen producing acetogenic bacteria นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียกลุ่มที่เปลี่ยนสารประกอบคาร์บอน 1 อะตอม เช่น เมทานอล และมีเทน ให้เป็นแก๊สโฮโดรเจนได้อีกด้วย [5]



ภาพที่ 2.1 กลไกทางชีวเคมี และยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตมีเทน [4]

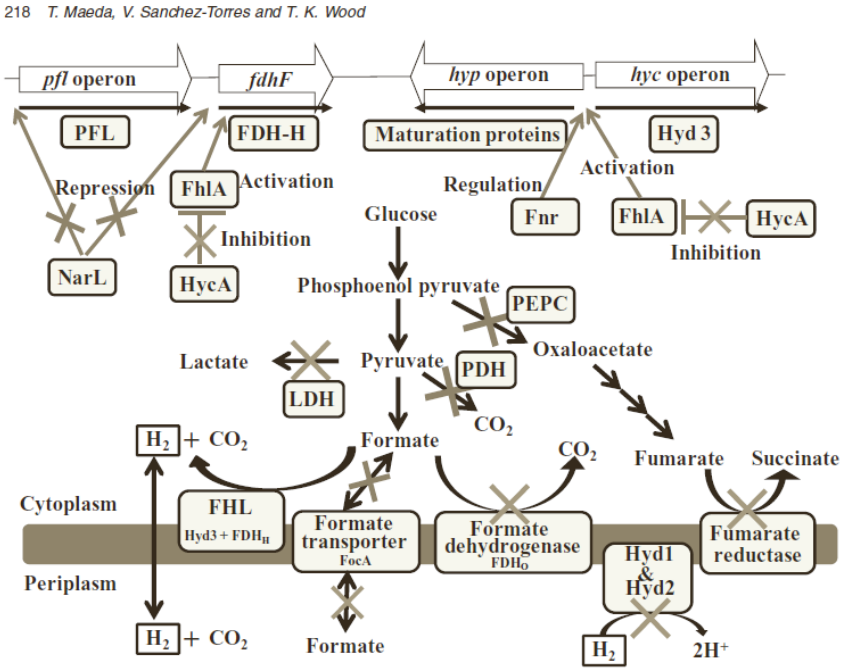
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจน

มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนในระบบปิดโดยใช้จุลชีพที่มีดว่ากลูโคส 1 โมล จากสารประกอบคาร์โบไฮเดรต สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 12 โมล ดังสมการที่ 10 [6, 7, 8]

$$C_6H_{10}O_5 + 7\ H_2O \longrightarrow 12\ H_2 + 6\ CO_2 \qquad \text{(สมการที่ 10)}$$

โดยมีกลไกทางชีวเคมี และยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตไฮโดรเจนดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2.2 กลไกทางชีวเคมีและกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตไฮโดรเจน [9]

ในปี 2009 ได้มีรายงานถึงความสำเร็จในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงจากสารตั้งต้นพวกเซลลูโลส [10] นอกจากนี้นักวิจัยยังนำแนวคิดดังกล่าวมาศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาไปเป็นพลังงานสำหรับยานยนต์ในอนาคต [11] แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยทางด้านจำแนกเชื้อที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนก็ยังมีอยู่ในวงจำกัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ซึ่งมีสารตั้งต้นชีวมวลอยู่อย่างมาก

จากงานวิจัยและแนวคิดดังกล่าวทางกลุ่มผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความเป็นไปได้ในการที่จะศึกษาและจำแนกชนิดของกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจน หรือแก๊สชีวภาพดังกล่าว เพื่อนำมาทดสอบเป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับพัฒนาการผลิตพลังงานจากชีวมวล

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

ตะกอนเลนจากบ่อกุ้ง (จากฟาร์มกุ้งในภาคตะวันออก) หรือของเสียอินทรีย์ในภาคตะวันออก

3.2. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การผลิตแก๊สชีวภาพ

นำตะกอนเลนบ่อกุ้งทะเลมาทำการหมักเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นและวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพที่ได้ หรือการหมักของเสียอินทรีย์

3.2.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนเลนที่ผ่านการหมัก

นำตะกอนหรือของเสียตัวอย่างมาเจือจางในน้ำเกลือ 0.85% (normal saline)

3.2.3 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (Chromosomal DNA) ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป นำสารละลายที่ได้มาตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยอากะโรสเจลภายใต้กระแสไฟฟ้า (Agarose Gel electrophoresis) ที่มีความเข้มข้นของ Agarose ร้อยละ 1 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.2.4 การสังเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) นำสารละลายดีเอ็นเอสกัดได้มาทำการเพิ่มจำนวนกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแก๊สชีวภาพ 16S ด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (thermocycler)

3.2.5 การทำบริสุทธิ์ PCR product โดยใช้ Purification Kit และทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis บน agarose gel

3.2.6 การวิเคราะห์ผลลำดับดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอของยีนที่เพิ่มจำนวนได้ ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA sequencing จากนั้นนำผลลำดับดีเอ็นเอที่สนใจมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTโดยนำผลลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NCBI BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของดีเอ็นเอเลือกใช้ blastn ซึ่งใช้สำหรับค้นหาข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จากฐานข้อมูล

3.2.7 ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศ และชีวโมเลกุล

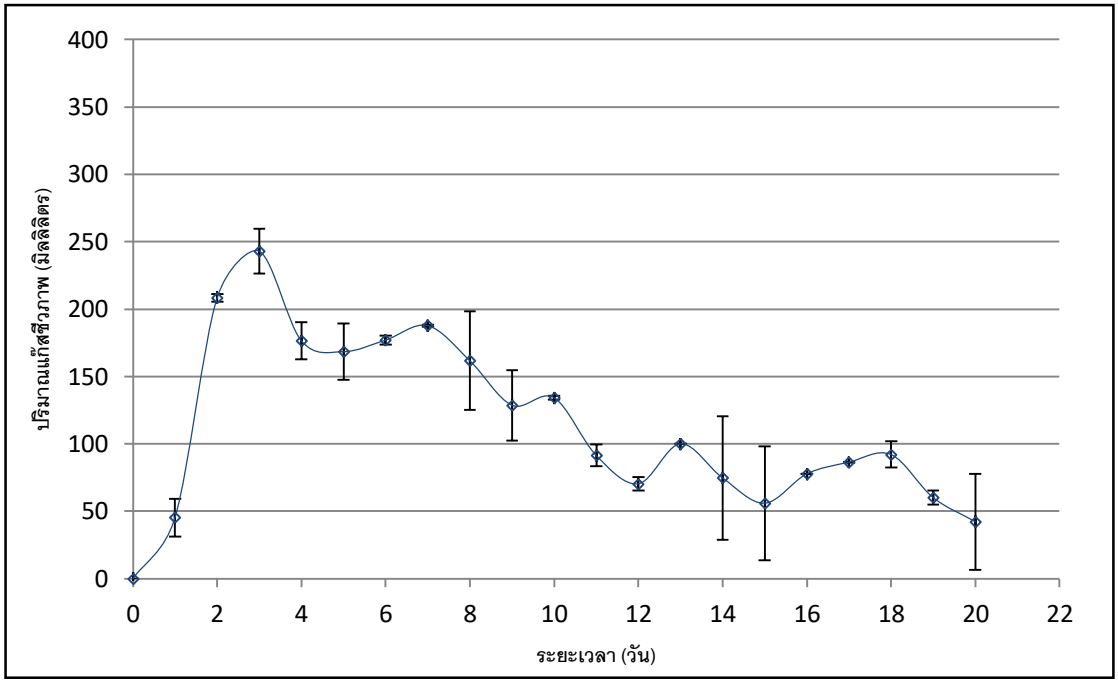
3.2.8 ปรับปรุงสายพันธ์อีโคไลด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม

นำยีนที่สังเคราะห์ได้มาโคลนเข้าเวคเตอร์และนำเข้าเซลล์อีโคไลเจ้าบ้านและศึกษาจลนศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเชื้อปรับปรุงพันธุ์ที่ได้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

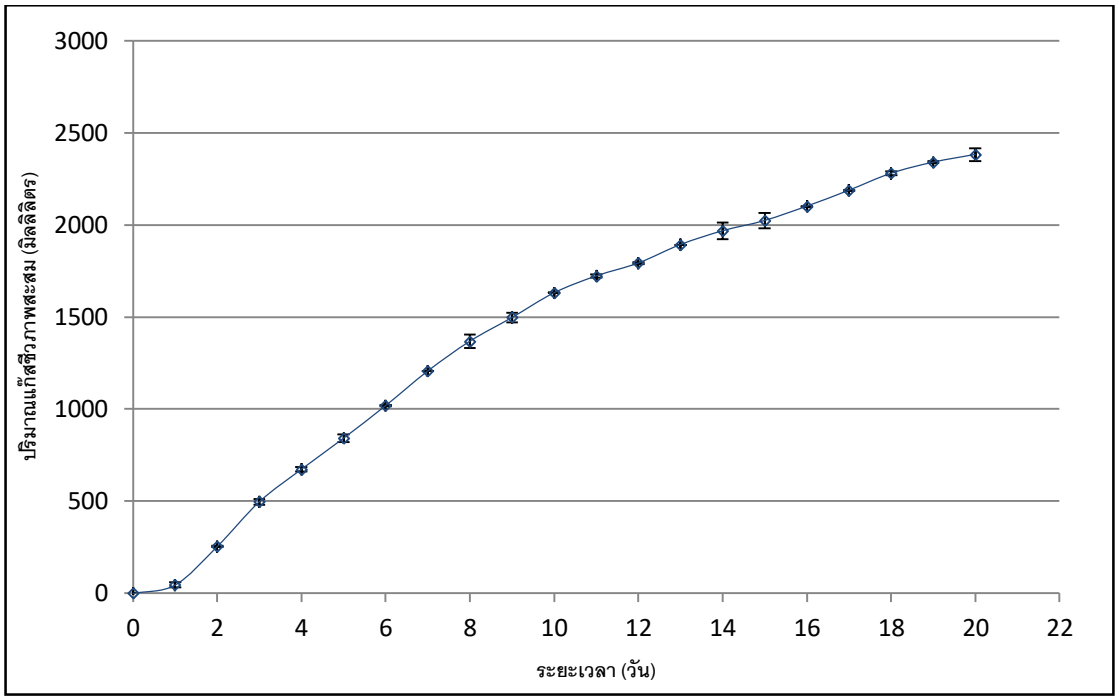
4.1 การผลิตแก๊สชีวภาพ

นำตะกอนเลนบ่อกุ้งทะเลมาทำการหมักเป็นเวลา 20 วัน แทนที่จะเป็น 30 วันเนื่องจากภายใน 20 วัน ปริมาณแก๊สจะคงที่ จากนั้นวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นและวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพที่ได้ หรือการหมักของเสียอินทรีย์ โดยได้ผลดังนี้



ภาพที่ 4.1 ปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ต่อวันจากกระบวนการหมัก

จากภาพที่ 4.1 พบว่า ปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักตะกอนเลนบ่อเลี้ยงกุ้งในสภาวะไร้ออกซิเจน สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก มีปริมาณเท่ากับ 242.98มิลลิลิตร จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ทำให้ได้ปริมาณแก๊สชีวภาพทั้งหมด เท่ากับ 2381.77 มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สชีวภาพสะสมที่เกิดขึ้น

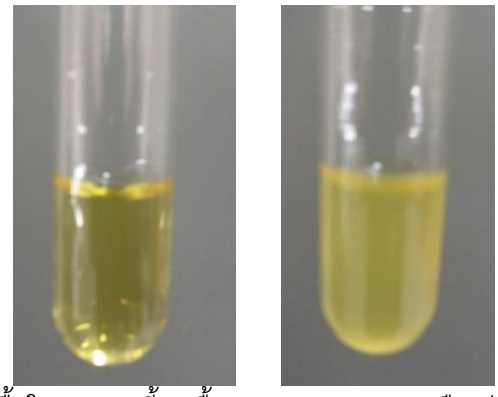
องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพที่ได้จากการหมักตะกอนเลนบ่อเลี้ยงกุ้ง แก๊สชีวภาพที่ได้จากการหมักตะกอนเลนบ่อเลี้ยงกุ้งจะนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบ ด้วยวิธีการ GC (Gas Chromatography) แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าได้มีเทนถึงร้อยละ 67.72 ซึ่งถือว่าค่อนข้างสูง

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบของแก๊สชีวภาพที่ได้จากการหมักตะกอนเลนบ่อเลี้ยงกุ้ง

ครั้งที่	ร้อยละ (%)			
	Nitrogen	Methane	Carbon	Total
1	29.21	64.28	6.52	100.00
2	22.62	69.43	7.94	100.00
3	24.24	68.89	6.87	100.00
4	15.01	76.58	8.41	100.00
5	33.90	59.44	6.66	100.00
Average	24.99	67.72	7.28	100.00

4.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนเลนที่ผ่านการหมัก

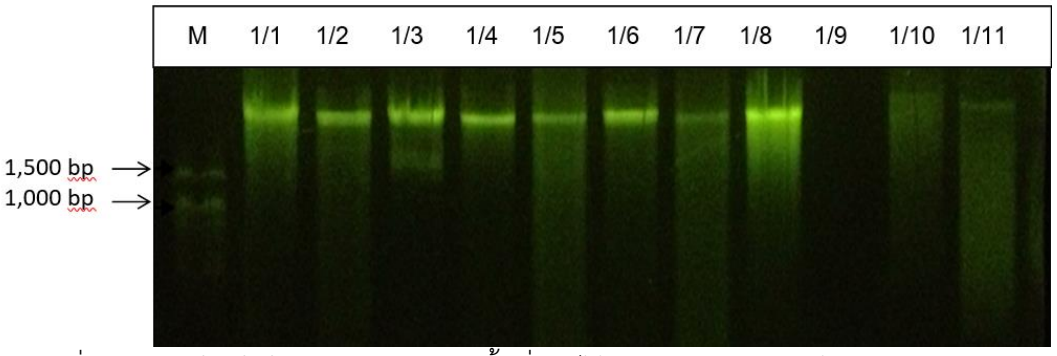
นำตะกอนตัวอย่างมาเจือจางในน้ำเกลือ 0.85% (normal saline) เลี้ยงใน Nutrient Agar พบว่า มีโคโลนีสีขาวนวลเกิดขึ้นกระจายบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่า สีของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่น (ภาพที่ 4.3) นำเชื้อที่ได้ไปทำการสกัด DNA ต่อไป โดยเชื้อตัวเดียวกันนี้จะทำการเก็บ stock เชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในสารละลาย glycerol 20 %



ภาพที่ 4.3 แสดงการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth คือ ก่อนทำการบ่ม (ก) หลังทำการบ่ม (ข)

4.3 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (Chromosomal DNA)

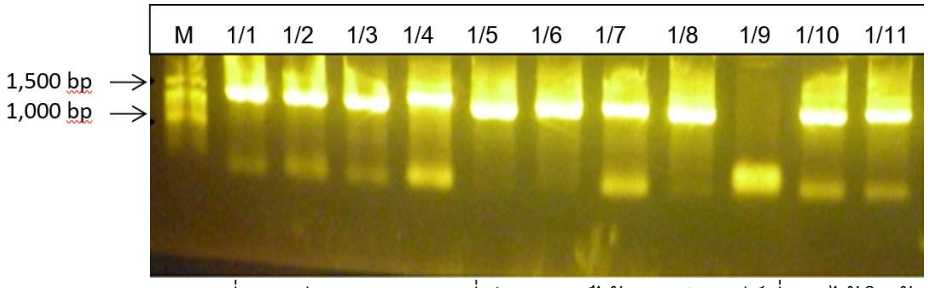
เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit สามารถสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้ 50 ตัว โดยตัวอย่างโครโมโซมอลดีเอที่สกัดได้แสดงดังตัวอย่างในภาพที่ 4.4 โดยโครโมโซมที่ได้ค่อนข้างมีคุณภาพที่ดีพอใช้ เมื่อเทียบจากค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร เทียบกับ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300-3,000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 4.4 แสดงโครโมโซมองดีเอนเอจากเชื้อที่แยกได้จากตะกอนเลนบ่อกุ้งหลังกระบวนการหมักแก๊สชีวภาพ

4.4 การสังเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย 16S rRNA โดยใช้ดีเอ็นเอจาก 4.3 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ไพรเมอร์16S1 กับ 16S2 จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บน Agarose Gel Electrophoresis ที่ความเข้มข้นของ Agaroseร้อยละ 1 แล้วนำมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นมาตรฐาน 100 bp DNA พบว่ายีน 16S rRNA ที่แยกได้จากตะกอนเลนปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp ตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 4.5 จะพบว่าบางตัวอย่างไม่สามารถสังเคราะห์ยีน 16S rRNAได้ เนื่องจากปริมาณของดีเอ็นต้นแบบอาจมีน้อยและคุณภาพไม่ดี ทำให้สามารถสังเคราะห์ยีน 16S rRNAของตัวอย่างตะกอนเลนได้จำนวน 47 ตัว โดยยีนที่สังเคราะห์ได้นี้ได้นำมาทำบริสุทธ์ และสำเร็จจำนวน 24 ตัวอย่าง จากนั้นนำส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไปเพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์



ภาพที่ 4.5 ยีน 16s rRNA ที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ที่แยกได้ ในข้อ 4.2

4.5 การวิเคราะห์ผลลำดับดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอของยีนที่เพิ่มจำนวนได้ ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA sequencing จากนั้นนำผลลำดับดีเอ็นเอที่สนใจมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTโดยนำผลลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NCBI BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของดีเอ็นเอเลือกใช้ blastn ซึ่งใช้สำหรับค้นหาข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จากฐานข้อมูล พบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ ดังตารางที่ 4.2

เมื่อนำมาจำแนกตามหน้าที่ในกระบวนผลิตแก๊สชีวภาพพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้ทหน้าที่ในกระบวนการไฮโดรไลซิส (*Exiguobacterium, Bacillus, Staphylococcus epidermidis*) และอะซิโดเจนนีซีส (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis)* ดังตารางที่ 4.3

ดังตารางที่ 4.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนเลนบ่อกุ้ง

ตัวอย่างที่	ขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ (bp)	ชนิดจุลินทรีย์	% identity
1/7	476	Exiguobacterium indicum	96
1/12	252	Exiguobacterium acetylicum	93
1/15	300	Staphylococcus aureus strain S33	94
1/21	320	Exiguobacterium aestuarii strain TF-16	98
1/31	292	Bacillus velezensis strain FZB42	97
1/39	688	Exiguobacterium indicum strain HHS 31	96
1/44	640	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911	99
1/46	300	Bacillus zhangzhouensis strain MCCC 1A08372	98
2/2	252	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911	92
2/3	476	Exiguobacterium indicum strain HHS 31	97
2/4	288	Exiguobacterium indicum strain K1	98
2/5	212	Exiguobacterium acetylicum strain LCX18	96
2/10	292	Staphylococcus epidermidis strain 197.2	95
2/11	450	Staphylococcus epidermidis strain SJ6	97
2/12	268	Staphylococcus epidermidis strain Unknown2	91
2/13	476	Bacillus aerophilus strain LGR-7	96
2/15	252	Bacillus megaterium strain YKA3	93
2/16	228	Bacillus flexus strain TIL_WAK_24	88
3/23	476	Bacillus amyloliquefaciens strain TYg2-5 Bacillus methylotrophicus strain UAsDu05	95
3/24	225	Exiguobacterium enclense strain NIO-1109	98

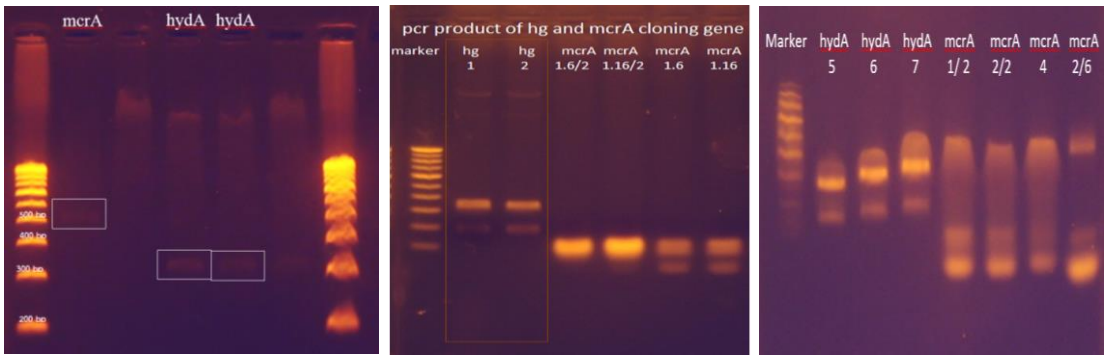
ตารางที่ 4.3 กลุ่มชนิดของแบคทีเรียในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพที่พบในตะกอนเลนบ่อกุ้ง

กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ	ชนิดแบคทีเรีย
กระบวนการไฮโดรไลซิส	*Exiguobacterium* *Bacillus* *Staphylococcus epidermidis*
กระบวนการอะซิโดเจนนีซีส	*Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis*
กระบวนการอะซิโตเจนนีซีส	-
กระบวนการผลิตก๊าซมีเทน	-

4.6 ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนที่ผลิตแก๊สชีวภาพ

จากการศึกษายีนที่มีความสำคัญต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ เช่น ผลิตมีเทน หรือไฮโดรเจน พบว่ายีน mcrA และ hydA มีความสำคัญในกระบวนการผลิตมีเทนและไฮโดรเจนตามลำดับ จึงได้ออกแบบ primer ชุดที่ 1 ในการสังเคราะห์ยีนดังกล่าว ได้ผลดังภาพที่ 4.6 (ก) พบยีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับยีนเป้าหมาย mcrA และ hydA ขนาดประมาณ 500 และ 350 bp แต่เมื่อทำการโคลนนิ่งและส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสพบว่าไม่ใช่ยีนเป้าหมาย จึงทำการเปลี่ยน primer เป็นชุดที่ 2 และ 3 ดังภาพที่ 4.6 (ข) และ (ค) ก็สามารถเพิ่มปริมาณยีนที่มีขนาดเท่ายีนเป้าหมายได้เช่นเดียวกัน แต่หลังจากทำโคลนนิ่งและหาลำดับเบสแล้วกลับได้ antimicrobial protein ของ uncultured bacterium มาแทน

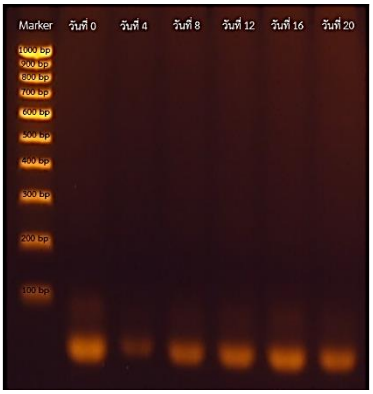
จากผลการทดลองดีเอนเอต้นแบบที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นแบบดีเอนเอรวม (pool DNA) ซึ่งมาจากหลายสปีชีส์รวมกันในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ อาจจะเป็นการยากที่จะได้ยีนเป้าหมายเดี่ยวๆ ที่ต้องการ งานวิจัยจำนวนมากที่ต้องการยีนเดี่ยวนั้นมักใช้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เป็นเชื้อต้นแบบของดีเอนเอ ซึ่งในงานวิจัยนี้เราก็ได้พยายามที่จะแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่มีความสำคัญในการผลิตแก๊สมีเทนและ/หรือไฮโดรเจนแล้วแต่ก็ยังไม่พบเชื้อเป้าหมายเหล่านั้น จึงจำเป็นต้องใช้ดีเอนเอต้นแบบในลักษณะดังกล่าวข้างต้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหลักที่เมื่อทำการโคลนนิ่งและวิเคราะห์ลำดับเบสแล้วไม่ได้ยีนเป้าหมาย ประกอบกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพก็พบแต่มีเทนแต่ไม่พบไฮโดรเจน ซึ่งนี่อาจจะเป็นข้อสรุปได้ว่าเรามีเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนอยู่ในระบบน้อย



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.6 การเพิ่มจำนวนยีน mcrA และ hydA หรือ hg จากดีเอในตะกอนเลยบ่อกุ้ง (ก, ข, ค) PCR product จาก primer ชุดที่ 1, 2 และ 3

นอกจากนี้เรายังปรับแผนการทดลองเพื่อทำการยืนยันว่ามีประชากรจุลินทรีย์ที่ผลิตไฮโดรเจนในระบบหรือไม่จากยีน Hydrogenase (HoxE) ซึ่งเป็นอีกยีนหนึ่งที่สำคัญในการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการสกัด DNA ในระหว่างกระบวนการหมัก จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ Hydrogenase (HoxE) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ผลที่ได้ดังภาพที่ 4.7



HoxE

ภาพที่ 4.7 DNA ของยีน HoxE จากตัวอย่างตะกอนเลนที่ทำการหมัก ณ เวลาต่างๆ

จากภาพที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าไม่พบการแสดงออกของยีน Hydrogenase (HoxE) ที่ทำหน้าที่ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจน เมื่อพิจารณาจากงานวิจัยของ Oliver Schmitz และคณะ, 2545 ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแก๊สไฮโดรเจน โดย hydrogenases gene ของ Cyanobacteria โดยศึกษาจากการโคลนเพียงยีน HoxE ที่มีขนาดเพียง 519 bp พบว่าปริมาณยีน HoxE ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไฮโดรเจน ซึ่งสอดคล้องกับองค์ประกอบของแก๊สชีวภาพที่ไม่พบแก๊สไฮโดรเจน ซึ่งก็ยิ่งทำให้สรุปได้ว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ผลิตไฮโดรเจนที่น้อยหรืออาจจะไม่มีเลย

ในกรณีนี้งานวิจัยใหม่ๆ จะทำการศึกษาและโคลนนิ่งยีนที่สนใจจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผสมกันอยู่โดยใช้เทคนิค metagenomics โดยทำเป็น DNA library ขึ้นมา ซึ่งต้องเลือก vector ที่เหมาะสมสำหรับมาทำโคลนนิ่ง

ของ library ที่สนใจ ซึ่งในงานวิจัยนี้เราใช้ vector ในการโคลนนิ่งเป็น Topo vector ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อการทำ DNA library จึงไม่สามารถโคลนยีนเป้าหมายได้นั่นเอง หรืออาจจะเป็นเพราะในตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอนั่นก็คือตะกอนเลนบ่อกุ้งมีสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งหรือทำลายดีเอนเอเป้าหมายที่สนใจทำให้ขัดขวางการโคลนนิ่งได้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนเลนบ่อกุ้งจากฟาร์มกุ้งในภาคตะวันออกและแหล่งของจุลชีพในการผลิตไบโอแก๊สเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อจุลชีพในถังหมักพบว่าสามารถผลิตแก๊สชีวภาพที่มีมีเทนเป็นองค์ประกอบ 68% ซึ่งค่อนข้างสูง จากนั้นทำการแยกเชื้อที่สำคัญในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพพบว่าได้เชื้อที่มีความสำคัญในกระบวนการกระบวนการไฮโดรไลซิสและกระบวนการอะซิโดเจนนีซีส โดยเชื้อหลักแยกได้ คือ *Exiguobacterium Bacillus, Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* และจากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรวมที่โตในถังหมักเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนเป้าหมายนั่น คือ mcrA, hydA และ HoxE ที่มีความสำคัญในการผลิตมีเทนและไฮโดรเจน แต่เมื่อทำการโคลนนิ่งและหาลำดับเบสแล้วจำนวนสามรอบการทดลองใช้เวลาในการปรับสภาวะและ primer รวมถึงเพิ่มชนิดของยีนเป้าหมาย มาแล้วสองปีกว่า ก็ยังไม่สามารถผลิตเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณสมบัติในการผลิตมีเทนหรือไฮโดรเจนได้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะ ดีเอนเอต้นแบบที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นแบบดีเอนเอรวม (pool DNA) ซึ่งมาจากหลายสปีชีส์รวมกันในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ อาจจะเป็นการยากที่จะได้ยีนเป้าหมายเดี่ยวๆ หรือ/และ ในระบบมีเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนอยู่ในระบบน้อยจึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายได้ หรือ/และ ตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอนั่นก็คือตะกอนเลนบ่อกุ้งมีสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งหรือทำลายดีเอนเอเป้าหมายที่สนใจทำให้ขัดขวางการโคลนนิ่งได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. อาจจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นในการทำโคลนนิ่งเพื่อให้ได้ยีนเป้าหมาย เช่น การสร้าง metagenomics library โดยเลือกใช้ vector ที่เหมาะในการทำ library มากกว่า Topo vector

2. ควรเลือกวิธีในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่จำเพาะเจาะจงกว่านี้เพื่อให้ได้เชื้อที่มียีนเป้าหมายที่สนใจสำหรับทำโคลนนิ่ง

3. เปลี่ยนแหล่งของสารสารตั้งต้น หรือ/และ หัวเชื้อ สำหรับผลิตแก๊สชีวภาพ เพื่อให้ได้กลุ่มประชากรหรือจุลินทรีย์ที่มียีนเป้าหมายที่สนใจ

5.3 ผลผลิต

ผลงานตีพิมพ์ที่เกิดจากโครงการวิจัย : เป็นส่วนหนึ่งในงานดังต่อไปนี้ แต่ไม่ได้ระบุแหล่งทุนหรือสัญญาทุนที่ชัดเจนลงไป

1. ชื่อเรื่อง : Effect of light and microorganism on biogas production from shrimp pond sediment using *mcrA* AND *16S rRNA* gene expression profile
   วารสารงานประชุม : The 7th ITIChE 2017, Bangkok, Thailand, October 18-20, 2017

Impact Factor : -

สถานะการตีพิมพ์ : Published

2. ชื่อเรื่อง : อิทธิพลของแสงและจุลชีพต่อกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนเลนบ่อกุ้งโดยกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน และการแสดงออกของยีน mcrA และ HoxE ต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ (โครงงานทาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต)
   สถานะการตีพิมพ์ : Published

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2559A10802111 สัญญาเลขที่ 152/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพสำหรับปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.ญาณิศา ละอองอุทัย

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง กันยายน พ.ศ. 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี 9 เดือน ระหว่าง ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง กันยายน พ.ศ. 2562

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	212,500	บาท	เมื่อ สิงหาคม	พ.ศ. 2559
งวดที่ 2 (40%)	170,000	บาท	เมื่อ กันยายน	พ.ศ. 2560
งวดที่ 3 (10%)	42,500	บาท	เมื่อ กันยายน	พ.ศ. 2562 (คาดว่าจะได้รับ)
รวม	**425,000**	**บาท**		

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทน เช่น ค่าอาหารทำการนอกเวลา ค่าตอบแทน ผู้ปฏิบัติงานให้ราชการ ค่าเบี้ยประชุมกรรมการ ฯลฯ	15,000	15,000	0
- ค่าตอบแทนคณะผู้วิจัย	30,000	30,000	0
2. ค่าจ้าง	180,000	180,000	0
3. ค่าวัสดุ	60,000	62,951.67	-2,951.67
4. ค่าใช้สอย	95,000	92,157.99	2,842.01
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย)			
- ค่าสาธารณูปโภค	2,500	2,500	0
- ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	42,500	42,500	0
รวม	**425,000**	**425,109.66**	**-109.66**

( )

ผศ.ดร.ญาณิศา ละอองอุทัย

เอกสารอ้างอิง

[1] เกื้อกูล บุญยี่, (2552) การผลิตก๊าซชีวภาพจากกระบวนการหมักแบบไร้อากาศโดยใช้น้ำเสีย ของโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังแปรรูป วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2] คู่มือการปฏิบัตงานเกี่ยวกับการออกแบบ การผลิต การควบคุมคุณภาพ และการใช้ก๊าซชีวภาพ (Biogas) สำหรับโรงงานอุตสาหกรรม, (2553) สำนักเทคโนโลยีความปลอดภัย กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม

[3] สุดารัตน์ ภักดี, (2551) การผลิตก๊าซชีวภาพจากกากถั่วและน้ำเสียจากโรงงานวุ้นเส้นโดยกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[4] Edward F. DeLong. (2005) Environmental genomics of deep-sea archaeal methanotrophs. Nature Reviews Microbiology 3, 459-469

[5] Madhaiyan, M.,Poonguzhali, S., Wo Kwon, S., and Min Sa, T., (2010), Bacillus methylotrophicus sp. Nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil.

[6] Percival Zhang, Y.-H.; Evans, Barbara R.; Mielenz, Jonathan R.; Hopkins, Robert C.; Adams, Michael W.W. (2007). "High-Yield Hydrogen Production from Starch and Water by a Synthetic Enzymatic Pathway". In Melis, Anastasios. PLoS ONE 2 (5): e456.

[7] Percival Zhang, Y.-H. (2010). "Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: Challenges and opportunities". Biotechnology and Bioengineering 105(4): 663–77.

[8] Percival Zhang, Y-H; Sun, Jibin; Zhong, Jian-Jiang (2010). "Biofuel production by in vitro synthetic enzymatic pathway biotransformation". Current Opinion in Biotechnology 21 (5): 663–9.

[9] Toshinari Maeda, Viviana Sanchez-Torres, and Thomas K. Wood. (2012) Hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* Strains. Microbial Biotechnology 5(2), 214–225

[10] Ye, Xinhao; Wang, Yiran; Hopkins, Robert C.; Adams, Michael W. W.; Evans, Barbara R.; Mielenz, Jonathan R.; Percival Zhang, Y.-H. (2009). "Spontaneous High-Yield Production of Hydrogen from Cellulosic Materials and Water Catalyzed by Enzyme Cocktails".ChemSusChem 2 (2): 149–52

[11] Percival Zhang, Y.-H. (2009). "A sweet out-of-the-box solution to the hydrogen economy: Is the sugar-powered car science fiction?". Energy & Environmental Science 2 (3): 272–82

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์ที่เกิดจากโครงการวิจัย : เป็นส่วนหนึ่งในงานดังต่อไปนี้ แต่ไม่ได้ระบุแหล่งทุนหรือสัญญาทุนที่ชัดเจนลงไป

1. ชื่อเรื่อง : Effect of light and microorganism on biogas production from shrimp pond sediment using *mcrA* AND *16S rRNA* gene expression profile
   วารสารงานประชุม : The 7th ITIChE 2017, Bangkok, Thailand, October 18-20, 2017

Impact Factor : -

สถานะการตีพิมพ์ : Published

2. ชื่อเรื่อง : อิทธิพลของแสงและจุลชีพต่อกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพจากตะกอนเลนบ่อกุ้งโดยกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน และการแสดงออกของยีน mcrA และ HoxE ต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ (โครงงานทาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต)
   สถานะการตีพิมพ์ : Published