

วิทยาศาสตร์

THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

ปีที่ 28 ฉบับที่ 1 ม.ค. - มี.ค. 43

010010001101000

00100010100100100

01010010001



0011 1101



วารสาร

ISSN 0125-2364

วิทยาศาสตร์ปู.

THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิชาการใน สาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานด้านการวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้ และแนวความคิดทางวิชาการระหว่างอาจารย์ นักศึกษาและผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก

ปีละ 4 ฉบับ

ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม

ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน

ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน

ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม

คำบารุง ปีละ 75 บาท ข่ายปลีก เล่มละ 20 บาท

การบอกรับเป็นสมาชิก

แจ้งความจำนงค์เป็นจดหมาย หรือกรอกใบสมัครเป็นสมาชิก พร้อมส่งคำบารุงเป็นธนาคติ หรือเช็คไปรษณีย์ในนามของนางบุญคุ้ม เหลือล้น ฝ่ายจัดการ ส่งจ่าย ป.ท.มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ

บรรณาธิการ

ศักดิ์สิทธิ์

จันทร์ไทย

บรรณาธิการผู้ช่วย

อัจฉรา

ศิริมั่งคะลา

กองบรรณาธิการ

เฉลิม

เรืองวิริยะชัย

บำรุง

สมสวัสดิ์

วิทยา

อมรกิจบำรุง

สุพร

นุชดำรงค์

ประนอม

จันทร์ไธทย

นฤมล

แสงประดับ

สุวรรณา

เนียมสนิท

เพ็ญประภา

เพชรบุรณิน

อุพจน์

ไวทย์ยางกูร

วิจารณ์

สดศิริ

วิชุดา

ไชยทิวามงคล

พฤษดี

ศิริแสงตระกูล

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิเลน

ดินนรเศรษฐ์

ทรงเวทย์

เบ้าชัย

ฝ่ายเหรียญกษาปณ์

บุญคุ้ม

เหลือล้น

ฝ่ายจัดการและ

ทัศนีย์

จิตตะกวี

เลขานุการ

สมศักดิ์

อุ้นจันท์

สุคนธ์

กลินผกา

บทความและงานวิจัย

ได้รับการกลั่นกรอง

จากผู้ทรงคุณวุฒิ

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ



วิทย์ศาสตร์
THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

ISSN 0125-2364

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University.

Objectives

1. To promote and propagate knowledge in all fields of science.
2. To publish results from research and studies by academic staff and students.
3. To be a medium for the exchange of knowledge and ideas among staff, students and those interested from both inside and outside the institute.

Publishing terms

four issues per annual volume
Issue no. 1 January - March
Issue no. 2 April - June
Issue no. 3 July - September
Issue no. 4 October - December

Subscription rate

75 baht per annum. Single issue price 20 Baht.

Membership

Membership request can be made by letter or by completing the membership form, with the fee paid in the form of a postal order or postal cheque sent to Mrs. Boonkoom Lualon, Managing Committee, Khon Kaen University Post Office, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

Advisory Committee

Dean, Faculty of Science
Associate Dean for Academic affairs

Editor

Saksit Chanthai

Associate Editor

Atchara Sirimungkala

Editorial Board

Chalerm Ruangviriyachai
Bamrung Somsasdi
Vittaya Amornkitbamrung
Suporn Nuchadomrong
Pranom Chantaranothai
Narumon Sangpradub
Suwanna Niamsanit
Penprapa Phetcharaburanin
Supot Waitayangkoon
Wijarn Sodsiri
Wichuda Chaisiwamongkol
Pusadee Seresangtakul

Artist

Kilen Tinnoraset
Songwate Bousechai

Treasurer

Boonkoom Lualon

Managing Staff and Secretary

Tassanee Jittakhawee
Somsak Unjantee
Sukhon Klinpaka

**The articles and research
publications have been reviewed
by qualified readers**

The views and opinions expressed in this journal are those of the authors, and do not necessarily reflect the views and opinions of the editorial board.

บรรณาธิการ *แถลง*

เรียน ท่านสมาชิกวารสาร ฯ และท่านผู้อ่านที่รัก

วารสารวิทยาศาสตร์ มข. ปีที่ 28 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม - มีนาคม 2543 ขอเสนอบทความวิชาการและผลงานวิจัยเด่น ๆ ในฉบับหลายเรื่อง โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น ใช้ *Thiobacillus ferrooxidans* กำจัดกำมะถัน ใช้ Actinomycetes ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ใช้ Lactic acid bacteria ผลิตสารอินทรีย์เพื่อต่อต้านจุลชีพอื่น หรือใช้เร่งกระบวนการหมักชีเลจ มีงานวิเคราะห์มลพิษจากกองขยะของทมวิจัยมาเลเซีย และงานวิจัยทางด้านไฟเบอร์ออฟติก และการศึกษาสมบัติของ CdS₂ Thin films เราหวังว่าเนื้อหาในฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อสาธารณชนเช่นเคย และขออภัยในความล่าช้าไว้ ณ โอกาสนี้ แล้วพบกันใหม่ในฉบับหน้าเร็ว ๆ นี้

สวัสดีครับ

บรรณาธิการ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วารสาร

วิทยาศาสตร์ชุมชน

THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

ปีที่ 28 ฉบับที่ 1

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยใช้
เชื้อจุลินทรีย์ Microbial Coal Desulfurization
รัตนภรณ์ ดีสิงห์..... 5

งานวิจัย

- การแยกและการคัดเลือกรากแคดมิอัมจากดิน
ที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย
บางชนิด
ธีรศักดิ์ สัมดี
ชนิษฐา ตั้งชีวจริญ
เดือนใจ ทางกลาง..... 12

- ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์
ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิต
โดยแลคติกแอซิด แบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก
ปาริชาติ พุ่มขจร
พงศศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ
บุการัตน์ เครือวงษา..... 22



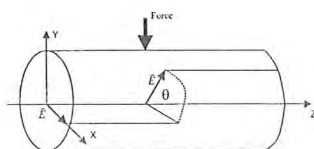
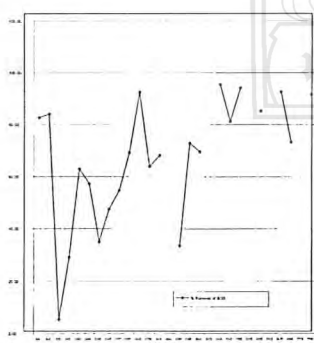
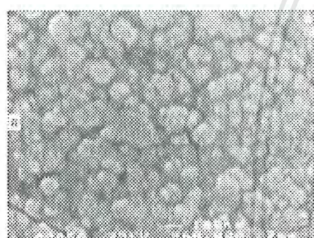
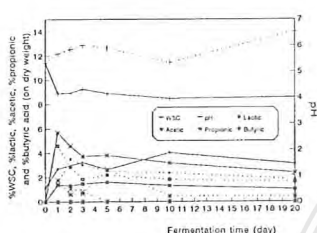
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วารสาร

วิทยาศาสตร์ชุมชน

THE JOURNAL OF SCIENCE KHONKAEN UNIVERSITY

ปีที่ 28 ฉบับที่ 1



- การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์พื้นเมือง เพื่อใช้เป็นสารเร่งทางชีวภาพสำหรับการหมักไชเลง

สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ

ทองเลียน ขวัญ

สุรัชย์ แซ่เล่า

ธีรวิทย์ ทับทอง

รศ.ดร. นิตกรทอง

อำนาจ เจริญรัตน์..... 31

- Properties of Cadmium Sulfide Thin Films Prepared by Chemical Bath Deposition Method

Thititai Gaewdang

Ngamnit Gaewdang..... 44

- Analysis of Leachate Characteristics of Sanitary Landfill in Tropic Condition - A Case Study of the Air Hitam Sanitary Landfill, Puchong, Selangor

Md. Mizanur Rahman

Mohd Nasir Hassan

Mohamed Daud

Mohd. Zohadie Bardaie

Zamri Abdul Rahman

Azni Idris

Mohamed Noor..... 53

- Bi-refrigent Fibers Polarization Mode Coupling Control for Optical Switching

P.P. Yupapin..... 62

การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยเชื้อจุลินทรีย์ Microbial Coal Desulfurization

รัตนภรณ์ สีสึงห์*

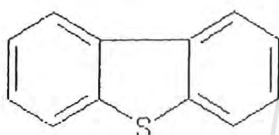
ปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากถ่านหินได้ขยายวงกว้างออกไปและมีแนวโน้มในการนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงมากขึ้น เนื่องจากถ่านหินมีปริมาณสำรองถึงร้อยละ 75 ของแหล่งพลังงานทั่วโลก ถ่านหินในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นถ่านหินลิกไนต์ซึ่งมีปริมาณสำรองประมาณ 1,500 ล้านเมตริกตัน โดยนำไปผลิตกระแสไฟฟ้าถึงร้อยละ 83.9 ของปริมาณการใช้ถ่านหินทั้งหมด ปัญหาในการใช้ถ่านหินเป็นแหล่งพลังงานได้แก่ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องมาจากกำมะถันที่เป็นองค์ประกอบของถ่านหิน กล่าวคือ เมื่อมีการนำถ่านหินมาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยการเผาไหม้โดยตรงในอากาศจะก่อให้เกิดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfuroxide : SO_x) เกือบทั้งหมดเป็นก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfurdioxide : SO_2) ซึ่งเป็นก๊าซพิษไม่มีสี ไม่ติดไฟ เมื่ออยู่ในบรรยากาศจะถูกออกซิไดซ์ด้วยแสงได้เป็นกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) มีสภาพเป็นละอองลอย (Aerosol) ทำให้ทัศนวิสัยในการมองเห็นเสียไป และเมื่อไปกระทบกับมวลอากาศที่เย็นกว่าจะกลั่นตัวเป็นฝนกรด (Acid Rain) ก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับพื้นที่เกษตรกรรมรวมถึงการกัดกร่อนของโลหะ นอกจากนี้ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อสิ่งก่อสร้างที่ทำจากหินปูนหรือหินอ่อนโดยทำให้โครงสร้างเกิดรอยร้าวและสีกร่อนได้ ในปี 2539 เฉพาะโรงไฟฟ้าแม่เมาะปล่อยก๊าซ

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ออกมาถึง 5 แสนเมตริกตันต่อปีเมื่อใช้ถ่านหินที่มีปริมาณกำมะถันเพียงร้อยละ 2 ปัญหามลพิษจากก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น เนื่องจากการผลิตและความต้องการใช้ถ่านหินในประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี

กำมะถันในถ่านหิน

กำมะถันจัดว่าเป็นสารปนเปื้อนในถ่านหิน มีปริมาณตั้งแต่ร้อยละ 0.19-10 สำหรับถ่านหินลิกไนต์ของไทยมีปริมาณกำมะถันอยู่ในช่วงร้อยละ 1-5 สารประกอบกำมะถันในถ่านหินอยู่ในหลายรูปแบบ ที่สำคัญคือ กำมะถันอินทรีย์ในรูปของไพไรต์ (pyritic sulfur : FeS_2) และกำมะถันอินทรีย์ซึ่งเป็นกำมะถันที่ยึดอยู่กับธาตุอื่นด้วยพันธะเคมีและเชื่อมอยู่ระหว่างโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งเป็นโครงสร้างของถ่านหิน โดยอยู่ในรูปของสารประกอบอะโรมาติกและอะลิฟาติก ตัวอย่างของกำมะถันอินทรีย์ เช่น Thiophenols, Thioethers และ Dibenzothiophene (DBT) โดย DBT เป็นกำมะถันอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในถ่านหิน โครงสร้างของกำมะถันในถ่านหินดังรูปที่ 1

* อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ไพไรต์ : FeS_2 

Dibenzothiophene

รูปที่ 1 ไพไรต์และกำมะถันอินทรีย์ที่พบในถ่านหิน

การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหิน

การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินไม่ว่าวิธีใดก็ตามจะต้องไม่ลดค่าความร้อนของถ่านหินลง การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินมีทั้งแบบก่อนการนำถ่านหินไปเผาไหม้ (pre-combustion) และหลังกระบวนการเผาไหม้ (post-combustion) ซึ่ง post-combustion เป็นการดักจับก๊าซซัลเฟอร์ออกไซด์หลังกระบวนการเผาไหม้ถ่านหินด้วยระบบ Flue gas desulfurization ในขณะที่ pre-combustion อาจใช้วิธีทางเคมีทางกายภาพหรือทางชีวภาพ วิธีทางกายภาพสามารถกำจัดไพไรต์ได้ร้อยละ 30-90 ของไพไรต์ที่อยู่ใน mineral matter ของถ่านหินแต่ไม่สามารถกำจัดไพไรต์ที่แทรกกระจายอยู่ marceral ของถ่านหินและกำมะถันอินทรีย์ได้ การใช้สารเคมีใช้ได้ดีกับไพไรต์แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการกำจัดกำมะถันอินทรีย์ ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้กับการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยใช้จุลินทรีย์สลายกำมะถันออกจากถ่านหิน วิธีนี้

มีประสิทธิภาพสูงสามารถกำจัดได้ทั้งไพไรต์และกำมะถันอินทรีย์ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ อีกค่าใช้จ่ายในกระบวนการต่ำกว่าวิธีอื่นๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินและการกำจัดซัลเฟอร์ออกไซด์

Process	Approximate \$/ton coal
Pre-combustion	
Microbiological	12
Battle hydrothermal	20
Kenocotte Leaching	20
OTISCA-deep cleaning	48-56
Post-combustion	
Flue Gas desulfurization	16

การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยเชื้อจุลินทรีย์

การใช้วิธีทางชีวภาพในการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินเป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเรียกกระบวนการดังกล่าวว่า ไบโอะลิชซิง (Bioleaching) การศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินมีมานานเกือบครึ่งศตวรรษโดยในปี ค.ศ. 1961 Siverman และคณะ เสนอกระบวนการกำจัดไพไรต์โดยใช้เชื้อ *Thiobacillus ferrooxidans* ในการออกซิไดซ์ไพไรต์ หลังจากนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นการคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดกำมะถัน โดยศึกษาทั้งในเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียทนกรดในตระกูล *Thiobacillus* และแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงในตระกูล *Sulfolobus* จากรายงานต่างๆ กล่าวว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ตระกูลนี้มีศักยภาพในการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหิน

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดกำมะถันจากถ่านหิน

1. *Thiobacillus ferrooxidans* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ดังรูปที่ 2 ถูกเลือกมาใช้ในการวิจัยมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น การดำรงชีวิตแบบ Chemoautotrophs ทำให้กระบวนการกำจัดกำมะถันไม่ต้องการสภาพปลอดเชื้อ เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 23-35 องศาเซลเซียส ซึ่งเอื้อต่อระบบการกำจัดกำมะถันแบบต่อเนื่อง



รูปที่ 2 จุลินทรีย์ *Thiobacillus ferrooxidans*

2. *Leptospirillum ferrooxidans* แยกได้ครั้งแรกใน ค.ศ. 1972 โดย Markosyan เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถออกซิโดซ์เหล็กเฟอร์รัสได้ที่ระดับ pH < 1.0

3. *Thiobacillus thiooxidans* ไม่สามารถออกซิโดซ์เหล็กเฟอร์รัสและโลหะซัลไฟด์ แต่สามารถออกซิโดซ์ธาตุซัลเฟอร์ได้ดี ทำให้เกิดกรดซัลฟูริกเป็นผลให้ pH ของระบบต่ำลงสนับสนุนการเจริญและการออกซิโดซ์โลหะซัลไฟด์ของของจุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบกรด

4. *Thiobacillus acidophilus* เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งแบบ Chemoautotrophs และ Heterotrophs สามารถออกซิโดซ์ธาตุซัลเฟอร์ น้ำตาล

กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ที่ pH 3.0-3.5

5. *Sulfolobus thermosulfidooxidans* เป็น heterotrophic bacteria ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถออกซิโดซ์ธาตุซัลเฟอร์ โลหะซัลไฟด์และเหล็กเฟอร์รัส เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 20-60 องศาเซลเซียส ที่ pH 1.9-3.0

6. *Sulfolobus acidocaldarius* สามารถออกซิโดซ์ธาตุซัลเฟอร์ ไฟไรต์ เหล็กเฟอร์รัสและสารกำมะถันอินทรีย์ได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส

7. *Pseudomonas putida* สามารถออกซิโดซ์กำมะถันอินทรีย์ได้โดยเฉพาะการออกซิโดซ์สารประกอบ DBT ที่เป็นองค์ประกอบของกำมะถันอินทรีย์ในถ่านหิน

8. *Micrococcus* sp. IGTS8 สามารถออกซิโดซ์กำมะถันอินทรีย์และใช้กำมะถันที่ได้จากการออกซิโดซ์เป็นแหล่งของธาตุกำมะถันเพียงแหล่งเดียวในการเจริญเติบโต

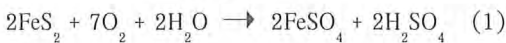
กลไกการกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินด้วยจุลินทรีย์

การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินด้วยจุลินทรีย์แบ่งเป็น 2 ประเภทตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังนี้

1. การกำจัดกำมะถันอนินทรีย์

การกำจัดกำมะถันอนินทรีย์หรือไฟไรต์โดยจุลินทรีย์สามารถแบ่งเป็น 2 กลไกด้วยกันคือ

1.1 กลไกทางตรง (Direct mechanism) : กลไกนี้อาศัยจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันไฟไรต์ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ผลจากการออกซิเดชันไฟไรต์ ซึ่งเดิมอยู่ในรูปสารประกอบซัลไฟด์ที่ไม่ละลายน้ำ เปลี่ยนไปอยู่ในรูปซัลเฟตซึ่งละลายน้ำหรือสารละลายกรดได้ดังปฏิกิริยาที่ (1)

T. ferrooxidans

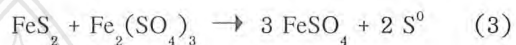
ผลจากการออกซิไดซ์ไพไรต์เกิดเหล็กเฟอร์รัส (FeSO_4) และกรดซัลฟูริก เหล็กเฟอร์รัสที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์ได้เป็นเฟอร์ริกซัลเฟต ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) ดังปฏิกิริยาที่ (2)

T. ferrooxidans

การออกซิไดซ์ไพไรต์โดยอาศัยกลไกโดยตรงต้องอาศัยการสัมผัสโดยตรงระหว่างจุลินทรีย์กับไพไรต์ มีรายงานว่าจุลินทรีย์ *T. ferrooxidans* สร้างสารเมือกขึ้นเพื่อยึดเกาะกับผิวของไพไรต์ การออกซิไดซ์เกิดขึ้นที่บริเวณผนังเซลล์ของจุลินทรีย์โดย rusticyanin ซึ่งเป็นสารโปรตีนสีฟ้าที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบอยู่ในชั้นของ periplasmic space ของผนังเซลล์จุลินทรีย์มารับอิเล็กตรอนจากเหล็กเฟอร์รัสและไพไรต์ แล้วส่งผ่านอิเล็กตรอนไปให้แก่ cytochrome-c oxidase และ cytochrome-a1 ตามลำดับ และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย จุลินทรีย์ได้พลังงานจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนและเก็บไว้ในรูปของสารพลังงานสูง คือ ATP ซึ่งจุลินทรีย์ใช้พลังงาน ATP นี้ไปในการเจริญเติบโต จุลินทรีย์อื่นๆ ที่ออกซิไดซ์เหล็กเฟอร์รัสได้ก็อาศัยกลไกของปฏิกิริยาทำนองเดียวกันนี้ แตกต่างที่เอนไซม์ที่ใช้ เช่น *Sulfolobus* sp. ใช้ cytochrome-b แทน cytochrome-c oxidase และใช้ cytochrome-aa3 แทน cytochrome-a1 อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าอื่นๆ กล่าวว่าถึงแม้จะไม่มีเมือกที่ผิวของไพไรต์โดยตรงก็ยังพบว่ามีการออกซิไดซ์ไพไรต์เกิดขึ้นได้

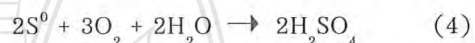
1.2 กลไกทางอ้อม (Indirect mechanism) : การออกซิไดซ์ไพไรต์โดยกลไกทางอ้อมนี้

เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีโดยสารละลายเหล็กเฟอร์ริกซัลเฟตที่เกิดจากการออกซิไดซ์เฟอร์รัสซัลเฟตทำหน้าที่เป็นตัวออกซิแดนท์ (oxidants) ในการออกซิไดซ์ไพไรต์เป็นเฟอร์รัสซัลเฟตและธาตุซัลเฟอร์ ดังปฏิกิริยา (3)

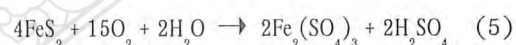


ธาตุซัลเฟอร์หรือกำมะถัน (S^0) ที่เกิดขึ้น สามารถถูกออกซิไดซ์ต่อโดยจุลินทรีย์ *T. ferrooxidans* และ *T. thiooxidans* เกิดเป็นกรดซัลฟูริกดังปฏิกิริยาที่ (4) ทำให้สารละลายมีความเป็นกรดสูงขึ้น ซึ่งจะส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์และการออกซิไดซ์เหล็กเฟอร์รัส

sulfur oxidizing enzyme

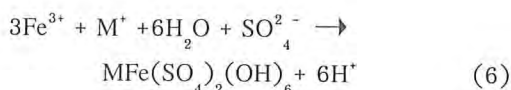


กระบวนการออกซิไดซ์ไพไรต์สามารถดำเนินไปอย่างต่อเนื่องจนกว่าไพไรต์จะถูกออกซิไดซ์อย่างสมบูรณ์หรือเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์หรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยปฏิกิริยารวมของการออกซิไดซ์ไพไรต์ ดังปฏิกิริยาที่ (5)



นอกจากนี้เฟอร์ริกไอออนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนและน้ำกลายเป็นสารประกอบ ferric hydroxy ซึ่งจะเพิ่มความเป็นกรดอีกด้วย และถ้ามีแคโทดอน (M^+) เช่น ไฮโดรเจนหรือโปแตสเซียมปรากฏอยู่จะเกิดตะกอนของ Iron hydroxysulfate ที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเรียกว่า Jarosite ดังปฏิกิริยาที่ (6)

FF



ตะกอนเหล่านี้อาจปกคลุมผิวถ่านหินหรือผลึกไพไรต์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสัมผัสกับไพไรต์และยังขัดขวางการถ่ายเทมวลสารของอาหารและออกซิเจน ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไพไรต์ลดลงได้

2. การกำจัดกำมะถันอินทรีย์

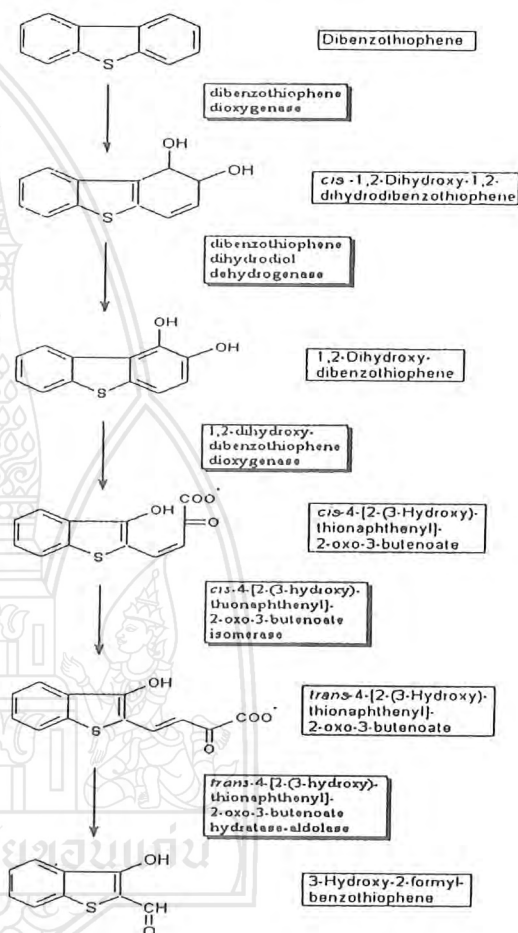
กำมะถันอินทรีย์รวมตัวเป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลถ่านหินจึงยากต่อการกำจัดออกจากถ่านหิน กำมะถันอินทรีย์มีหลายชนิดแต่ dibenzothiophene (DBT) มักถูกใช้เป็นตัวแทนของกำมะถันอินทรีย์ในงานวิจัย เนื่องจาก DBT พบโดยทั่วไปในถ่านหินอีกทั้งโมเลกุลไม่ซับซ้อน หลุดจาก coal matrix โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ร้อนได้ง่าย และยังมีปริมาณสูง มีความพยายามในการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดกำมะถันอินทรีย์จากเชื้อเพลิงเป็นเวลานานกว่า 50 ปี โดยใช้ DBT ในการแยกจุลินทรีย์จากน้ำมันดิบได้แบคทีเรีย *Pseudomonas janii* และ *Pseudomonas abikonensis* ซึ่งสามารถเปลี่ยน DBT ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้

การศึกษาวิธเมตาบอลิซึมของ DBT พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ใช้ DBT ได้ 2 วิธีดังนี้ คือ

2.1 Carbon destructive pathway หรือ

Kodama's pathway ค้นพบโดย Kodama และคณะ ดังรูปที่ 3 โดยวิธีนี้เป็นการสลาย DBT โดยพันธะระหว่าง C-C ในวงเบนซีนแตกตัวออก ทำให้ DBT ที่ไม่ละลายน้ำสามารถละลายน้ำได้ ปฏิกิริยาเริ่มต้นเมื่อ DBT ถูกออกซิไดซ์เป็นอนุพันธ์ของ dihydroxy-dibenzothiophene ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบ dihydroxy-dibenzothiophene ที่ละลายน้ำ ต่อมาเกิดสาร intermediate สีส้มคือ 4-[2-(3-hydroxyl)-thionaphthyl]-2-oxo-3-butenic acid และถ้าอยู่ในรูป

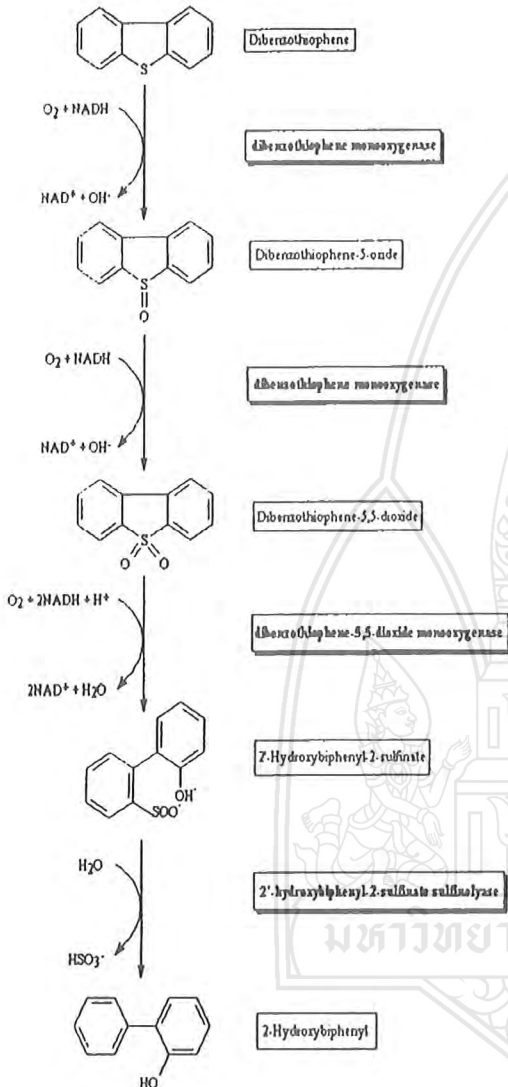
trans-4-[2-(3-hydroxyl)-thionaphthyl]-2-oxo-3-butenic acid จะเป็นสีแดงและจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบสีเหลืองของ 3-hydroxy-2-formyl-benzothiophene อย่างรวดเร็ว



รูปที่ 3 วิธเมตาบอลิซึมของ DBT แบบ Carbon destructive pathway

2.2 4S (sulfoxide/sulfone/sulfonate/sulfate) pathway บางครั้งเรียก Sulfur specific metabolic pathway โดยวิธีนี้เป็นการสลายพันธะระหว่าง C-S ในโมเลกุลของ DBT โดยเกิดปฏิกิริยา Sulfoxidation 2 ครั้ง ได้ DBT-5-dioxide และแตกตัวได้ Dibenzyl-5-sulfonic acid จากนั้น

ซัลเฟตจะถูกปล่อยออกมา และได้ hydroxydibenzyl เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 วิธีเมตาบอลิซึมของ DBT แบบ 4S pathway

นอกจากนี้ Romine และคณะ ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ DBT โดยจุลินทรีย์ *Micrococcus* sp. IGTS8 ผ่าน 4S Pathway ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวใช้กำมะถันที่มีอยู่ใน DBT เป็นแหล่งซัลเฟอร์เพียงแหล่งเดียวในการเจริญจึงเรียกวิธีการย่อยสลาย DBT โดย *Micrococcus* sp. IGTS8 อีก

ชื่อหนึ่งว่า Sulfur assimilation pathway ผลจากการย่อยสลาย DBT ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 2-hydroxybiphenyl (HBP)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการกำจัดกำมะถันอินทรีย์ส่วนใหญ่เติบโตในสิ่งแวดล้อมที่ pH ค่อนข้างเป็นกลาง อุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส ทำให้มีปัญหาในการควบคุมสภาพการทดลองให้ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น อีกทั้งประสิทธิภาพในการกำจัดไม่ค่อยสูงมากนักประมาณ 6-28% จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์บางชนิดสามารถกำจัดได้ทั้งไพไรต์และกำมะถันอินทรีย์ในถ่านหินและเติบโตในสภาวะที่เป็นกรด อุณหภูมิสูง ได้แก่ *T. ferrooxidans* strain THI และ *S. acidocaldarius* เมื่อนำ *T. ferrooxidans* strain THI มาศึกษาการกำจัดกำมะถันอินทรีย์ในถ่านหินลิกไนต์โดยใช้ถ่านหินที่มีเพียงกำมะถันอินทรีย์และใช้ถ่านหินขนาด 53-177 ไมโครเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 10 ด้วยระบบพลาสติกเขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 15 วัน พบว่า ปริมาณกำมะถันอินทรีย์ในถ่านหินลดลงร้อยละ 50-56 ส่วนจุลินทรีย์ *S. acidocaldarius* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซัลเฟตและใช้ถ่านหินขนาด 104-107 ไมโครเมตร ที่ pH 2.0 อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส พบว่า กำมะถันอินทรีย์ลดลงร้อยละ 43.7 ในเวลา 28 วัน

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่แยกได้จากธรรมชาติโดยใช้ DBT เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว เช่น *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* strain CB1 สามารถใช้ DBT ผ่าน 4S pathway และ Carbon destructive pathway และกำจัดกำมะถันอินทรีย์ได้ร้อยละ 18-47

จากที่กล่าวมาแล้วว่า การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยเชื้อจุลินทรีย์เป็นการลดปริมาณกำมะถันก่อนกระบวนการการเผาไหม้ และด้วยเหตุที่การกำจัดกำมะถันออกจากถ่านหินโดยเชื้อจุลินทรีย์

มีประสิทธิภาพสูงและค่าใช้จ่ายต่ำกว่ากระบวนการอื่น ๆ จึงน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ควบคุมปริมาณก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งถูกปล่อยออกมาระหว่างการเผาไหม้ถ่านหินเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง อีกทั้งวิธีการนี้ยังใช้ได้กับถ่านหินที่เป็นผงละเอียด (75 ไมโครเมตร)

ดังนั้น ถ่านหินที่ผ่านกระบวนการกำจัดกำมะถันด้วยเชื้อจุลินทรีย์จึงเหมาะสมควรนำไปใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้า เนื่องจากการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยใช้ถ่านหินลิกไนต์ขนาด 75 ไมโครเมตร สำหรับการผลิตกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะเป็นการลดมลพิษอันเนื่องมาจากการใช้ถ่านหินเป็นเชื้อเพลิง



บรรณานุกรม

การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย. (2535).

รายงานเหตุการณ์ล้มลงภาวะที่โรงไฟฟ้าแม่เมาะ เดือนตุลาคม 2535. หน้า 1-30.

เกียรติ ทองฉิม. (2532). แนวโน้มการใช้และผลิตถ่านหินสำหรับประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีพลังงาน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. หน้า 1-4.

Andrew, G.F. and Maczuka, J.. (1982). Bacterial Coal Desulfurization. *Biotechnology and Bioengineering*. 12 (2): 337-348.

Baldi, F., Clark, T., Pollack, S.S. and Olsen, G.J. (1992) Leaching of Pyrites of Various Reactivities by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (6): 1853-1856.

Gomez, F., Amils, R. and Marin, I.(1999). Bioremoval of Organic and Inorganic Sulfur from Coal Samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52:118-121.

<http://www.goldfields.co.za/biox/biox2.htm>

<http://www.undeerc.org/bios/gallagher.htm>

Kodama, K., Umehara, K., Shimizu, K., Kakatani, S., Minoda, Y. and Yamada, K. (1973). Identification of Microbial Product from Dibenzothiophene and Its Proposed oxidation Pathway. *Agricultural Biology and Chemistry*. 37 (1): 45-50.

Romine, M., Gray, K., Lockhart, J. <http://www.labmed.umn.edu>

Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B. and Zenneck, C. (1992). Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for Leaching. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (1): 85-92.

การแยกและการคัดเลือกแอคติโนมัยซีจาก ดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด

(Isolation and Selection of Cyanobacterium - Inhibiting Actinomycetes from Soil)

ธีรศักดิ์ สมดี* ขนิษฐา ตั้งชีวีเจริญ* และ เตือนใจ ทางกลาง*

บทคัดย่อ

จากการนำตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง ภายในมหาวิทยาลัยขอนแก่น มาแยกเชื้อแอคติโนมัยซีที่พบว่ามี 77 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี disc diffusion พบว่ามี 9 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Microcystis* sp. ได้ และ 10 ไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อ *Anabaena* sp. ได้ โดยไอโซเลต T₂ ให้ผลการยับยั้งเชื้อไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด เมื่อนำไอโซเลต T₂ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *Nocardioide*s และเมื่อทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *Microcystis* sp. และ *Anabaena* sp. ได้เท่ากับ 1:128 และ 1:64 ตามลำดับ

Abstract

A total of 77 isolates of Actinomycetes were obtained from 10 soil samples collected in Khon Kaen University. They were tested for an ability to inhibit the growth of some cyanobacteria by disc diffusion method. It was found that 9 isolates can inhibit the growth of *Microcystis* sp. and 10 isolates inhibit *Anabaena* sp. The isolate named T₂ showed the best ability to inhibit the growth of cyanobacteria. Morphological and biochemical test indicated that T₂ was *Nocardioide*s. Against *Microcystis* sp. and *Anabaena* sp. grown, the MIC value of T₂ were found to be 1:128 and 1:64, respectively.

บทนำ

จากรายงานข่าวถึงปัญหาการเพิ่มประชากรอย่างมากของไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Microcystis aeruginosa* กับแหล่งน้ำสำหรับการอุปโภคบริโภค เช่น เขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ เขื่อนลำนะคง จังหวัดนครราชสีมา เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดกาญจนบุรี และอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี ก่อให้เกิดความตื่นตระหนกและสนใจศึกษากันเพิ่มขึ้น เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดดังกล่าวมีความสามารถในการผลิตสารพิษที่เรียกว่า ไมโครซิสติน (microcystin) ซึ่งมีรายงานทางการแพทย์ยืนยันว่า ก่อให้เกิดมะเร็งในตับ เป็นสารส่งเสริมเนื้องอก และก่อให้เกิดลักษณะทางพยาธิสภาพต่อทางเดินอาหาร เกิดอาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน อาการตับอักเสบ เยื่อปอดอักเสบ อาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ (Watanabe

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

et. al.,1996) โดยพบว่า ไชยาโนแบคทีเรียดังกล่าวเป็นชนิดที่พบได้ทั่วไป (cosmo-politan species) ก่อให้เกิดปัญหากับแหล่งน้ำในหลายประเทศ เช่น ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น แอฟริกาใต้และสหรัฐอเมริกา จากการศึกษพบว่ายังมีไชยาโนแบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิตสารพิษไมโครซิสตินได้ เช่น *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp. และ *Nostoc* spp. เป็นต้น จากปัญหาที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ดังกล่าว ทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาหาวิธีการเพื่อควบคุมยับยั้งหรือทำลายการเจริญของไชยาโนแบคทีเรียพิษ และ มีผู้รายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเซลล์ไชยาโนแบคทีเรียได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีตีส ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะหรือสารอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของไชยาโนแบคทีเรียได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำแบคทีเรียในกลุ่มนี้มาศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของไชยาโนแบคทีเรียพิษได้และนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกไชยาโนแบคทีเรีย *Microcystis* sp. และ *Anabaena* sp.

เก็บตัวอย่างน้ำจากเขื่อนลำนะคง จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้ตาข่ายแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาดความถี่ 10 ไมโครเมตร นำมาแยกให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ขนาด 40 วัตต์ ความชื้นสัมพัทธ์ 70% เป็นเวลา 20 วัน นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มา streak ข้างบนแนใจว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำมาบ่งชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตีสจากดิน

เก็บตัวอย่างดินแบบสุ่ม 5 บริเวณ ภายในมหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาตากไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างดินลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold dilution) แล้วทำ pour plate technique ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar ที่ผสม cyclohexamide และ nystatin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มา streak ข้างบนได้เชื้อบริสุทธิ์

การคัดเลือกแอคติโนมัยซีตีสที่ยับยั้งการเจริญของไชยาโนแบคทีเรียทดสอบ

นำแอคติโนมัยซีตีสที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose soy bean broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm. เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนเซลล์ทิ้งไป เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของไชยาโนแบคทีเรียทดสอบ

นำ paper disc ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร มาชุบส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ spread plate ด้วย *Anabaena* sp. และ *Microcystis* sp. ที่ค่า OD₆₆₅ เท่ากับ 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ขนาด 40 วัตต์ เลือกไอโซเลตของเชื้อแอคติโนมัยซีตีสที่เกิดวงใส (inhibition zone) บนจานอาหารทดสอบ

การศึกษาลักษณะบางประการของแอคติโนมัยซีที่สืบทอดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ

1. ลักษณะสปอร์ โดยเฉพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีที่สืบทอดที่สืบทอดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ ในอาหาร starch casein agar โดยใช้ cover slip ที่มาเชื่อมเสียบลงในเนื้ออาหาร เป็นมุม 45 องศา จากนั้นแตะเชื้อชิดลงบนผิวอาหาร บริเวณที่สัมผัสกับกระจกปิดสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะเส้นใย ที่เจริญบนกระจกปิดสไลด์ (aerial mycelium) และเส้นใยที่เจริญอยู่ในอาหาร (substrate mycelium)

2. ลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีที่สืบทอด โดยปิเปต inoculum ปริมาตร 0.05 มล. หยดบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ใกล้บริเวณขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด คือ Oatmeal agar, Inorganic-salt starch agar, Glycerol-asparagine agar และ Yeast extract-malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาลักษณะต่างๆ คือ สีของ spore mass ที่เจริญเหนืออาหาร, สี substrate mycelium, pH sensitivity ของ pigment, สีของ diffusible soluble pigment และ pH sensitivity ของ diffusible soluble pigment

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแอคติโนมัยซีที่สืบทอดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ

นำไอโซเลตที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การย่อยเจลาติน การย่อยแป้ง การย่อยเคซีน การย่อยไทโรซีน และการรีดิวซ์ไนเตรท

การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ

นำแอคติโนมัยซีที่คัดเลือกได้เพาะเลี้ยงในอาหาร trypticase soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเลี้ยงที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนเซลล์ทิ้ง เก็บส่วนใส (super-natant) มาเจือจางลงทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) โดยทำให้เจือจางเป็น 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 และ 1/256 ผสมกับไซยาโนแบคทีเรียทดสอบซึ่งเลี้ยงในอาหาร BG-11 broth ที่วัดการดูดกลืนแสงที่ OD₆₆₅ เท่ากับ 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 วัตต์ เป็นเวลา 7 วัน ความเจือจางสุดท้ายที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (มีหน่วยเป็น dilution units)

ผลการทดลอง

การแยกไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. และ *Microcystis* sp.

จากการแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำในเขื่อนลำนะคงจังหวัดนครราชสีมาโดยวิธี cross streak พบว่า สามารถแยกได้เชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ เมื่อนำมาบ่มขึ้นชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นเชื้อ *Anabaena* sp. และ *Microcystis* sp.

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ

จากการแยกแอคติโนมัยซีส์จากตัวอย่างดิน พบว่าได้เชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่สบริสุทธ์ 77 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ พบว่ามีความสามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ 13 ไอโซเลต คือ 10 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Anabaena* sp. และ 9 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Microcystis* sp. โดยมี 6 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งสองชนิด มี 4 ไอโซเลตที่สามารถที่สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *Anabaena* sp. และ 3 ไอโซเลตที่สามารถที่สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *Microcystis* sp. ได้ พบว่าไอโซเลต T₂ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Anabaena* sp. และ *Microcystis* sp. ได้ดีที่สุด คือทำให้เกิด Inhibition zone เท่ากับ 20 มม. และ 24 มม. ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความกว้างของ inhibition zone ของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ

ไอโซเลต	ขนาด Inhibition zone (มม.)	
	<i>Anabaena</i> sp.	<i>Microcystis</i> sp.
A ₁	-	20
C ₁	14	21
L ₂	16	8
L ₃	16	-
L ₅	13	-
L ₆	-	12
L ₁₅	12	-
R ₈	16	21
R ₁₂	16	20
R ₁₃	10	-
T ₁	12	20
T ₂	20	24
T ₄	-	21

สัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของแอคติโนมัยซีส์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียบนอาหาร Oatmeal agar

นำแอคติโนมัยซีส์ 13 ไอโซเลตที่คัดเลือก ได้ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร oatmeal agar พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีส์สร้าง spore mass มีสีเทา เขียว แดง ขาวและเหลือง สี substrate mycelium มีสีน้ำตาล ดำ เหลืองและครีม ส่วน diffusible soluble pigment มีสีน้ำตาลอ่อน ครีม เหลือง ซึ่งบางไอโซเลตไม่ให้ diffusible soluble pigment นอกจากนี้ยังพบว่า pH sensitivity ของ spore mass และ diffusible soluble pigment เมื่อหยด 0.05 N NaOH และ 0.05 N HCl ไม่เปลี่ยนสี (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียบนอาหาร oatmeal agar

ไอโซเลต	สีของ spore mass	สีของ substrate mycelium	pH sensitivity pigment	สีของ diffusible soluble pigment	pH sensitivity diffusible soluble pigment
A ₁	เทา	น้ำตาล	-	-	-
C ₁	เขียว	น้ำตาล	-	น้ำตาลอ่อน	-
L ₂	แดง	น้ำตาลอ่อน	-	ครีม	-
L ₃	แดง	น้ำตาลอ่อน	-	ครีม	-
L ₅	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-	เหลือง	-
L ₉	เทา	ดำ	-	น้ำตาล	-
L ₁₅	เหลือง	เหลือง	-	-	-
R ₈	แดง	น้ำตาลอ่อน	-	น้ำตาลอ่อน	-
R ₁₂	เหลือง	น้ำตาลอ่อน	-	เหลืองส้ม	-
R ₁₃	แดง	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
T ₁	เหลือง	ครีม	-	-	-
T ₂	เขียว	เหลือง	-	-	-
T ₄	ขาว	เหลือง	-	-	-

หมายเหตุ (-) คือ ไม่เกิดสี หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยา

สัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียบนอาหาร Inorganic-salt starch agar

พบว่า spore mass มีสีม่วง ขาว แดง เทา เหลือง substrate mycelium มีสีเหลือง น้ำตาล ขาว จะไม่พบ diffusible soluble pigment เลย ส่วน pH sensitivity ของ spore mass และ diffusible soluble pigment เมื่อหยด 0.05 N NaOH และ 0.05 N HCl จะไม่มีการเปลี่ยนสี (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยาของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ บนอาหาร inorganic-salt starch agar

ไอโซเลต	สีของ spore mass	สีของ substrate mycelium	pH sensitivity pigment	สีของ diffusible soluble pigment	pH sensitivity diffusible soluble pigment
A ₁	ม่วง	เหลือง	-	ชมพูน้ำตาล	-
C ₁	ขาว	ขาว	-	ครีม	-
L ₂	แดง	เหลือง	-	ครีม	-
L ₃	แดง	เหลือง	-	ครีม	-
L ₅	แดง	เหลือง	-	น้ำตาลอ่อน	-
L ₉	เทา	น้ำตาล	-	-	-
L ₁₅	ขาว	ขาว	-	เหลือง	-
R ₈	ม่วง	เหลือง	-	น้ำตาลอ่อน	-

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยาของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ บนอาหาร inorganic-salt starch agar (ต่อ)

ไอโซเลต	สีของ spore mass	สีของ substrate mycelium	pH sensitivity pigment	สีของ diffusible soluble pigment	pH sensitivity diffusible soluble pigment
R ₁₂	ขาว	ขาว	-	ขาว	-
R ₁₃	ม่วง	เหลือง	-	น้ำตาลอ่อน	-
T ₁	เหลือง	ขาว	-	-	-
T ₂	ขาว	เหลือง	-	ขาว	-
T ₄	เทา	ขาว	-	เหลือง	-

หมายเหตุ (-) คือ ไม่เกิดสี หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยา

สัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียบนอาหาร Glycerol - asparagine agar

พบว่า spore mass มีสีขาว แดง เทา และเหลือง substrate mycelium มีสีเหลือง น้ำตาล ขาว และไม่พบสีของ diffusible soluble pigment ส่วน pH sensitivity ของ spore mass และ diffusible soluble pigment เมื่อหยด 0.05 N NaOH และ 0.05 N HCl ไม่พบการเปลี่ยนสี (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ บนอาหาร glycerol - asparagine agar

ไอโซเลต	สีของ spore mass	สีของ substrate mycelium	pH sensitivity pigment	สีของ diffusible soluble pigment	pH sensitivity diffusible soluble pigment
A ₁	ขาว	ขาว	-	-	-
C ₁	ขาว	ขาว	-	-	-
L ₂	แดง	เหลือง	-	-	-
L ₃	ขาว	ขาว	-	-	-
L ₅	แดง	เหลือง	-	-	-
L ₉	เทา	น้ำตาล	-	-	-
L ₁₅	ขาว	เหลือง	-	-	-
R ₈	ขาว	เหลือง	-	-	-
R ₁₂	ขาว	เหลือง	-	-	-
R ₁₃	เหลือง	ขาว	-	-	-
T ₁	ขาว	เหลือง	-	-	-
T ₂	เหลือง	ขาว	-	-	-
T ₄	ขาว	ขาว	-	-	-

หมายเหตุ (-) คือ ไม่เกิดสี หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยา

สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียบนอาหาร Yeast extract – malt extract agar

พบว่า spore mass มีสีเทา เหลือง แดง ม่วง ขาว substrate mycelium มีสีน้ำตาล เหลือง น้ำตาลแดง diffusible soluble pigment มีสีน้ำตาลอ่อน ส่วน pH sensitivity ของ spore mass และ diffusible soluble pigment เมื่อหยด 0.05 N NaOH และ 0.05 N HCl ไม่มีการเปลี่ยนสี (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร yeast extract – malt extract agar

ไอโซเลต	สีของ spore mass	สีของ substrate mycelium	pH sensitivity pigment	สีของ diffusible soluble pigment	pH sensitivity diffusible soluble pigment
A ₁	เทา	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
C ₁	เหลือง	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
L ₂	แดง	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
L ₃	แดง	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
L ₅	ม่วง	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
L ₉	เทา	ดำ	-	-	-
L ₁₅	ขาว	เหลือง	-	-	-
R ₈	แดง	น้ำตาลแดง	-	น้ำตาลอ่อน	-
R ₁₂	แดง	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
R ₁₃	แดง	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	-
T ₁	ขาว	เหลือง	-	-	-
T ₂	ขาว	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	-
T ₄	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-	น้ำตาลอ่อน	-

หมายเหตุ (-) คือ ไม่เกิดสี หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยา

คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแอคติโนมัยซีทีสที่คัดเลือกได้ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกจึงได้ผลดังตารางที่ 6 และพบว่า ไอโซเลต T₂ ซึ่งให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *Anabaena* sp. และ *Microcystis* sp. ได้ดีที่สุด สามารถย่อยไทโรซีนและรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้

ตารางที่ 6 การทดสอบทางชีวเคมีบางประการของแอคติโนมัยซีที่ยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ

ไอโซเลต	การย่อย casein	การย่อย tyrosine	การย่อย gelatin	การย่อย nitrate	การย่อย starch
A ₁	+	+	-	+	-
C ₁	+	+	-	+	-
L ₂	+	-	-	-	-
L ₃	-	+	-	+	-
L ₅	+	+	-	+	-
L ₉	+	-	-	-	-
L ₁₅	+	-	-	+	-
R ₈	+	+	-	+	-
R ₁₂	+	+	-	+	+
R ₁₃	+	+	-	+	+
T ₁	-	+	-	+	-
T ₂	-	+	-	+	-
T ₄	-	+	-	+	-

หมายเหตุ (-) คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา (+) คือ เกิดปฏิกิริยา

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ (MIC)

พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต T₂ ให้ค่า MIC ต่อ *Anabaena* sp. เท่ากับ 1/64 และให้ค่า MIC ต่อ *Microcystis* sp. เท่ากับ 1/128

สรุปและวิจารณ์

จากการเก็บตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง ภายในมหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีที่สามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียทดสอบ พบว่า สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีที่บริสุทธิ์ได้ 77 ไอโซเลต โดยเชื้อที่แยกได้ 13 ไอโซเลต หรือ คิดเป็น 16.88 % สามารถยับยั้งเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. และ *Microcystis* sp. ได้ สอดคล้องกับ Saffermon และ Morris (1962) ที่แยกเชื้อแอคติโนมัยซีที่สากดิน 403 ไอโซเลต พบว่า แอคติโนมัยซีที่สาคิดเป็น 24.6 % มีความสามารถในการยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย *Plectonema boryanum* การที่แอคติโนมัยซีที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้เนื่องมาจากแอคติโนมัยซีที่เป็นจุลินทรีย์ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolize) หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายหรือยับยั้งเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Saffermon และ Morris, 1963)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า แอคติโนมัยซีที่ไอโซเลต T₂ ยับยั้งการเจริญของ *Microcystis* sp. และ *Anabaena* sp. ได้ดีที่สุด เมื่อนำไอโซเลต T₂ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *Norcardioides* ส่วนการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่า ไอโซเลต T₂ มีค่า MIC ต่อ *Anabaena* sp. เท่ากับ 1/64 และต่อ *Microcystis* sp.

เท่ากับ 1/128 แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะที่สร้างจากไฮโซเลต T₂ ยับยั้งการเจริญของ *Microcystis* sp. ได้ดีกว่า *Anabaena* sp. อาจเนื่องจากเชื้อ *Microcystis* sp. เมื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เซลล์ส่วนใหญ่จะปรากฏในลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไม่อยู่รวมเป็นโคโลนีอย่างที่พบตามธรรมชาติ ในขณะที่เชื้อ *Anabaena* sp. เซลล์จะมีขนาดใหญ่กว่าและมีเมือกหุ้มหนา อาจจะมีผลให้ถูกทำลายได้ยากกว่า อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาต่อไปควรศึกษาต่อถึงสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของไฮโซเลต T₂ เพื่อให้ผลในการผลิตสารปฏิชีวนะที่ดียิ่งขึ้น

จากการศึกษาวิจัย พบว่า มีแอคติโนมัยซีตที่ชนิดอื่นๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียได้ เช่น จากรายงานการทดลองของ Rubenchik และคณะ (1965) ทดสอบจุลินทรีย์ 838 ไฮโซเลต พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีตในจีนัส *Streptomyces* spp. 28 ไฮโซเลต และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีก 3 ไฮโซเลต มีความสามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena hassallii* ซึ่งเพิ่มปริมาณอย่างมากในแหล่งน้ำธรรมชาติ Saffermon และ Morris (1963) แยกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่สามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย *Anacystis nidulans* หรือ *Streptomyces achromogenes* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Anabaena cylindrica* (ACTT 27899) และ *Tolypothrix temuis* (ATCC 27914) และพบว่า *Streptomyces antagonist* สามารถยับยั้งการเจริญ *Microcystis aeruginosa* และ *Anabaena cylindrica* (Whyte และคณะ, 1985) แสดงให้เห็นว่า เชื้อแอคติโนมัยซีตหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียได้ นอกจากแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีตแล้ว จุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ ก็มีความสามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น Manhakhant A. และคณะ (1998) พบว่า แบคทีเรีย *Cytophaga* sp. C-2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8335 และ *Myxococcus* sp. ส่วน *Sorangium* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของ *Nostoc muscorum* (Stewart และ Brown, 1970) และ *Myxococcus* sp. สามารถทำลายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus cedrorun* และ *Lyngbya* sp. (Wu และคณะ, 1968)

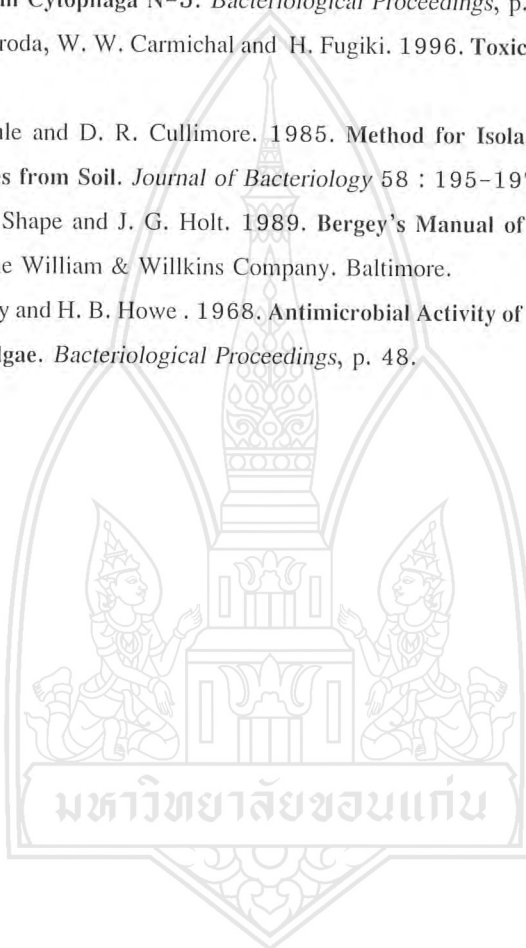
ดังนั้น จากการวิจัยดังกล่าวจึงเป็นแนวทางในการศึกษาค้นคว้าจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียพิษ และนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุม ยับยั้งหรือทำลายการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียพิษในแหล่งน้ำธรรมชาติต่อไป

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Mahakhant, A., T. Thong-aram, P. Ratanachot, V. Arupairojoana, P. Sano, M. M. Watanabe and K. Kaya .1998 . Controlling of Toxic Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* TISTR 8325 by *Cytophaga* sp. *Proceedings of International Conference on Asian Network on Microbial Research* 432-440.
- McNeii, J. F. and J. M. Brown. 1994. *The Medically Important Aerobic Actinomycetes : Epidemiology and Microbiology. Clinical Microbiology Reviews* 7 : 357-417.
- Rubenchik, L. I., O. I. Bershova and Z. P. Knizhnik. 1965. *On the Interrelation of Anabaena with Bacteria and Actinomycetes. In "Ecologia physiologia sinezelenych vodorosley", Nauka, Moscow.*

- Safferman, R. S. and M. E. Morris. 1962 . Evaluation of Natural Products for Algicidal Properties . *Applied Microbiology* 10 : 289-292.
- Safferman, R. S. and M. E. Morris. 1963 . The Antagonistic Effects of Actinomycetes on Algae Found in Waste Stabilisation Ponds. *Bacteriological Proceedings*, p. 14.
- Stewart, J. K. and R. M. Brown .1970. Killing of Green and Blue-green Algae by a Non-fruiting *Myxobacterium* Cytophaga N-5. *Bacteriological Proceedings*, p.18.
- Watanabe M. F., K. Haroda, W. W. Carmichal and H. Fugiki. 1996. Toxic of *Microcystis*. CRC Press Inc.
- Whyte, L. G., A. Maule and D. R. Cullimore. 1985. Method for Isolation Cyanobacteria-lysing *Streptomyces* from Soil. *Journal of Bacteriology* 58 : 195-197.
- Williams, S.T., M. E. Shape and J. G. Holt. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4.* The William & Willkins Company. Baltimore.
- Wu, J. H., M. K. Hamdy and H. B. Howe . 1968. Antimicrobial Activity of a *Myxobacterium* Against Blue-green Algae. *Bacteriological Proceedings*, p. 48.



**ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจน
เปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน ที่ผลิตโดยแลคติกแอซิด
แบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก**

**Antimicrobial activity of organic acids, hydrogen peroxide and
bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from
fermented foods**

ปาริชาติ พุ่มขจร*, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ* และ ยุภารัตน์ เครือวงษา*

บทคัดย่อ

ได้นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 273 isolates ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักจำนวน 15 ตัวอย่าง มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ (indicator organism) 5 ชนิด คือ *Leuconostoc mesenteriodes* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดย swab-paper disc method พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 200 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ เมื่อนำ culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวมาปรับ pH 7 ปรากฏว่ามี แลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 81 isolates ที่ยังคงยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์เหล่านี้ และเมื่อเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไป พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 37 isolates ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ และเมื่อเติมเอนไซม์โปรตีนเอส เค ลงไปอีก พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 5 isolates ที่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ เมื่อจำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 5 isolates ดังกล่าว พบว่าเป็น *Lactococcus* และ *Pediococcus*

Abstract

A total of 273 isolates of lactic acid bacteria (LAB) isolated from 15 fermented foods were tested for antimicrobial activity against 5 strains of indicator organisms by using swab-paper disc method. The indicator organisms used in this study were *Leuconostoc mesenteriodes* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 200 isolates of the isolated LAB were shown to inhibit the growth of at least one strain of the indicator organisms. After neutralizing culture supernatant of the

* ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี
34190

200 isolated LAB, only 81 of the culture supernatant could maintain their antimicrobial activity against the indicator organisms. When neutralized culture supernatant of the 81 isolated LAB was treated with catalase, 37 isolated LAB was shown to have antimicrobial activity against the indicator organisms. Antimicrobial activity of culture supernatant of 5 isolated LAB was abolished after neutralizing and treating culture supernatant of the 37 isolated LAB with catalase and proteinase K. The 5 isolated LAB were classified in the genus of *Lactococcus* and *Pediococcus*.

บทนำ

แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ไม่สร้างสปอร์ บางชนิดมีรูปร่างเป็นท่อน (rod) บางชนิดกลม (cocci) ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญเติบโต (microaerophilic) สามารถแบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่มคือ homofermentative lactic acid bacteria (ผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 85-95%) และ heterofermentative lactic acid bacteria (ผลิตกรดแลคติกได้ประมาณ 50%) ส่วนที่เหลือเป็นเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย อาจเนื่องจากสารหลายชนิดที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียผลิตขึ้น สารเหล่านี้อาจเรียกโดยรวมว่าสารยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ (antimicrobial substance) ซึ่งได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และ แบคทีริโอซิน (bacteriocin) เป็นต้น^[1,2]

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักกันอย่างกว้างขวางและมีความสามารถในการสร้างแบคทีริโอซิน^[3,4,5,6] จากการศึกษาพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่างชนิดกันจะผลิตแบคทีริโอซินได้แตกต่างกัน และแบคทีริโอซินต่างชนิดกันก็มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์อื่นได้แตกต่างกันด้วย^[7,8,9] แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จะได้รับความสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ใน

อุตสาหกรรมอาหาร และ/หรือในทางการแพทย์ มักจะเป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และ/หรือจุลินทรีย์ก่อโรค

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักชนิดต่างๆ แล้วนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ (indicator organism) 5 ชนิด คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ (indicator organisms) จุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ที่ใช้ในการศึกษานี้มี 5 ชนิด คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ทุกชนิดใน nutrient broth และ nutrient agar ยกเว้น *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ที่เลี้ยงใน MRS broth และ MRS agar

การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

อาหารหมักที่ใช้ในการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่ แหนม, ไส้กรอกเปรี้ยว, หม่า,

ปลาสด และผักตบชวชนิดต่างๆ ซึ่งสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหมักจากตลาดในอำเภอวารินชำราบ และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี จำนวนรวม 15 ตัวอย่าง วิธีการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักทำได้โดยนำตัวอย่างอาหารหมัก 10 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 7.0 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถุงพลาสติก จากนั้นทำให้อาหารกระจายตัวดีขึ้นด้วยเครื่องตีปั่น (Seward stomacher 400) นาน 1 นาที เจือจางสารละลายอาหารที่ได้ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ระดับความเจือจางเป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} จากนั้นนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อยู่ในสารละลายที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ไปเลี้ยงใน MRS (deMan, Rosaga and Sharpe) agar โดยวิธี spread plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวๆ ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เจริญบน MRS agar ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

การเตรียม culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักใน MRS broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 นาที และเก็บเฉพาะส่วนใส (culture supernatant) ซึ่งปราศจากเซลล์ไปกรองผ่าน sterile membrane filter (pore size 0.45 μ m) ก่อนที่จะนำ culture supernatant ดังกล่าวไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบต่อไป

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ โดย swab-paper disc method

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ โดย swab-paper disc method [10] มีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ใน nutrient broth (ยกเว้น *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 เลี้ยงใน MRS broth) ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ใช้ sterile swab จุ่มเชื้อมาพอกหมดแล้วป้ายเชื้อเป็นระนาบจนทั่วจานเพาะเชื้อซึ่งบรรจุอาหารชนิดเดียวกับที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ นำ sterile paper disc (Schleicher & Schuell) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระยะห่างกันพอสมควร หยด culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะสังเกตผล และวัดขนาดของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่น paper disc

การทดสอบการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้โดยกรดอินทรีย์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

นำ culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาปรับ pH 7^[3] ก่อนที่จะนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้โดย swab-paper disc method

การทดสอบการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

นำ culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้รับการปรับ pH 7 แล้วไปเติมเอนไซม์ คตะเลส (catalase) (5 mg/ml) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง^[3] ก่อนที่จะนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้โดย swab-paper disc method

การทดสอบการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ทดสอบโดยแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

นำ culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ปรับ pH 7 และเติมเอนไซม์คะตะเลส (catalase) (5 mg/ml) แล้ว มาเติมเอนไซม์โปรตีนเนส เค (proteinase K) (0.5 mg/ml)⁽³⁾ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ โดย swab-paper disc method

การจำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระดับสกุล (genus)

ได้จำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระดับสกุลตามวิธีของ Schillinger and Lucke⁽¹¹⁾ โดยศึกษาลักษณะดังต่อไปนี้ การติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์คะตะเลส รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส การเจริญเติบโต (growth) ที่อุณหภูมิต่างๆ การเจริญเติบโตใน 6.5% NaCl และการทดสอบ arginine hydrolysis

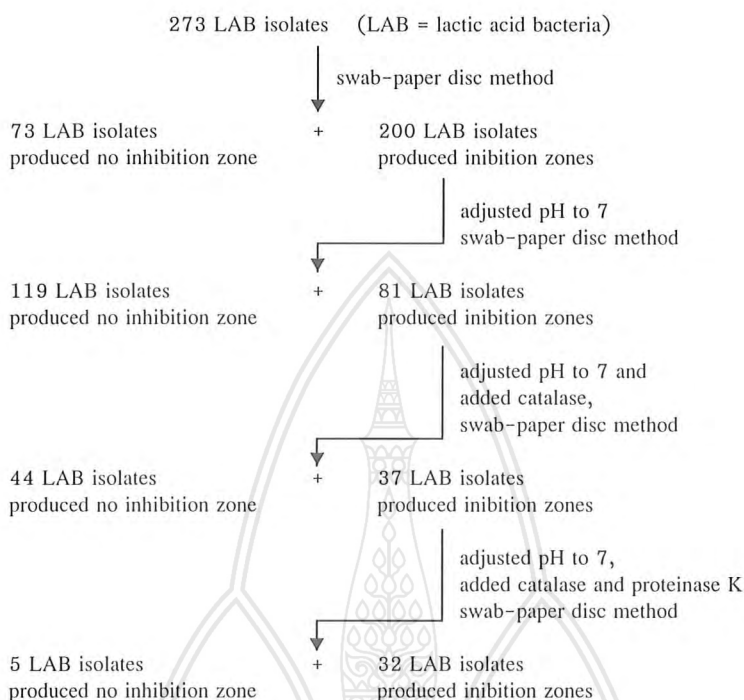
ผลการทดลอง

จากตัวอย่างอาหารหมักจำนวน 15 ตัวอย่าง สามารถแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้ 273 isolates (LAB1-LAB273) ซึ่งจำแนกตามลักษณะรูปร่างได้ดังนี้ รูปร่างเป็นท่อน (rod) 61 isolates รูปร่างเป็นท่อนสั้น (short rod) 65 isolates รูปร่างกลม (cocci) 110 isolates และรูปร่างกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่มสี่เซลล์ (tetrad) 37 isolates

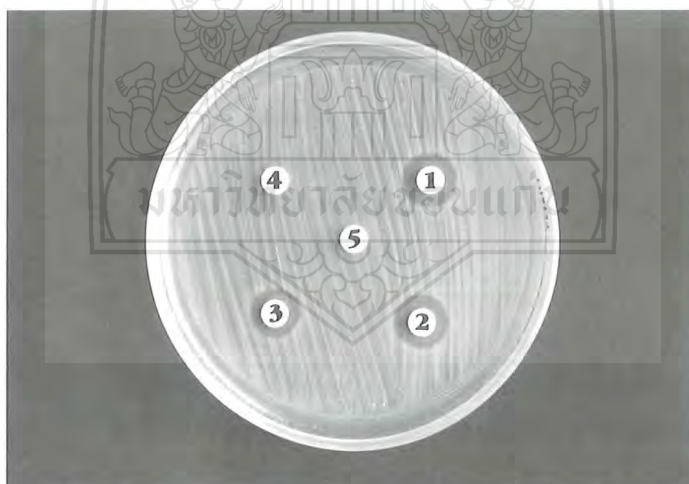
เมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 273 isolates ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ 5 ชนิด คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยใช้ swab-paper disc method พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 200

isolates สามารถยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด ที่เหลือ 73 isolates ไม่สามารถยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ชนิดใดเลย (รูปที่ 1) ขนาดของ inhibition zone ที่วัดได้มีตั้งแต่ 7-15 มิลลิเมตร (เฉลี่ย, $x = 13.5$ มิลลิเมตร)

หลังจากนำ culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 200 isolates ที่ปรับ pH 7 มาใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ทั้งหมดอีกครั้งโดย swab-paper disc method พบว่ามี 81 isolates ที่ยังคงให้ inhibition zone อยู่ โดยให้ inhibition zone ขนาดตั้งแต่ 7-13 มิลลิเมตร ($x = 12.0$ มิลลิเมตร) ที่เหลืออีก 119 isolates ไม่เกิด inhibition zone จากนั้นนำ culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 81 isolates มาเติมเอนไซม์คะตะเลสก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์อีกครั้งด้วย swab-paper disc method พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 37 isolates เท่านั้นที่ยังคงสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ได้ ขนาดของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก (ช่วง 7-12 มิลลิเมตร, $x = 11.5$ มิลลิเมตร) ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เหลือ 44 isolates ไม่ให้ inhibition zone จากนั้นได้นำ culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านขั้นตอนที่แล้วไปเติมเอนไซม์โปรตีนเนส เค ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้อีกครั้งหนึ่งด้วย swab-paper disc method พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 32 isolates ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ได้ โดยให้ขนาดของ inhibition zone ส่วนใหญ่เหมือนเดิม คือ และมีแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพียง 5 isolates เท่านั้นที่ไม่ให้ inhibition zone (รูปที่ 1) ตัวอย่างของผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ทดสอบโดย culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้แสดงไว้ในรูปที่ 2



รูปที่ 1 ขั้นตอน และผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก



รูปที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก (LAB102)

1 = culture supernatant (pH 3)

2 = culture supernatant (pH 7)

3 = culture supernatant (pH 7) + catalase

4 = culture supernatant (pH 7) + catalase

5 = MRS broth (control)

+ proteinase K

เมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 5 isolates (LAB41, LAB44, LAB49, LAB102 และ LAB 107) ที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการทดสอบข้างต้นนี้ไปศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีบางประการเพื่อจำแนกชนิดของ

แบคทีเรียในระดับสกุล (genus) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำผลที่ได้ไปเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียพบว่า LAB41, LAB44, LAB49 และ LAB102 คือ *Lactococcus* sp. ส่วน LAB107 คือ *Pediococcus* sp. (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสกุล (genus)

ลักษณะทางสรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย				
	LAB41	LAB44	LAB49	LAB102	LAB107
รูปร่าง	cocci	cocci	Cocci	cocci	cocci
ติดสีแกรม	+	+	+	+	+
ผลิตเอ็นไซม์อะไมเลส	-	-	-	-	-
ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส	-	-	-	-	-
เจริญเติบโตที่ 10 องศาเซลเซียส	+	+	+	+	+
เจริญเติบโตที่ 45 องศาเซลเซียส	-	-	-	-	-

วิธีของ Schillinger, U. and Lucke, F.K. (1987)

ตารางที่ 2 ชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระดับสกุล และแหล่งอาหารหมักที่ใช้แยกเชื้อ

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	Genus	แหล่งอาหารหมัก
LAB41	<i>Lactococcus</i> sp.	กะหล่ำตอง
LAB44	<i>Lactococcus</i> sp.	กะหล่ำตอง
LAB49	<i>Lactococcus</i> sp.	กะหล่ำตอง
LAB102	<i>Lactococcus</i> sp.	กะหล่ำตอง
LAB107	<i>Pediococcus</i> sp.	หอมตอง

สรุปและวิจารณ์

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค มีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในการผลิตอาหาร

หมักมากกว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่น ทั้งนี้เนื่องจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก ซึ่งโดยธรรมชาติพบได้ในอาหารหมักอยู่แล้ว จะไม่ทำให้คุณภาพของอาหารหมัก เช่น กลิ่น รส และเนื้อสัมผัส (texture) เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นในการศึกษานี้ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มแรกของความพยายามในการหาแลคติกแอซิด

แบคทีเรียที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culture) เพื่อผลิตอาหารหมัก จึงพยายามแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก และทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียเหล่านั้นในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ต่างๆ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

จากการทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้โดย swab-paper disc method พบว่าในบรรดาแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 273 isolates มีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 200 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ โดยสารที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียเหล่านี้ใช้ในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ อาจเป็นกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือแบคเทอริโอซิน ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรียอีก 73 isolates นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ ทั้งนี้เนื่องจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวไม่ผลิตสารที่ใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ หรืออาจเป็นไปได้ว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียเหล่านั้นผลิตสารยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ได้แต่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้โดย swab-paper disc method

เพื่อทดสอบว่าสารที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 200 isolates ผลิตออกมา และสามารถไปยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ได้เป็นผลเนื่องจากกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียวหรือเป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารอื่น จึงได้ปรับ pH ของ culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นกลางเพื่อลบล้างฤทธิ์ของกรดอินทรีย์ แล้วจึงนำ culture supernatant นั้นไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ ถ้า culture supernatant ใดสูญเสีย

ความสามารถในการทำให้เกิด inhibition zone แสดงว่าใน culture supernatant นั้นมีกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียว แต่ถ้า culture supernatant ใดยังคงทำให้เกิด inhibition zone ได้ แต่ inhibition zone มีขนาดเล็กลง แสดงว่าใน culture supernatant นั้นมีกรดอินทรีย์และสารอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ปนอยู่ จากผลการทดลองพอสสรุปได้ว่าในบรรดาแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 200 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ได้นั้น มีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 119 isolates ที่ผลิตเฉพาะกรดอินทรีย์ในปริมาณที่มากพอเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ และมีแลคติกแอซิดแบคทีเรียอีก 81 isolates ที่ผลิตกรดอินทรีย์หรือสารอื่นๆ ด้วยเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์

เพื่อทดสอบว่าสารอื่นๆนอกเหนือจากกรดอินทรีย์ที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 81 isolates ผลิตขึ้นเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือไม่นั้น จึงได้ปรับ pH 7 และเติมเอ็นไซม์คะตะเลสลงใน culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 81 isolates เพื่อลบล้างฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนที่จะใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ ถ้า culture supernatant ใดสูญเสียความสามารถในการเกิด inhibition zone แสดงว่าใน culture supernatant นั้นมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ถ้า culture supernatant ใดยังคงทำให้เกิด inhibition zone ได้ แต่ขนาดของ inhibition zone เล็กลง แสดงว่า culture supernatant นั้นมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารอื่นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ปนอยู่ด้วย จากผลการทดลองสรุปได้ว่าในบรรดาแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 81 isolates ที่ใช้ศึกษาในขั้นตอนนี้มีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 44 isolates ที่ผลิตกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ และมีแลคติกแอซิดแบคทีเรียอีก 37 isolates ที่นอกจากจะผลิตกรดอินทรีย์และ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วยังผลิตสารอื่น ๆ อีกเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์

เพื่อทดสอบว่าสารอื่นนอกเหนือจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียทั้ง 37 isolates ผลิตขึ้นเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ทดสอบเป็นแบคทีเรียโอซินหรือไม่นั้น จึงนำ culture supernatant ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียทั้ง 37 isolates จากขั้นตอนที่แล้วมาเอ็นไซม์โปรตีนเอสเค เพื่อลบล้างฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ โดยที่ culture supernatant ได้สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิด inhibition zone แสดงว่าใน culture supernatant นั้นมีแบคทีเรียโอซิน แต่ถ้ายังคงเกิด inhibition zone ได้ แสดงว่าไม่ว่าจะมีแบคทีเรียโอซินแต่อาจมีสารอื่น ๆ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ และไม่ถูกทำลายโดยเอ็นไซม์ชนิดนี้ เช่น ไดอะซิติล (diacetyl) หรือรูเทอริน (reuterin) เป็นต้น^[2]สรุปได้ว่าในบรรดาแลคติกแอสิดแบคทีเรีย 37 isolates ที่นำมาศึกษาในขั้นตอนนี้ มีแลคติกแอสิดแบคทีเรีย 5 isolates เท่านั้นที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์

ด้วยเหตุที่ว่าแบคทีเรียโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์อื่นได้อย่างจำเพาะ^[12]จึงพยายามที่จะนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและ/หรือจุลินทรีย์ก่อโรค ไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักเพื่อให้แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไปยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ที่อาจปนอยู่ในอาหารอย่างจำเพาะโดยไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (normal flora) ซึ่งอยู่ในร่างกายของผู้บริโภค แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ทั้ง 5 isolates ที่ได้จากการศึกษานี้อาจนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ

ในการผลิตอาหารหมักได้โดยควรมีการศึกษาสมบัติต่างๆ ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียเหล่านี้ และของแบคทีเรียโอซิน รวมทั้งความเป็นไปได้และความเหมาะสมในการนำเชื้อมาใช้ไปใช้งานจริงในขั้นตอนการผลิตอาหารหมักต่อไป

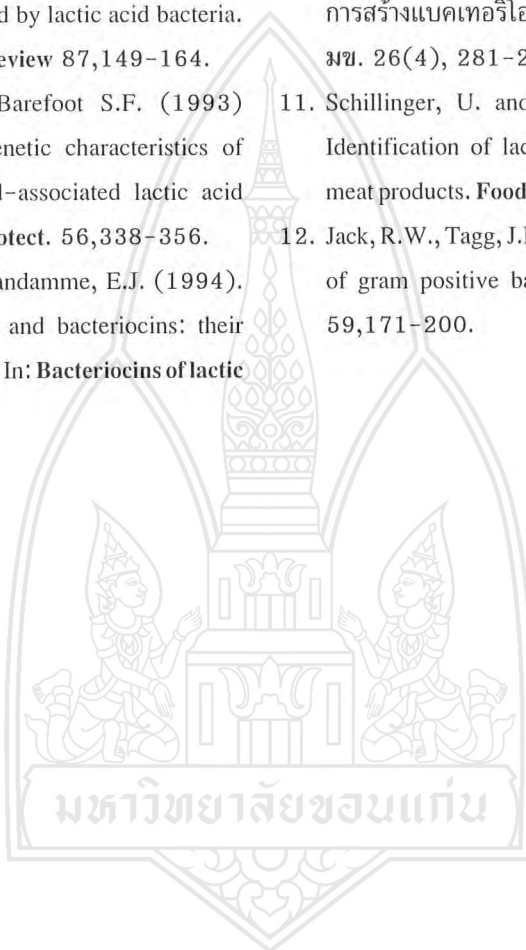
กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2542 และขอขอบคุณคุณนงลักษณ์ หอมหวล ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

เอกสารอ้างอิง

1. Gilliland, S.E. and Speck, M.L. (1975). Inhibition of psychrotrophic bacteria by *Lactobacilli* and *Pediococci* in nonfermented refrigerated foods. *J. Food Sci.* 40, 903-905.
2. Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Tech.* 43,164-167.
3. Schillinger, U. and Lucke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55,1901-1906.
4. Rekhif, N., Atrih, A. and Lefebvre, G. (1995). Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. *Appl. Bacteriol.* 78,349-358.
5. Faris, M.E., Holgado -Ruiz, A.A. and Sesma, F. (1994). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolate from regional cheese : inhibition of foodborn pathogens. *J. Food Prot.* 57,1013-1015.

6. Ahn, C. and Stiles, M.E. (1990). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-package meats. **J. Appl. Bacteriol.** 69,302-310.
7. Klaenhammer, TR. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Review** 87,149-164.
8. Nettles C.G. and Barefoot S.F. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. **J. Food Protect.** 56,338-356.
9. De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. In: **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** (Eds. De Vuyst, L. and Vandamme, E.J.) Blackie Academic & Professional, Glasgow. pp.1-11.
10. พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร. (1998). วิธีการอย่างง่ายในการทดสอบการสร้างแบคทีริโอซิน. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข.** 26(4), 281-288.
11. Schillinger, U. and Lucke, F.K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiol.** 4,199-208.
12. Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. Bacteriocin of gram positive bacteria. **Microbiol. Rew.** 59,171-200.



การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์พื้นเมือง เพื่อใช้เป็นสารเร่งทางชีวภาพสำหรับการหมักไซเลจ

Screening of lactic acid bacteria local strains as biocatalysts for silage fermentation

สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ* ทองเลียน บัวจุม* สุรัชย์ แซ่เล้า* อีรวิทย์ ทับทอง*
รติกร ฉัตรทอง* และอำนาจ เจริญรัตน์*

บทคัดย่อ

ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 7 ไอโซเลตจาก 96 ไอโซเลตซึ่งแยกจากไซเลจและอาหารหมัก โดยอาศัยความแตกต่างในการเจริญที่อุณหภูมิสูง 37, 45 และ 50°C ระดับพีเอช 5-8 สภาวะมีและไม่มีอากาศ และ % ผลผลิตกรดแลคติก เชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* และ *Pediococcus* จากการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิด้วยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักที่ 45 และ 50°C พบว่า เชื้อไอโซเลต M6 สามารถหมักไซเลจข้าวโพด ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ 2.9-11.2 และ 1.34-6.02 เท่า ขณะที่ไอโซเลต I4 สามารถหมักไซเลจจากหญ้าแสดง 1.3-1.9 และ 1.9-3.9 เท่า เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีของระบบหมักไซเลจที่อุณหภูมิ 30, 37, 45 และ 50°C พบว่า การใส่หัวเชื้อส่งผลให้พีเอชของระบบลดลงควบคู่กับการเพิ่มปริมาณกรดแลคติกและอัตราส่วนของกรดแลคติกต่อกรดอะเซติก เมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่ใส่หัวเชื้อ อย่างไรก็ตาม ในการหมักไซเลจจากหญ้าพบว่า ให้ผลผลิตเป็นปริมาณกรดอะเซติกสูงในทั้งสองสภาวะ

Abstract

7 of 96 isolates from fermented food and silage samples were selected according to growth at high temperature of 37, 45 and 50°C, various pH of 5-8, anerobic and aerobic conditions, and % yield of lactic acid produced from glucose. They all belong to either genus *Lactobacillus* or *Pediococcus*. Secondary screening of ensiling ability test showed that the isolate M6 produced lactic acid in corn ensiling fermentation higher than the other isolates for 2.9-11.2 and 1.34-6.02 times at 45 and 50°C respectively. In case of grass ensiling, the isolate I4 was chosen due to higher lactic acid production than the others for 1.3-1.9 and 1.9-3.9 times at 45 and 50°C respectively. Treatments with (W1) inoculant I4 and M6 resulted in physical and chemical changes at various temperature of 30, 37, 45

* ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

and 50°C including lower pH, higher lactic acid content and higher ratio of lactic acid to acetic acid when comparing to the without inoculants (WOI) treatments. However the application of the isolate I4 on grass ensiling was not so successful due to high acetic acid content.

INTRODUCTION

Silage for dairy feeding are well known in developed countries but remain unpractical in developing countries like Thailand owing to the limitation of high temperature up to 40°-44°C during dry season and the right operation in keeping anaerobic system. To overcome these problems, Management with high investment costs due to proper machine and container is theoretically the first approach. However, in Thailand most dairy farmers own small and medium farms and could not afford to invest in big machines. To avoid these problems, ensiling with the active biocatalysts will be an alternative way to obtain a good fermentation. The suitable lactic acid bacteria (LAB) as an inoculant, applied at a higher rate than the existing epiphytic population of LAB on the herbage can encourage early lactic acid production and increase rate of pH decline^(1, 2). Bacterial and fungal treatments have also been used to enhance the nutritive value of crop residues for livestock feeding⁽³⁾. Therefore our present studies were aimed to select the effective local strains of LAB which will be suitable for ensiling in Thailand or even in other countries with the same climate.

MATERIALS & METHODS

Bacterial strains

96 isolates of LAB from fermented food and silage were used for our study. The strain

Lactobacillus plantarum IAM 1041 used for ensiling^(3, 4). was used as a reference strain

Study on growth of LAB

Growth measurement was studied for primary screening. Starter culture of each LAB strain was grown at 37°C for 24 h with A₆₀₀ of 0.5 approximately. 10 µl of each LAB strain was inoculated into 10 ml of MRS medium^(1, 5) under specified conditions and then incubated for 24 h. Growth of each isolate was determined by measuring the turbidity at A₆₀₀.

Preliminary identification of LAB isolates

To identify the isolated strains, the following characteristics were examined: cell morphology, gram stain, spore formation, catalase test, lactic acid and gas production from glucose, as well as effects of temperature, pH and NaCl on growth^(5, 6). The experiment was performed at 37°C. Data were collected at 24 h after inoculation when the bacterial growth was at stationary phase.

Ensiling test

The ability of ensiling was tested as a secondary screening. Grass and corn crops were used as raw materials. Pouch method was carried out for ensiling process⁽⁷⁾. The whole grass or corn crops were chopped to ca. 1 cm and ensiled in 18 x 24 cm polypropylene bag. 1 ml of 18 h culture of primary selected LAB, which was used as an

inoculum, was added into 25 g of grass or corn preparation and then evacuated by sealer with an evacuating system (Maltivac, BG-Prufzert NG90131). Due to low amount of water soluble carbohydrate in grass, 1% of glucose was added to initiate grass ensiling. In control experiments, 10% of MRS medium in 0.85% NaCl was placed instead of inoculum. Triplicate samples were analysed on day 1, 2, 3, 5, 10 and 20 after ensiling.

Analysis method

The extract from silage samples was used for determination of acid contents, pH value, and water soluble carbohydrate (WSC). It was prepared by mixing 30 ml of distilled water with 10 g of ensiled sample, the mixture was standed at 4°C for 2 h and then filtered through filter paper no. 4. In order to determine of organic acid contents including lactic acid, acetic acid, propionic acid and butyric acid, the filtrate was filtered again through 0.25 µm membrane and analyzed by HPLC method. Sulfonate divinyl benzene-styrene HPX-87H column was used according to the manufacturer (BIO-RAD). The pH value and dry matter content were determined according to the method of Bolsen *et al.* (1990) and Ohyama *et al.* (1975) respectively^(8,9). Water soluble carbohydrate content was carried out by the method of Dubois *et al.* (1956)⁽¹⁰⁾. The method of AOAC (Helrich, 1990) was used to determine protein contents⁽¹¹⁾. Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were analysed by the method of Van Soest (1969)⁽¹²⁾.

RESULT AND DISCUSSION

Primary screening of LAB

Since Thailand is in the tropical area, the temperature may increase up to 40–44°C during dry season. This effect causes biological and chemical changes^(13, 14). Therefore we decided to screen particular strains according to growth at high temperature of 37°, 45°, 50° and 55°C. All isolates from fermented food grew well at 37°C but growth decreased at 45°C and neither of them grew at 50–55°C. In contrast to the isolates from silage, it was found that 50% of the isolated strains grew well at 45–50°C and then growth began to decline at 55°C. Based on relative growth activity at 37–50°C approximately equal to 60% or higher, 25 isolates were selected and designed as SM2-3, SM3-2, SM4-1, SM4-2, ST10-1, ST10-2, SM16-1, SM16-5, M1, M3, M6, M7, M10, M11, M14, M15, M17, M19, I2, I4, I10, I12, I16, I17 and I19. The reference strain grew slowly when the temperature was up to 50°C and could not grow at 55°C.

25 isolates were further screened based on lactic acid production from glucose. Only 18 isolates with %yield of lactic acid higher than 80 were selected as shown in Fig 1. When % yield of lactic acid from xylose fermentation was investigated, only ST10-1 gave higher yield of 40% whereas the others showed 7.1–31.2%.

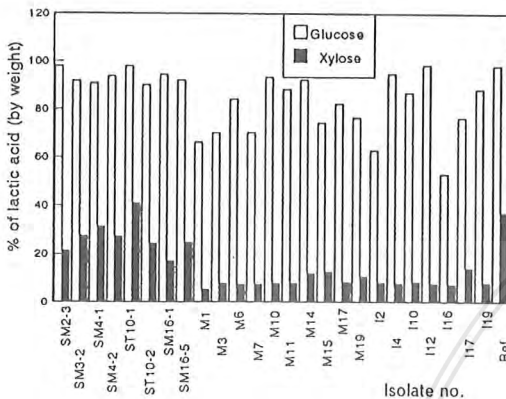


Figure 1. Yield of lactic acid production by selected LAB.

Growth at various pH level as 4, 5, 6, 7 and 8 was studied for the next screening (Fig. 2). It was found that growth of all 18 selected isolates grew slowly at low pH of 4. According to % relative growth activity of higher than 60 at pH 5-8, 8 isolates SM4-2, ST10-1, ST10-2, SM16-1, SM16-5, M6, M10 and I4, were selected.

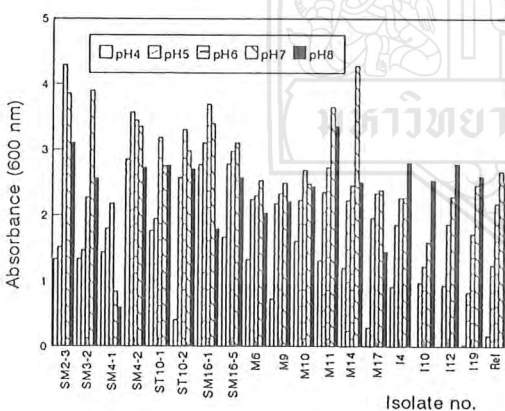


Figure 2. Growth of LAB at different pH.

8 isolates were further screened for the growth under aerobic and anaerobic conditions (Fig 3). All isolates grew equally well at both

anaerobic and aerobic conditions. However, isolate M10 was lost during experiment. Therefore only 7 isolates, SM4-2, ST10-1, ST10-2, SM16-1, SM16-5, M6 and I4 were selected.

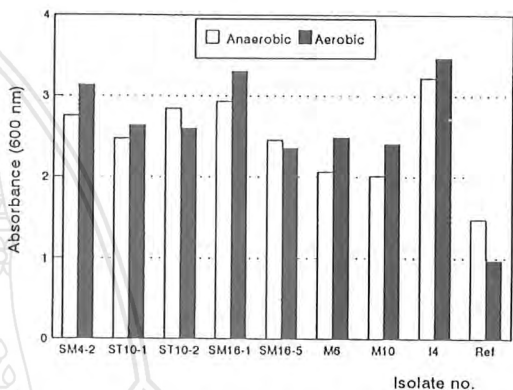


Figure 3. Growth of lactic acid bacteria under anaerobic and aerobic conditions.

Preliminary identification of selected isolates

Morphology, primary physical and biochemical tests were studied. They all showed no spore-forming, high yield of lactic acid production over 80%, no gas release during glucose fermentation, catalase negative and gram positive. These results elucidated that they all were lactic acid bacteria⁽¹⁵⁾. However they were either coccus or rod shapes. Cell of isolate SM4-2, ST10-2, SM16-1, SM16-2 and M6 were coccus and tetrad arrangement indicating that they might belong to genus *Pediococcus*, *Tetracoccus* and *Aerococcus*^(16,17). When growth at various temperature of 37, 40, 45 and 50°C and at various pH of 4.5, 5, 7.5, 8 and 8.5 were studied, all isolates were able to grow at high temperature of up to 50°C and low pH of 4.5. Wood & Holzapfel (1995) reported that both genus *Tetracoccus* and *Aerococcus* could not grow at high temperature of

50°C and low pH of 4.5 and 5 respectively⁽¹⁸⁾. Therefore these five isolates belonged to genus *Pediococcus*. Another two isolates, ST10-1 and I4 which showed rod shape may belong to genus *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Since populations in genus *Carnobacterium* can not grow at high temperature of up to 45°C and low pH of 4.5, these two isolates were clearly belonged to genus *Lactobacillus*^(18,19). All selected isolates showing good property for ensiling belonged to either *Lactobacillus* or *Pediococcus* as suggested by Wood & Holzapfel (1995)⁽¹⁸⁾.

Secondary screening of LAB

7 selected isolates were further tested on their ability of silage fermentation test at temperature of 37, 45 and 50°C. Grass and corn crops were used as raw materials for ensiling test. The ensiling with inoculation of each selected isolates or the reference strain, *Lactobacillus plantarum* IAM 1041 (WI) compared to control treatment without LAB inoculum (WOI) were performed.

For corn silage fermentation (Table 1), lactic acid contents obtained after WI treatment for 1 d were higher than the WOI treatment by 1.4 – 3.78 times, except ST10-2 and ST16-5. At high temperature of 45 and 50°C, the treatment with addition of isolate M6 provided higher lactic acid contents than the other treatments by 2.9–11.2 and 1.34 – 6.02 times respectively, whereas silage fermentation at 37°C did not show any difference between treatments. Small amount of acetic acid and propionic acid were found. Butyric acid was not found in the treatment with SM16-5, M6 and *L. plantarum* IAM1041. There-

fore the isolate M6 was selected for corn silage fermentation.

In the case of grass silage fermentation (Table 2), after 1 d of fermentation at 37°C, the WI treatment with the selected isolates and reference strains produced higher lactic acid contents than WOI treatment by 2.19–2.96 times. However, when the temperature was increased to 45 and 50°C, only the isolate I4 produced higher lactic acid content than the others for 1.3–1.9 and 1.9 – 3.9 times respectively. For fermentation at 37°C, the isolates I4 produced almost equal amount of lactic acid to the isolate SM4-2, ST10-1, SM16-1, SM16-5 and *L. plantarum* IAM 1041, slightly varying in the range of ± 1.1 – 1.2 times. When other acids, such as acetic acid, propionic acid and butyric acid were determined, only small amount of acetic acid and propionic acid being less than 0.2% (on dry weight) could be found in all conditions tested. However butyric acid was not found from the silage on treatment with M6 and I4 inoculum whereas it was found in the rest of the treatments. Therefore the isolates I4 was selected for grass silage fermentation. Both LAB I4 and M6 were kept at Department of Biotechnology, Kasetsart University and designated KUB-L0014 and KUB-L0023 respectively.

Table 1. Comparison on acid production from 1 d grass ensiling by WI treatment with the selected isolates and the reference strain, and WOI treatment as a control. L, lactic acid; A, acetic acid; P, propionic acid; B, butyric acid; Ref, the reference strain.

Treatments	% acid contents produced (on dry weight) at											
	37 °C				45 °C				50 °C			
	L	A	P	B	L	A	P	B	L	A	P	B
WI SM4-2	3.58	1.59	0.96	2.61	1.32	0.88	0.49	0	1.14	0.44	0	0
ST10-1	5.64	1.39	1.17	0	2.55	0.61	0	0	1.61	2.80	0.35	0.22
ST10-2	2.20	1.53	0.29	0	2.87	1.64	0.81	0.25	0.77	1.01	0.52	0
SM16-1	3.86	1.92	0	0	2.04	0.85	0	0	0.85	1.33	0.36	0.26
SM16-5	2.11	0.9	0	0	1.26	0.69	0.38	0	0.78	0.37	0	0
M6	8.76	1.01	0	0	14.11	0.89	0	0	4.64	0.99	0.37	0
I4	6.48	1.65	0	0	4.83	1.68	0	0.33	3.44	1.17	0	0
Ref.	9.49	1.02	0	0	2.4	1.07	0	0	1.68	0.56	0	0
WOI 2.51	1.06	0	0	1.54	0.83	0	0	0.59	0.42	0	0.48	

Table 2. Comparison on acid production from 1 d grass ensiling by WI treatment with the selected isolates and the reference strain, and WOI treatment as a control. L, lactic acid; A, acetic acid; P, propionic acid; B, butyric acid; Ref, the reference strain.

Treatments	% acid contents produced (on dry weight) at											
	37°C				45°C				50°C			
	L	A	P	B	L	A	P	B	L	A	P	B
WI SM4-2	2.88	0.13	0	0	1.74	0.07	0	0	1.55	0.07	0	0.28
ST10-1	3.75	0.32	0	0	2.69	0.14	0	0.26	2.12	0.20	0.21	0.31
ST10-2	3.84	0.07	0	0	1.72	0.04	0	0.21	1.31	0.07	0	0.38
SM16-1	2.88	0.13	0	0	1.72	0.10	0	0.09	1.3	0.12	0	0.32
SM16-5	3.91	0.17	0	0	1.9	0.18	0	0.19	1.31	0.16	0	0.39
M6	3.24	0.11	0	0	2.5	0.06	0	0	2.48	0.16	0	0
I4	3.51	0.32	0	0	3.27	0.11	0	0	4.68	0.12	0	0
Ref.	3.87	0.21	0	0	2.49	0.06	0	0	1.31	0.10	0	0.19
WOI 1.31	0.05	0.11	0	1.25	0.06	0.12	0.39	0.61	0.06	0	0.55	

Effect of various temperature to physical and biochemical changes of ensiling with and without inoculum of the selected LAB

The selected isolates I4 and M6 were tested for grass and corn silage fermentation at various temperature of 30, 37, 45 and 50 °C respectively. Comparison on both physical and biochemical changes of the treatment WI and WOI were studied.

Corn silage fermentation

As shown on Fig. 4-7, under WI treatment, only 0.78, 0.6 and 0.98% of WSC were found after 5, 5 and 3 day fermentation at 30, 37 and 45 °C respectively. Then small increment of WSC could be observed. At high temperature of 50 °C, either low WSC consumption or high degradation of insoluble carbohydrates resulted in higher residual WSC of 2.7-4.02% (on dry weight). The residual amount of WSC obtained from WI and WOI treatment at 30-45 °C was rather the same. However at 50 °C WOI treatment showed lower residual amount of WSC than WI. It was possible that the treatment without inoculum at high temperature provided faster growth and substrate consumption of the other organisms existing during fermentation.

Consumption of WSC caused the decrease in pH values in both WI and WOI treatment. After 1 d fermentation with WI treatment at high temperature of 37-50 °C, faster pH drop to 3.8-4.1 was obtained whereas the pH at 30 °C treatment was 4.7. It seemed that high temperature led to high fermentation rate. In WOI treatment, pH was still at relatively high values of 4.4-5.7 for all ranges of temperature. Therefore it elucidated

that better ensiling especially at high temperature could be obtained on treatment with bacterial inoculation.

After 20 d fermentation, pH level of WI treatment was 4.07, 3.71, 3.56 and 4.0 at 30, 37, 45 and 50 °C respectively whereas WOI treatment resulted in higher pH of 4.3, 4.19, 6.3 and 6.45 respectively. Lactic acid content produced in WI treatment were 3.9, 3.92, 6.21 and 2.38% (on dry weight) which were higher than in those obtained in WOI by 1.9, 2, 9.7 and 5.5 times at 30, 37, 45 and 50 °C respectively. During fermentation, low amount of acetic acid were found, and the ratio of lactic acid to acetic acid was 0.79-5.58, 1.6-5.7, 1.69-12.13 and 2.4-4.12 at 30, 37, 45 and 50 °C respectively under WI condition which were higher than those found under WOI condition. Neither propionic acid nor butyric acid were found from both conditions after 20 d fermentation.

If we looked at lactic acid production during 20 d corn ensiling at high temperature of 37-50 °C, the content was at the maximum value rapidly at 2.4-6% and then maintained constant. Lactic acid bacteria could use lactic acid, when other carbon sources are not available to produce more acetic acid, succinic acid and carbon dioxide⁽²⁰⁾. This might explain the high contents of acetic acid found.

Considering animal feed nutrition (Table 3), supplement of inoculum has no effect on protein content, NDF and ADF values at low temperature of 30-37 °C. However it could bring about low content of ADF and NDF at high temperature of 45-50 °C due to better hydrolysis.

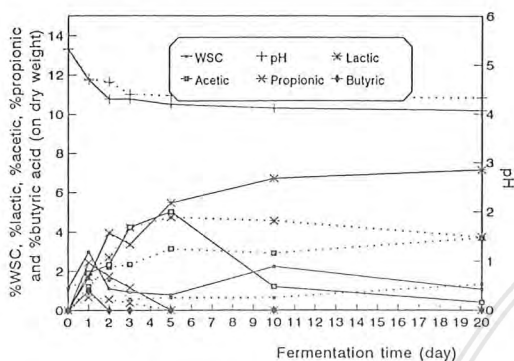


Figure 4. Comparison of biochemical changes during corn silage fermentation with (-) and without (...) biocatalysts at 30°C

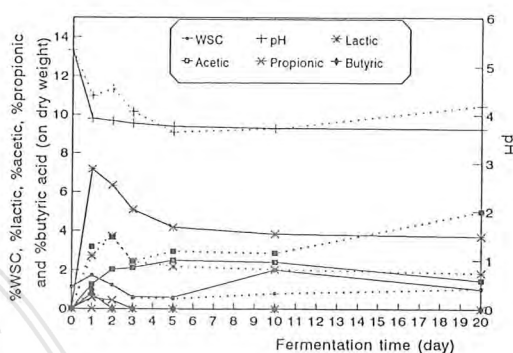


Figure 5. Comparison of biochemical changes during corn silage fermentation with (-) and without (...) biocatalysts at 37°C

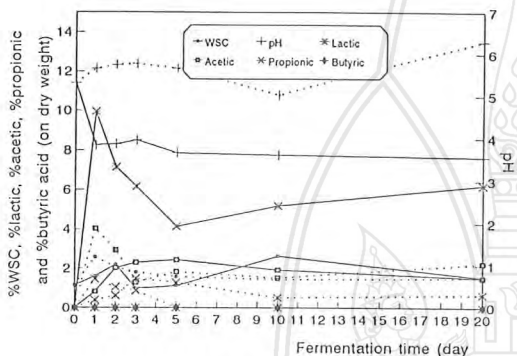


Figure 6. Comparison of biochemical changes during corn silage fermentation with (-) and without (...) biocatalysts at 45°C

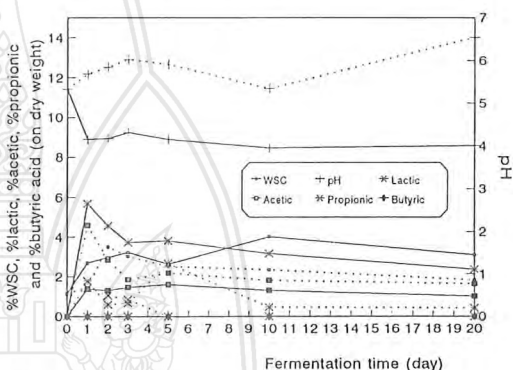


Figure 7. Comparison of biochemical changes during corn silage fermentation with (-) and without (...) biocatalysts at 50°C

Table 3 Some nutritional values of 20 d corn silage (as percentage of dry mass weight) at temperature of 30, 37, 45 and 50°C. WI, ensiling with inoculant M6; WOI, ensiling without inoculant; ADF, acid detergent fiber; NDF, neutral detergent fiber.

Nutritional values (% g/g)	WOI (°C)				WI (°C)			
	30	37	45	50	30	37	45	50
Protein	7.31	6.36	7.42	5.83	7.44	6.48	6.36	6.34
ADF	44.73	51.79	52.81	52.49	44.09	49.19	46.77	40.5
NDF	63.85	76.32	80.5	81.23	74.69	77.97	75.75	66.82

Grass silage fermentation.

As shown on Fig. 8-11, the amount of WSC in the WI treatment decreased rapidly after 1 d fermentation comparing to those in WOI treatment, by 1.37, 2.44, 3.21 and 1.58 times at 30, 37, 45 and 50°C respectively. After then WSC content decreased continuously in both conditions. These caused low pH of 5.08, 4.33, 4.13 and 4.72 in WI treatment and 5.3, 5.1, 5.2 and 5.5 in WOI at 30, 37, 45 and 50°C respectively. However, after 2 d fermentation, it seemed that pH values in WOI treatment risen up rapidly again whereas those in WI treatment remained for 20 d fermentation. It clearly elucidated that addition of inoculum was able to decrease pH value more rapidly than without inoculum. When lactic acid content was investigated, it was found that lactic acid contents in WI treatment was higher than those in WOI by 3.05, 2.98, 8.23 and 1.38 times at 30, 37, 45 and 50°C respectively after 1 d fermentation. Lactic acid content obtained in WI treatment decreased after 3 d-fermentation and then remained constant during 20 d ensiling. The amount of lactic acid obtained were 2, 2.02, 3.6 and 1.07% (on dry weight) at 30, 37, 45 and 50°C respectively. However only 1.05, 1.05, 0.23 and 0.31% (on dry weight) of lactic acid were found in the WOI treatment. It was clearly shown that addition of inoculum caused higher lactic acid formation.

When acetic acid production was studied in terms of lactic acid (L)/acetic acid (A) ratio, the result showed that the acid content was high with a wide range of L/A ratio of 0.2-0.9, 0.28-1.75, 0.49-2.56 and 0.3-3.41 at 30, 37, 45

and 50°C respectively. The L/A values from WI treatment were higher than in WOI by 2-5 times. In addition, butyric acid was not found in WI treatment but was found in the WOI treatments. Due to high acetic acid content, the grass ensiling was not quite successful in both WI and WOI treatments. Owing that raw material preparations in this study were conducted without compression, it might cause less grass juice containing some nutrients for microbial growth. Kimura and his coworker (1997) reported that addition of fermented alfalfa juice with 2% of glucose for ensiling provided higher lactic acid by 16-24 times⁽²¹⁾. Therefore alternative way to enhance ensilage should be further considered as well.

Nutritional investigation exhibited that WI treatment produced higher protein content and lower ADF content than the WOI treatment (Table 4). It seemed that the treatment with addition of biocatalysts provided high nutrition values.

From the above results, there was no doubt that use of microorganism inoculum as an additive will be one way to improve the quality of silage, especially when silage is operated at the wide temperature range.

ACKNOWLEDGEMENT

We wish to express our thanks to National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Ministry of Science, Technology and Environment building.

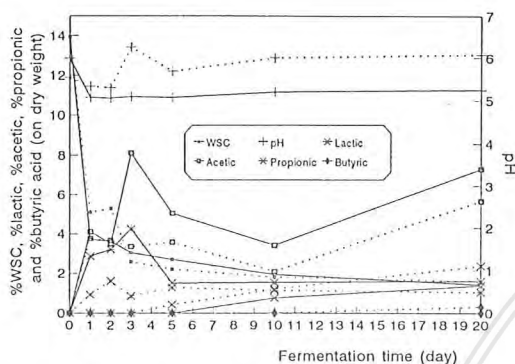


Figure 8. Comparison of biochemical changes during corn silage fermentation with (-) and without (...) biocatalysts at 30°C

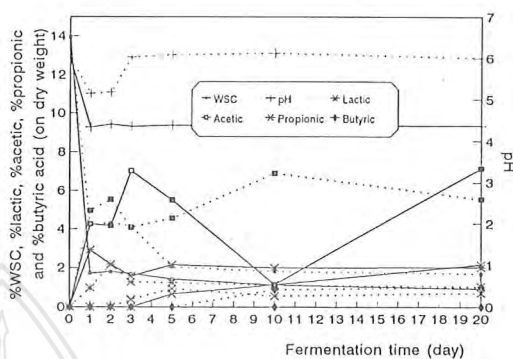


Figure 9. Comparison of biochemical changes during corn silage fermentation with (-) and without (...) biocatalysts at 37°C

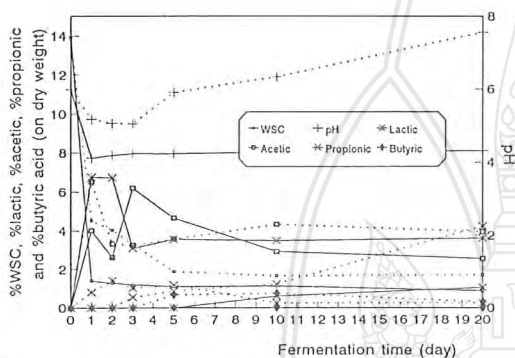


Figure 10. Comparison of biochemical changes during corn silage fermentation with (-) and without (...) biocatalysts at 45°C

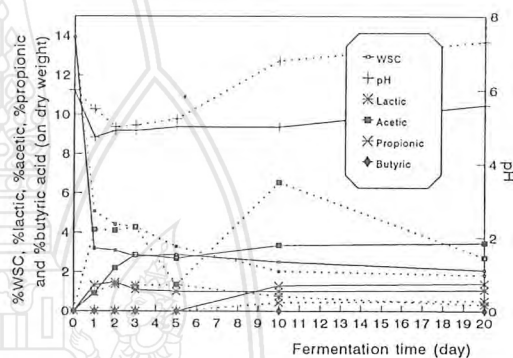


Figure 11. Comparison of biochemical changes during corn silage fermentation with (-) and without (...) biocatalysts at 50°C

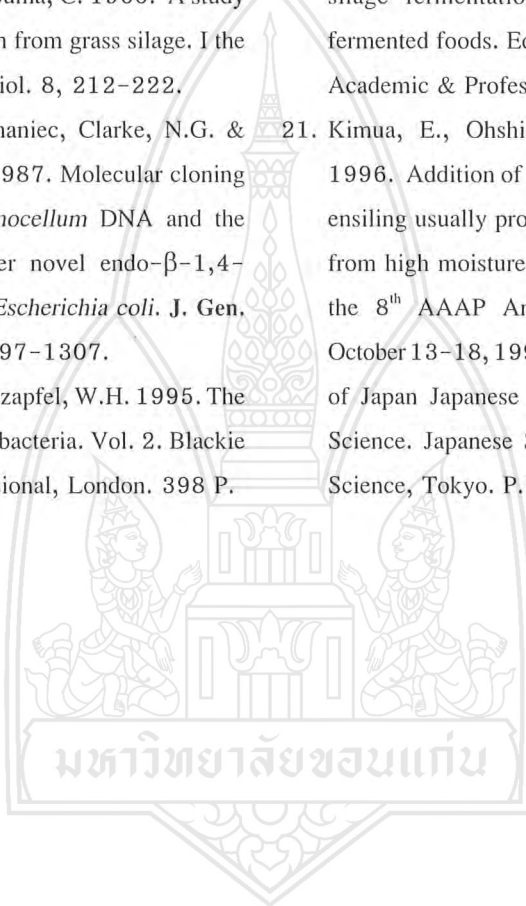
Table 4 Some nutritional values of 20 d grass silage (as percentage of dry mass basis) at temperature of 30, 37, 45 and 50°C. WI, ensiling with inoculant I4; WOI, ensiling without inoculant; ADF, acid detergent fiber; NDF, neutral detergent fiber.

Nutritional values (% g/g)	WOI (°C)				WI (°C)			
	30	37	45	50	30	37	45	50
Protein	4.78	4.93	4.50	4.62	5.93	6.25	6.68	6.00
ADF	19.06	20.73	28.43	28.13	18.64	16.90	16.31	18.6
NDF	41.58	41.66	39.58	36.54	42.76	43.84	44.90	39.72

REFERENCES

1. Lin, C., Bolsen, K.K., Brent, B.E. & Fung, D.Y.C. 1992. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling periods of alfalfa and maize. **J. Appl. Bacteriol.** 73, 375-387.
2. Nadeau, E. M. G. 1997. Cellulase and bacterial inoculant effects on cocksfoot a lucerne ensiled at high dry matter levels. **J. Sci. Food Agric.** 73, 369-376.
3. Shaver, R.D. & Batajoo, K.K. 1995. Fermented feeds and feed products. In Enzyme, Biomass, food and feed. Reed G. & Nagoda T.W. (eds.). Vol 9. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH. P. 771 - 783.
4. Gordon, F.J. 1989. An evaluation through lactating cattle of a bacterial inoculant as an additive for grass silage. **Grass and forage Science.** 44, 169-179.
5. Harrigan, W. F. & Margaret, E. M. 1976. Laboratory method in food and dairy microbiology. London: Academic Press. P. 258 - 276.
6. Cole, R. M. & Popkin, T. J. 1981. Electron microscopy. In : Manual of methods for general bacteriology. Eds.: Gerhardt, P., Murray, . G. E., Costilow, . N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. & Phillips, G. B. American Society for microbiology, Washington. P. 34-51.
7. Tanaka, O. & Ohmomo, S. 1994. A repeatable model system for silage fermentation in culture tubes. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58, 1407-1411.
8. Bolsen, K. K., Curtis, J.L., Lin, C. J. & Dickerson, J. T. 1992. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **J. Dairy Sci.** 75, 3066-3083.
9. Ohyama, Y., Masaki, S. & Hara, S. 1975. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **J. Sci. Food Agri.** 26, 117.
10. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry.** 28, 350-356.
11. Helrich, K. 1990. Official methods of analysis of the association of official analytical chemist. 5th ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemist, Inc. 1298 P.
12. Van Soest, P. J. 1969. Newer knowledge on the composition and methods of analysis of feeding stuffs. **International Encyclopedia of Food and Nutrition.** 10, 37-58.
13. Tamada, J., Yokota, H., Ohshima, M. & Choi, I. 1996. Effect of application of cellulase and lactic acid bacteria inoculant on the fermentation quality of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) silage. In: Proceedings the 8th AAAP Animal Science of Zootechnical Science. Japanese Society of Zootechnical Science, Tokyo. P. 256 - 257.
14. Zhang, J. G., Kumai, S., Cai, Y. M. & Fukumi, R. 1996. Effects of environmental temperature and cellulase additive on the silage fermentation quality. In: Proceedings

- the 8th AAAP Animal Science of Zootechnical Science. Japanese Society of Zootechnical Science, Tokyo. P. 892 - 893.
15. Cogan, T.M. & Accolas, J.-P. 1996. Dairy starter cultures. VCH Publisher, New York . P 1-23
16. Langton, C.W. & Bouma, C. 1960. A study of the microorganism from grass silage. I the cocci. Appl. Microbiol. 8, 212-222.
17. Marck, P. M., Romaniec, Clarke, N.G. & Hazzlewood, G.P. 1987. Molecular cloning of *Clostridium thermocellum* DNA and the expression of further novel endo- β -1,4-glucanase genes in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 133, 1297-1307.
18. Wood, B. J.B. & Holzapfel, W.H. 1995. The genera of lactic acid bacteria. Vol. 2. Blackie Academic & Professional, London. 398 P.
19. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stalely, J.T. & Williams, S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams and Wilkins, Maryland. 787 P.
20. Woolford, M.K. & Pahlow, G. 1998. The silage fermentation. In Microbiology of fermented foods. Ed. :Wood, B.J.B. Blackie Academic & Professional. P. 73 - 102.
21. Kimua, E., Ohshima, M. & Yokota, H. 1996. Addition of fermented alfalfa juice at ensiling usually provides good quality silage from high moisture alfalfa. In: Proceedings the 8th AAAP Animal Science Congress October 13-18, 1996. Vol 2. Science Council of Japan Japanese Society of Zootechnical Science. Japanese Society of Zootechnical Science, Tokyo. P.254-255



PROPERTIES OF CADMIUM SULFIDE THIN FILMS PREPARED BY CHEMICAL BATH DEPOSITION METHOD

THITINAI GAEWDANG* and NGAMNIT GAEWDANG*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการเคลือบฟิล์มบางแคดเมียมซัลไฟด์ชนิดผลึกพหุพันธ์บนกระจกสไลด์โดยเทคนิคการอาบสารละลายเคมี ซึ่งได้จากการละลายเกลือแคดเมียมซัลเฟตและไทโอยูเรียในแอมโมเนีย โดยใช้เวลาในการอาบประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิคงที่ค่าต่างๆ ระหว่าง 65-90 องศาเซลเซียส จากการศึกษาการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ของฟิล์มบางที่มีความหนาประมาณ 100 นาโนเมตร จะปรากฏพีคที่มุม 2θ ประมาณ 27.3° และจากการศึกษาผิวหน้าของฟิล์มบางด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเกรนมีขนาดประมาณ 100 นาโนเมตร รวมทั้งได้ศึกษาสมบัติพื้นฐานต่างๆ ที่เปลี่ยนไป หลังจากแอนนัลฟิล์มบางในบรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิระหว่าง 200-500 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที สมบัติพื้นฐานดังกล่าว ได้แก่ คุณภาพของผลึก ลักษณะสัณฐานของผิวหน้าผลึก การส่งผ่านเชิงแสงและความต้านทานไฟฟ้า เป็นต้น ขนาดของช่องว่างแถบพลังงานมีค่าต่ำสุดที่อุณหภูมิแอนนัลประมาณ 400 องศาเซลเซียส น่าจะประจักษ์ได้ว่าเนื้อฟิล์มบางส่วนใหญ่มีโครงสร้างผลึกแบบซิงค์เบลนด์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิแอนนัล

ABSTRACT

In this research, polycrystalline thin films of CdS were deposited on slide glass substrates in an aqueous solution containing cadmium sulfate, thiourea and ammonia about 30 min at 65-90°C. X-ray diffraction patterns of as-deposited CdS films with a thickness of about 100 nm showed only one peak at 2θ around 27.3° . From scanning electron micrographs, the grain size of thin film samples about 100 nm was observed, The effect of heat treatment, between 200-500°C in a stream with slowly flow of pure nitrogen about 20 min on some properties of thin films ; crystallinity, crystal morphology, optical transmission and electrical sheet resistance were also investigated. A minimum energy bandgap at annealing temperature around 400°C probably supported the existence of a predominant cubic phase for that annealing condition.

* Department of Applied Physics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok.

INTRODUCTION

Many efforts have been devoted to the fabrication of low cost solar cells. Thin films of cadmium sulfide (CdS) generally used as a buffer layer in a window due to its large bandgap. Cadmium telluride (CdTe) and copper indium gallium diselenide (CuInGaSe_2) have been shown to be the most promising thin film photovoltaic materials, and CdS in the most compatible with CdTe [1,2] and CuInGaSe_2 [3,4]. Various techniques have been developed to obtain CdS thin films (e.g., thermal evaporation, sputtering, chemical vapor deposition, and spray pyrolysis) but the chemical bath deposition technique (CBD) is rather simple and inexpensive. It is possible to have reproducibility, uniform and adherent films by this method. Further advantages include a chemical reaction that is controllable by adjusting the pH, the temperature and the relative concentrations of the various reactants in the solution ; a low deposition temperature and good stoichiometry resulting from homogeneous ion precipitation.

Several authors have reported the deposition of CdS films on various substrates with different solution compositions [5-9]. Different growth rates were observed with different salts, the higher rates being obtained with Cl^- ions and the lower ones with SO_4^{2-} and I^- ions [5,10]. The analysis of CdS films grown with different cadmium salts by using XPS and EPMA techniques in to the films in iodide and sulfate based CBD, no anion contamination was detected [5,10]. However, a few literatures were reported about the use

of cadmium sulfate salt so that it seemed worthwhile to consider this salt.

In this paper, the deposition of CdS thin films on slide glass substrates from an aqueous solution containing cadmium sulfate, thiourea and ammonia with pH around 11.7 has been investigated. Sample annealed at different temperatures in a pure nitrogen atmosphere were characterized by means of scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), transmission spectra and resistivity measurements.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Sample preparation

The depositions took place on slide glass substrates (area 12×25 mm) cleaned with detergent, degreased with trichloroethylene, acetone, ethanol and distilled water in an ultrasonic cleaner. Subsequently, slide glass substrates were etched in a 4% HF solution for 10 min and finally dried with a stream of nitrogen. The chemical bath employed in the deposition process, by using the Dona and Herrero's recipe [11], consisted of immersing the substrate in an aqueous bath containing 2.5×10^{-2} M CdSO_4 , 3.5×10^{-2} M $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, 1.68 M NH_3 (25%), pH values between 11.2 - 11.7 and bath temperature fixed at desired temperature, i.e., 65, 70, 80 and 90°C. All solutions were freshly prepared to certify the reproducibility of the process. The slide glass substrates were placed vertically in 200 ml beaker. This was placed in water bath at a constant temperature. CdSO_4 solution was added first to the NH_3 solution under constant stirring

followed by addition of the thiourea solution. After a few minutes, the solution became slightly yellow, and a thin film deposition appeared on the substrate surface. The chemical reaction was completed after about 30 min. The average deposition rate of CdS films was 2–3 nm/min [7]. CdS films were annealed at 200 – 500°C in a stream with slowly flow of pure nitrogen about 20 min.

The crystal structure of these films was checked by the X-ray diffraction technique with a Philips diffractometer using $\text{CuK}\alpha$ radiation. Surface morphology and film thickness were examined by JEOL model JSM – 6400 scanning electron microscope. The film compositions were confirmed by the energy dispersive X-ray analysis (EDAX). The optical transmission spectra were obtained by means of a UV/VIS Jasco 7800 spectrophotometer. Ohmic contact was made by four colinear electrodes of silver paste onto the surface of a CdS film. The contact separation was about 3 mm, the voltage drop across the two inner electrodes was measured by using a Fluke 8842A digital multimeter. The current is passed through the outer electrodes was measured by using a Keithley 614 electrometer. The sheet resistance was performed, at room temperature, in the darkness and also under illumination by an iodine lamp with an intensity of about 5 mW/cm².

RESULTS AND DISCUSSION

The films obtained by this method, after ultrasonic cleaning, were smooth, uniform, reflective adherent and bright orange in color.

The best homogeneity and transparency was obtained for films deposited in the range from 65 to 90°C having thickness between 50–60 nm with deposition rate around 2 nm/min. The higher solution temperature provided the higher reaction rate. However, all properties of the films obtained were independent of solution temperature.

Crystallography and morphology of CdS films

CdS exists in two crystallographic modifications : the hexagonal (wurtzite) phase and the cubic (zincblende) phase. Both cubic and hexagonal structures have been reported for CBD- CdS films [1,6]. The XRD analysis of the CdS films prepared from a single deposition process did not show any diffraction peak. This seems to be due to the fact that these films were extremely thin. With the intention of obtaining films with a thickness which allows us to obtain well – defined diffractograms, we have repeated several times the deposition process. All the CdS films deposited on slide glass substrates show only one reflection peak at 2θ around 27.3°, indicating a strong preferred orientation. The peak could be associated with (002) reflection of hexagonal CdS or (111) reflection of the cubic modification. Figure 1 shows the effect of the annealing temperature on the X-ray diffraction patterns of the films. Stronger diffraction peak intensity was observed at higher annealing temperature. A significant shift in the diffraction peak position as a function of annealing temperature could not be accurately detected.

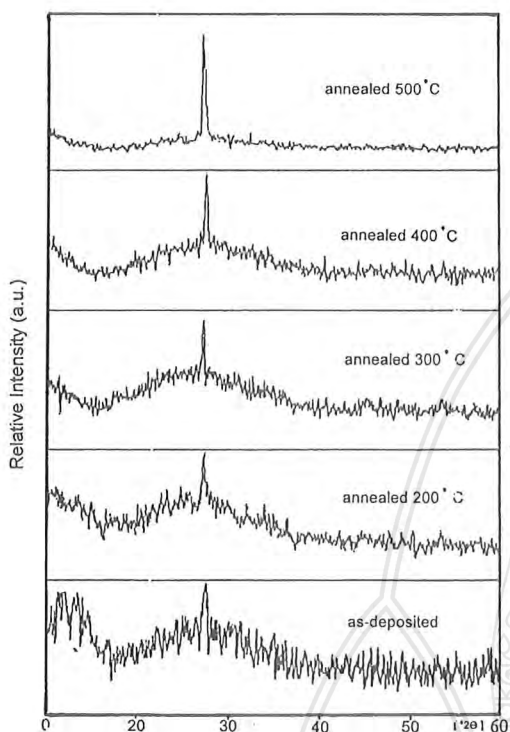


Fig. 1 X-ray diffraction patterns for CBD - CdS films annealed in a pure N_2 - atmosphere at various temperatures values for 20 minutes.

CdS powder precipitated in the solution and on the beaker's wall shows three diffraction peaks, scanning 2θ in the range of $5-60^\circ$, associated with the cubic phase. Figure 2 shows the comparison of X-ray diffraction patterns of the as-deposited CdS films with both of CdS cubic phase and hexagonal phase. The two latter ones belong to powder precipitated in the solution as described above and a high purity grade CdS powder supplied by Cerac respectively. Owing to the presence of only one diffraction peak, it is rather difficult to determine the exact crystallographic structure

of the as-deposited films. The presence of only one peak may indicate the highly oriented nature of these films, which must grow as successive alternative planes composed of only Cd or S atoms parallel to the substrate surface [12,13].

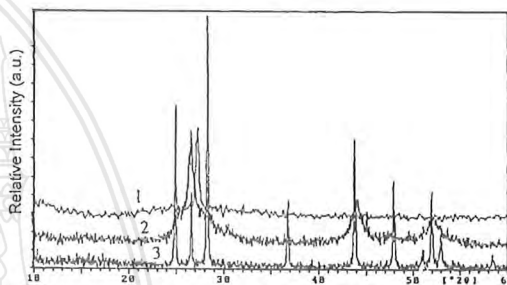


Fig. 2 Comparison of X-ray diffraction patterns of as-deposited CdS films (1), powder precipitated in the solution (2) and CdS powder standard (3).

Figure 3 shows SEM micrographs of $0.1 \mu m$ thick films prepared under a standard condition at $65^\circ C$: as-deposited sample (top), annealed at $300^\circ C$ (middle) and $500^\circ C$ (bottom). The films are continuous and mirrorlike at the naked eye, but the film color has been changed from bright orange to deep orange while the annealing temperature increases. As can be seen in the SEM micrographs, the films consist of large clusters or grains embedded in very small grains. Clusters of grains are present in the as-deposited films and the films annealed at relatively low temperature ($300^\circ C$) while only isolated grains are seen in the sample annealed at higher temperature. ($500^\circ C$). The average grain size about $100 \mu m$ is observed in Figure 3c.

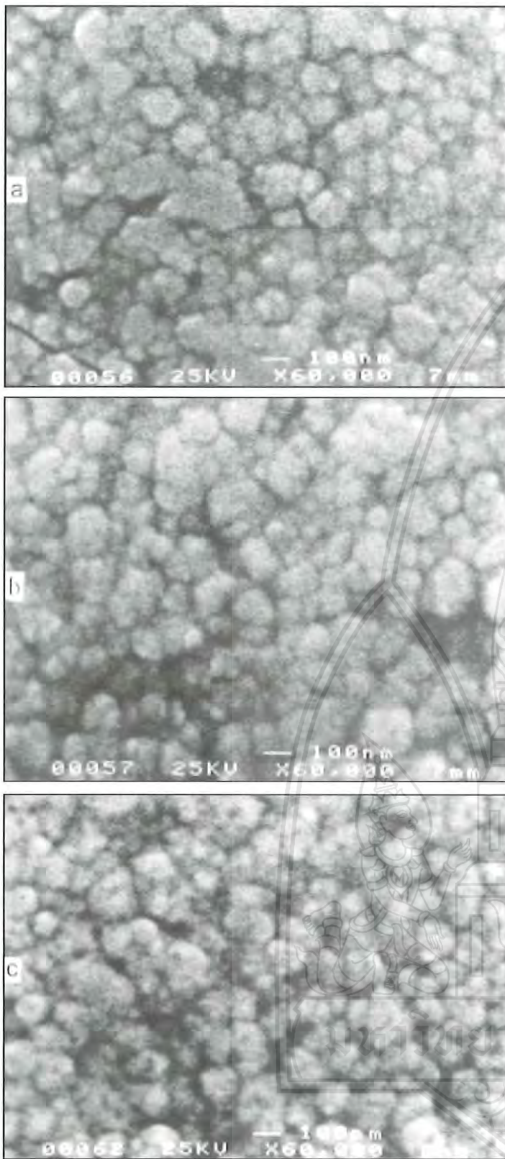


Fig. 3 SEM micrographs for CdS films : (a, top) as-deposited, (b, middle) annealed at 300°C, and (c, bottom) annealed at 500°C.

Optical properties of CdS films

Figure 4 shows spectral transmittance for as-deposited and for nitrogen annealed

samples at different temperatures. The transmittance begins to fall in longer wavelength regions when the film is annealed at higher temperature. Nevertheless, annealing temperature beyond 400°C provides the shift of band-edge transitions to shorter wavelength regions. These characteristics are also observed in CBD - CdS films prepared by using different cadmium salts [1,14]. On the basis of the percentage of transmittance (in Figure 3), among 5 samples prepared in the same bath, the sample no.3 should be the thickest one.

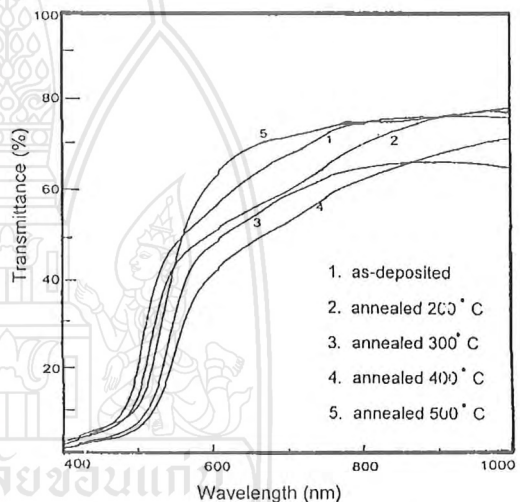


Fig. 4 Spectral transmittance for as-deposited CdS film and N_2 -annealed samples.

The absorption coefficient (α) was calculated using the expression : $T = 100 \exp(-\alpha d)$ [6], where d is the thickness of the film and T is the percentage of transmittance. In Figure 5 is plotted α^2 vs. $h\nu$ where $h\nu$ is the photon energy. By extrapolating the linear portion of the curve to the abscissa of the graph, we estimated the optical bandgap of the

as-deposited film to be equal to 2.33 eV. This value agrees very well with those reported earlier [1,7,15], slightly lower than 2.40 eV value generally accepted for bulk CdS.

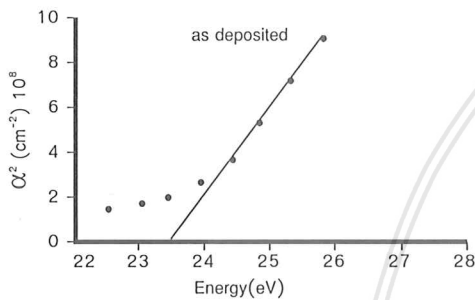


Fig. 5 The optical absorption of a CdS film for energy bandgap determination.

Figure 6 shows transmission bandgap values of CdS samples as a function of annealing temperature. A minimum bandgap was obtained at 400 °C. Energy bandgap reduction due to H₂ annealing [14], air and vacuum annealing [16,17] and S₂ annealing [1] has been previously observed in CBD - CdS films. The existence of a minimum bandgap value as a function of the annealing temperature in CdS semiconductor compound is not a simple problem and has not been fully understood up to now [1,6]. It is possible that together with the cubic structure, the hexagonal one is present in the as-deposited films. At annealing temperature up to 400 °C, the decrease of the energy bandgap would be due to the predominance of the cubic phase. Supporting this assumption is that difference in energy bandgap value between hexagonal and cubic structure is quoted in reference 6 to be less than 0.1 eV. A difference

equals to this value, is observed in our experiments. On the other hand, the decrease of the energy bandgap for samples annealed at temperature up to 500 °C in nitrogen atmosphere occurs without tails in the transmission spectra. Other effect causing a decrease in energy bandgap such as defects or disorder, would produce band tails.

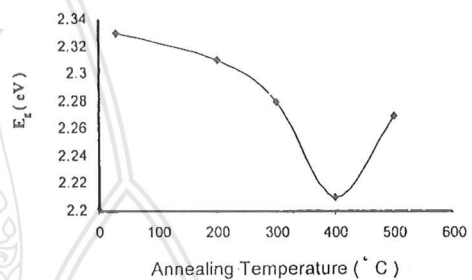


Fig. 6 Transmission energy bandgap value of CdS as a function of N₂-annealing temperature.

Electrical properties of CdS films

Electrical conductivity type of CBD - CdS films checked by Hall Effect is n-type. At room temperature, the dark sheet resistance and the illuminated sheet resistance of as-deposited films are about 2×10^6 and 7×10^5 Ω/cm^2 respectively. The decrease in sheet resistance under illumination is probably due to the excess carriers in the grains introduced by the absorption of above energy bandgap radiation and the lowering of potential barriers at grain boundaries [7]. Figure 7 shows the sheet resistance of CdS films as a function of annealing temperature without illumination and under illumination by an iodine lamp. As annealing

temperature increases, the dark sheet resistance value of films decreases from 2×10^6 to 3×10^3 Ω/cm^2 , saturated in the range $200 - 300^\circ\text{C}$, and then increases from 2×10^4 to 3×10^7 Ω/cm^2 .

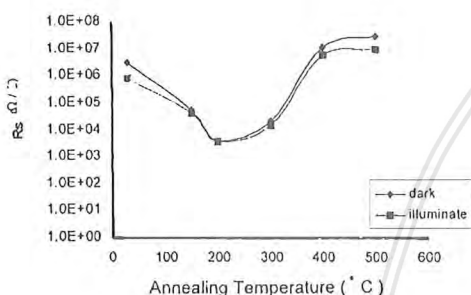


Fig. 7 Sheet resistance as a function of N_2 - annealing temperature.

Under illumination conditions, the similar behavior is also observed. The decrease in sheet resistance as the increase of annealing temperature probably is due to the enhancement of the particle size and the crystallinity [13, 18]. However, annealing temperature beyond 300°C the formation of some defects such as sulfur vacancies or complexes can play a significant role in enhancement of sheet resistance [1]. These phenomena are also observed by some authors [8,18].

CONCLUSION

CdS thin films have been deposited on slide glass substrates by a chemical bath deposition method using an aqueous solution of cadmium sulfate, ammonia and thiourea at $65 - 90^\circ\text{C}$. The optical transmission of these samples have a high transmission region (over 65%) with a transmission edge which corresponds to

an energy bandgap of 2.33 eV. The dark sheet resistance is the range $10^5 - 10^6$ Ω/cm^2 . This dark sheet resistance is lower than the one of CdS films prepared by other method. From X-rays diffraction technique, all the CBD - CdS films show only one reflection peak at 2θ around 27.3° . On the basis of a minimum energy band-gap at annealing temperature around 400°C and X-ray diffraction patterns of CdS powder precipitated in the solution, the prevalence of the cubic phase over the hexagonal one is probably present in the as-deposited films. Any-way, further work is necessary to determine real structure of as-deposited films. It has been also observed that the nitrogen annealing results in a significant change in some properties, e.g., crystallinity, crystal morphology, optical transmission and electrical sheet resistance. Thus by making use of nitrogen annealing, the characteristic properties of CdS films can be tailored to any desired value required for optoelectronic devices. These CBD - CdS films may be also suitable for the applications of CdTe and CuInGaSe_2 solar cells as a heterojunction partner.

ACKNOWLEDGMENTS

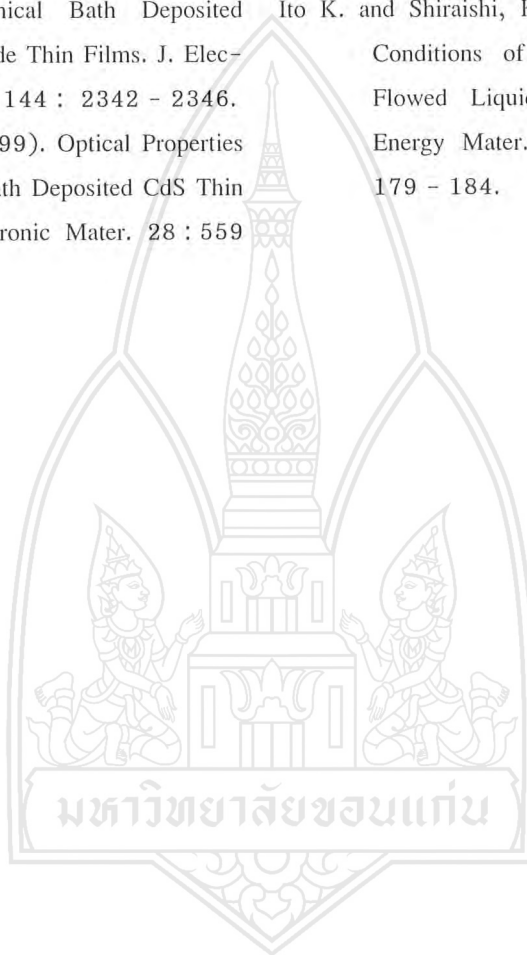
The authors thank Dr. E. Hunniwat and Asst. Prof. N. Suttisiri for X-ray diffraction measurements, Asst. Prof. A. Srongprapa for electrical resistivity measurements, Assoc. Prof. A. Kongsakpaisarn for optical transmission measurements, and Mr. J. Tongcharoen and Mr. A. Kamontawikul for technical assistance. They are also grateful to Asst. Prof. S. Chatraporn, Asst.

Prof. Dr. K. Yoodee, Asst. Prof. Dr. T. Wongcharoen and Dr. C. Poo-Rakkiat for their useful discussions. This work was partially supported by Faculty of Science KMITL.

References

- Hernandez, L. et. al. (1994). Electro - Optical Characterization of Sulfur - Annealed Chemical Bath Deposited CdS Films. *J. Electrochem Soc.* 141 : 3238 - 3241.
- Song, W. et. al. (1996). Fabrication of High Efficiency CdTe Thin Film Solar Cells Using Electrodeposition. *Proceeding of 25th IEEE Photovoltaic Specialists Conf.*, Washington, D.C. : 873 - 876.
- Chatraporn, S. et. al. (1996). The CuInSe₂ Based Solar Cell Program at Semiconductor Physics Research laboratory (SPRL). *Proceeding 2nd Japan - Thailand Joint Seminar on Photovoltaics* : 32 - 36.
- Devaney, W.E. et. al. (1990). Structure and Properties of High Efficiency ZnO/CdZnS/CuInGaSe₂ Solar Cells. *IEEE Transactions on Electron Devices.* 37 : 428 - 433.
- Hishimoto, Y. et. al. (1995). CdS Thin Film Deposited in Iodide - Containing Chemical Bath. *Jpn. J. Appl. Phys.* 34 : L382 - L385.
- Nakanishi, T. and Ito, K. (1994). Properties of Chemical Bath Deposited CdS Thin Films. *Sol. Energy Mater. and Solar Cells* 35 : 179 - 184.
- Chu, T.L. et. al. (1992). Solution Grown Cadmium Sulfide Films for Photovoltaic Devices. *J. Electrochem. Soc.* 139 : 2443 - 2446.
- Tanguank, S. (1996). Preparation of Cadmium Sulfide Thin Film for Solar Cells by Chemical Bath Deposition Technique. Master Degree Thesis, Chulalongkorn University.
- Nicolou et. al. (1990). ZnS, CdS and Zn_{1-x}Cd_xS Thin Films Deposited by the Successive Ionic Layer Adsorption and Reaction Process. *J. Electrochem. Soc.* 137 : 2915 - 2924.
- Mauch, R.H. et. al. (1991). Optimization of Windows in ZnO - CdS - CuInSe₂ Heterojunction. *Proceeding of 22nd IEEE Photovoltaic Specialists Conf.*, Las Vegas : 898 - 902.
- Dona, J.M. and Herrero, J. (1997). Dependence of Electro - Optical Properties on the Deposition Conditions of Chemical Bath Deposited CdS Thin Films. *J. Electrochem. Soc.* 144 : 4091 - 4098.
- Dona, J.M. and Herrero, J. (1997). Chemical Bath Deposition of CdS Thin Films : An Approach to the Chemical Mechanism Through Study of the Film Microstructure. *J. Electrochem. Soc.* 144 : 4081 - 4090.
- Gaewdang, Ng. and Gaewdang, T. (1999). Preparation and Some Properties of Cadmium Sulfide Semiconductor. *Journal of Science Ladkrabang* 9 : 25 - 29.

- Danaher, W.J. et. al. (1985). Influence of Heat Treatment on Some Properties of Cadmium Sulfide Thin Films. *Sol. Energy Mater.* 12 : 137 - 141.
- Isaiah, O.O. and Chow, L. (1997). Optimization of Chemical Bath Deposited Cadmium Sulfide Thin Films. *J. Electrochem. Soc.* 144 : 2342 - 2346.
- Mahanty, S. et. al. (1999). Optical Properties of Chemical Bath Deposited CdS Thin Films. *J. Electronic Mater.* 28 : 559 - 562.
- Guillen, C. et. al. (1998). Accurate Control of Thin film CdS Growth Process by Adjusting the Chemical Bath Deposition Parameters. *Thin Solid Films* 335 : 37 - 42.
- Ito K. and Shiraishi, K. (1994). Preparation Conditions of CdS Thin Films by Flowed Liquid Film Method. *Sol. Energy Mater. and solar Cells* 35 : 179 - 184.



Analysis of Leachate Characteristics of Sanitary Landfill in Tropic Condition – A Case Study of the Air Hitam Sanitary Landfill, Puchong, Selangor

*Md. Mizanur Rahman¹, Mohd Nasir Hassan², Mohamed Daud³,
Mohd. Zohadie Bardaie⁴, Zamri Abdul Rahman⁵, Azni Idris⁶ and Mohamed Noor⁷*

Abstract

Landfill leachate quality has remained as a major cause of concern as its characteristics vary with refuse composition, meteorological factors, and landfill age. Treatment of such leachates of varying characteristics needs frequent adjustments in the leachate treatment processes in order to meet the required standards of the effluent discharged. A case study from Air Hitam Sanitary Landfill (AHSL) has been conducted to identify the leachate characteristics and to investigate the performances of the leachate treatment process used. Several parameters were selected for analysis, namely DO, BOD, COD, Ammonia Nitrogen, TDS, TSS, Conductivity and Heavy Metals. Samples were collected from leachate collection ponds and were analysed in the laboratory following the standard procedures. Study showed that leachate produced by the landfill was of moderate strength for most of the conventional parameters such as BOD₅, COD, NH₃-N, TSS, pH and indicative of relatively young landfill. Concentration of heavy metals such as Hg, Cd, Cr, Pb, As were found to be marginally higher than the standard limits (Standard B) set by DOE except for Fe. It can be inferred from the analysis of leachate concentrations that the Air Hitam Sanitary Landfill, as a whole, is now in its anaerobic methanogenic stage of decomposition process. With the variations of leachate quality performance of the leachate treatment plant also varies but no significant relationship could be established.

1 Researcher, Expert System for EIA (ESEIA) Research Project ;

2 Associate Professor , Department of Environmental Sciences

3 Associate Professor, and Head, ESEIA Research project;

4 Professor in Systems Engineering, and Researcher, ESEIA Research Project ;

5 Landfill Manager, Worldwide SITA Env. Management Sdn. Bhd.

6 Associate professor, Chemical and Environmental Engineering

7 Researcher, Department of Environmental Sciences

Universiti Putra Malaysia (UPM) 43400 UPM-Serdang, Selangor, Malaysia

1. INTRODUCTION

The disposal of solid wastes through landfills is a growing practice in Malaysia (Hassan *et al.*, 1998). After solid waste is placed in the landfill, water containing dissolved constituents is squeezed out of refuse compressions and compaction in the fills. Water is also produced during decomposition. These processes, along with precipitation percolating through the landfills, eventually causes the refuse to reach the field capacity and therefore leads the liquid wastes or leachates. The composition of municipal landfill leachate has been the subject of considerable research. Landfill leachates are, in many cases, highly contaminating and can degrade surface and groundwater resources. Composition can be classified into few categories such as chemical composition, microbiological composition and organic matter composition. This leachate often contains a high concentration of organic matter and inorganic ions including heavy metals (Chian *et al.*, 1976, 1977; Roberts *et al.*, 1979). Heavy metals that exist in the leachate is used as indicator of toxicity and effects environment (Gianni, 1992).

The composition of leachate differs in terms of chemical and biological constituents. Age of the landfill and degree of stabilization has significant effects on composition of leachate (Chian and DeWalle, 1976). The concentration of leachate tends to decrease as the age of the fill increase and this enhances the leachate quality (Boltan and Evans, 1991; Ragel *et al.*, 1995; and Fatta *et al.*, 1998). This variation also depends on many other factors such as waste composition, degree of compaction, degree of rainwater

infiltration, temperature, geological condition etc. (Husain, 1989). Temperature inside the landfill plays a vital role in composting process. In a tropical condition, variation in temperature is less but the amount of rainfall varies substantially particularly during the monsoon season which plays a significant role in the amount of leachate produced and its characteristics (Tchobanoglous *et al.*, 1993).

This study aims at analyzing the leachate characteristics of the Air Hitam Sanitary Landfill under the tropic conditions and also to find out the relationships among the landfill age and leachate quality.

2. MATERIALS AND METHODS

Leachates were collected from Air Hitam Sanitary Landfill which is located in Petaling District, about 9 km from the town of Seri Kembangan. The total area of the site is 58.68 hectare with actual filling area approximately about 40.47 hectare. The fill has been in operation since the end of 1994 (considered as a young landfill) and expected to operate actively for 8 to 10 years more.

2.1 Sampling Points

Leachate samples have been collected every week from the leachate equalization pond and leachate effluent discharge pond using grab sampling methods. Samples were then preserved and analysed in the laboratory following the standard procedures as shown in Table 1. Results of the sample analysis were statistically computed to infer the conclusions.

2.2 Types of Samples

For *in-situ* measurement, grab samples were analysed for DO, pH, temperature and conductivity. For laboratory analysis, composite samples from the respective sampling points were analysed.

2.3 Selected Parameters

The following parameters were selected to analyze leachate quality i.e. DO, BOD, COD, Ammonia Nitrogen, TSS, pH, Temperature, Conductivity and Heavy Metals. All the procedures for sampling, collecting, and analysis were carried out in accordance to the Standard Method (APHA, 1989). The following table shows the methods of analysis of selected parameters.

Table 1. Methods of Analysis of Selected Parameters

Parameters	Unit	Methods
DO	mg/l	DO meter
PH		pH meter
BOD ₅	mg/l	Winkler method
COD	mg/l	Hach kit
TSS	mg/l	Standard Methods: Total suspended solid dried at 103-105°C
TDS	mg/l	Standard Methods: Total dissolved solid dried at 180°C
Nitrogen (ammonia)	mg/l	Hach kit
Temperature	°C	Thermometer
Conductivity	µmhos/cm	Conductivity meter
Heavy metals	mg/l	AAS (Model: GBC 903 Single Beam)

3. RESULTS

3.1 Wastes Composition of the Air Hitam Landfill

The Air Hitam Sanitary Landfill (AHSL) began to receive solid wastes from different municipalities of Selangor and Kuala Lumpur on December 1995. Until July 1999, total amount of wastes disposed was 1.15 million

tons. Table 2 and 3 shows the tonnage percentage of different types of wastes measured in a sample study for two weeks observation and the composition of wastes deposited (Wong, 1997). However, the types of wastes and the composition remained same till date as the sources of wastes for AHSL remained same.

Table 2. Amount of wastes and its Sources

Types of Wastes	Total Amount (in Metric Tons)					Distribution of wastes (%)
	1995	1996	1997	1998	1999	
Domestic Wastes	1625	143976	143754	175022	177097	41.67
Garden Wastes	126	11160	11143	13567	13728	3.23
Commercial Wastes	51	4527	4519	5502	5568	1.31
Industrial Wastes	104	9260	9246	11257	11390	2.68
Mixed Wastes	288	25534	25494	31040	21408	7.39
Others	1706	151060	150826	183633	185810	43.72
Total	3900	345516	344982	420021	425000	100.00

(Source: World Wide SITA Environmental Management Sdn. Bhd., 1999)

Table 3. Average Composition of Solid Wastes deposited in AHSL

Contents	Percentage
Paper	23.56
Rubber and Plastic	9.37
Organic waste	48.32
Glass and Ceramic	4.03
Metal	5.93
Wood	4.82
Textile	3.77
Others	0.2

(Source: World Wide SITA Environmental Management Sdn. Bhd., 1999; Wong 1997)

3.2 Leachate Composition and Quality

Landfill leachates usually contain variety of chemical and biological composition in relatively higher concentration level. It is because leachate percolates through solid wastes that are undergoing decomposition both biological materials

and chemical constituents are picked up (Techobanaglou *et al.*, 1993). At present, on an average about 600 cubic meter of leachate is produced everyday. Table 4 shows the average chemical composition of leachate as sampled during January to September 1999.

Table 4. Chemical Composition of Leachate from Equalization pond of the AHSL

Parameter	Units	Range of Concentration	Parameters	Units	Range of Concentration
pH		7.5-7.9	Conductivity	µmho	480-72,500
BOD ₅	mg/l	462-7988	Arsenic (As)	mg/l	0.01-0.07
COD	mg/l	1924-19463	Chromium (Cr)	mg/l	0.01-0.35
TSS	mg/l	51-3760	Cadmium (Cd)	mg/l	0.01-1.40
NH ₃ -N	mg/l	425-2655	Nickel (Ni)	mg/l	0.07-0.42
NO ₂ ⁻	mg/l	0.03-30.60	Lead (Pb)	mg/l	0.07-0.19
NO ₃ ⁻	mg/l	0.10-98.06	Copper (Cu)	mg/l	0.01-0.11
TDS	mg/l	584-55,000	Iron (Fe)	mg/l	0.98-9.30
Alkalinity	mg/l	3495-141504	Mercury (Hg)	mg/l	0.005-0.5

3.3 Leachate Treatment Performance

Air Hitam Sanitary Landfill is using biological process with sequential batch reaction (SBR) methods of treatment. Chian (1977) suggested that biological process for leachate treatment is ideally suitable for treating leachate from a relatively young landfill. This process is less costly and easy to operate. Concentration levels of pollutants at the discharge ponds were

compared with that of equalization ponds and percentage removal capacity of the treatment process were estimated. Figure 1 to 4 shows the performance level of the leachate treatment plant (LTP) for some of the conventional pollutants. Co-relationship between the leachate pollutants and the percentage removal performance of the LTP is presented in Table 5.

Table 5. Leachate Pollutants and the performance of the LTP

Leachate Pollutants	Range of concentrations of Pollutants at the equalization pond (mg/l)	Range of Concentrations of Pollutants at the discharge point (mg/l)	Range in Performance level of the LTP (%)	Correlation coefficient and Significance level (p)
BOD ₅	462-7988	74-1514	33.6-92.49	0.5365 (p = 0.008)
COD	1924-19463	1412-3214	20.01-84.19	0.8519 (p = 0.000)
TSS	51-3760	132-1765	66.33 (max)	0.3194 (p = 0.147)
NH ₃ -N	425-2655	71.1-508	62.7-97.2	0.5114 (p = 0.006)
Cd	<0.014	0.02		
Cr ⁺⁶	<0.078	<0.12		
As	<0.038	<0.085		
Pb	0.116	0.125		
Cu	0.04	0.085		

Table 5. Leachate Pollutants and the performance of the LTP

Leachate Pollutants	Range of concentrations of Pollutants at the equalization pond (mg/l)	Range of Concentrations of Pollutants at the discharge point (mg/l)	Range in Performance level of the LTP (%)	Correlation coefficient and Significance level (p)
Mn	0.164	0.29		
Ni	0.288	0.385		
Sn	0.024	<0.04		
Zn	0.434	0.85		
Fe	6.10	5.6		
Ag	<0.10	na		

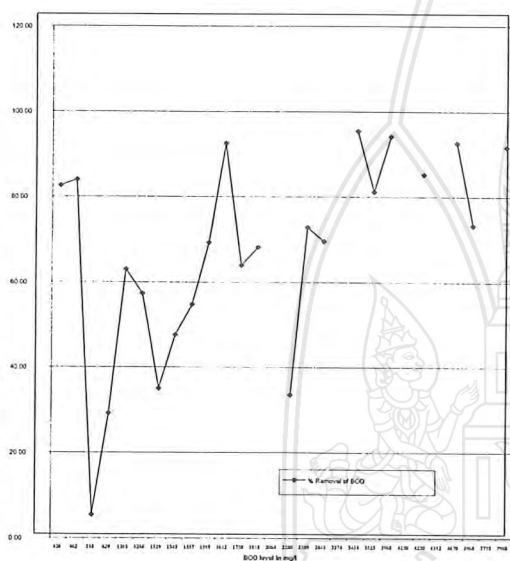


Figure 1. Performance of LTP in percent removal of BOD level in the Influent

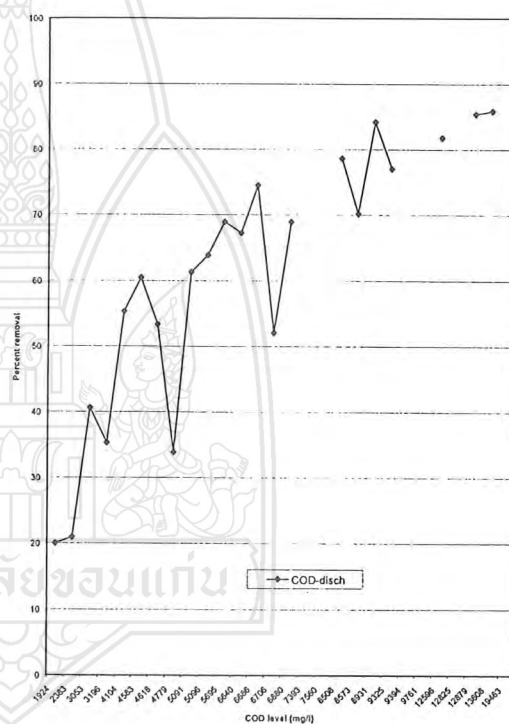


Figure 2. Performance of LTP in percent removal of COD level in the Influent

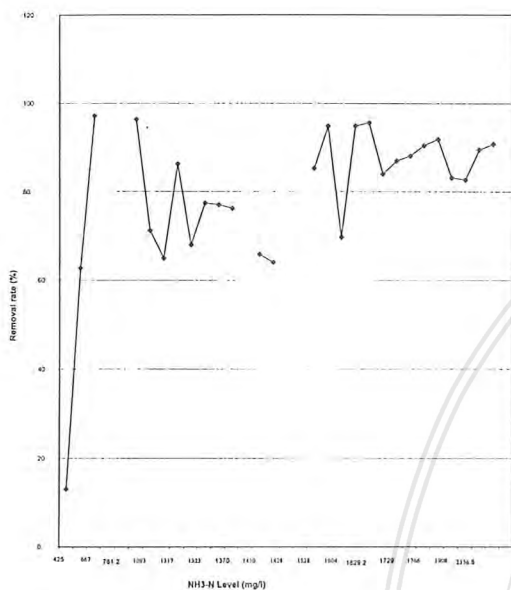


Figure 3. LTP in performance in percent removal of NH3-N level in the Leachate Influent

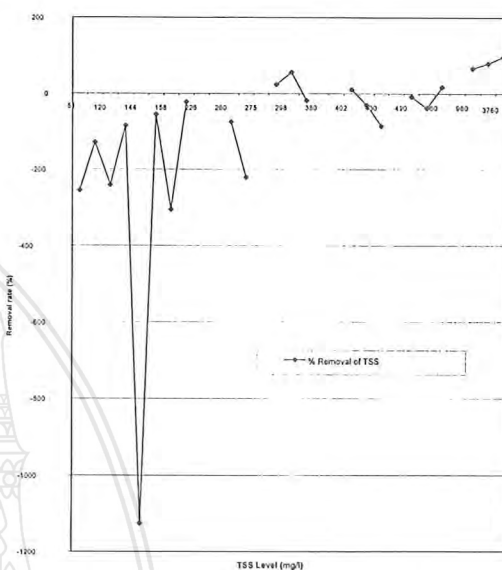


Figure 4. LTP in performance in percent removal of NH3-N level in the Leachate Influent

4. DISCUSSIONS

4.1 Leachate Characterization

Analysis of the leachates of the Air Hitam landfill site shows the high production rate of leachate which is mainly contributed by the heavy rainfall in the area (2400 mm per year) and relatively high composition of organic wastes. These contributed to dilution to the level of moderate strength of leachate.

Range of concentrations of the conventional leachate pollutants show that leachate could be termed as 'moderate strength' (Chian et al., 1976; Mendez et al., 1989).

BOD/COD ratio of the leachate ranged widely from 0.07 to 0.65 which indicates, according to Pohland (1989), that the landfill composting process is now maybe in its early 'methanogenic stage'.

High concentration of ammoniacal-nitrogen may be due to the anaerobic conditions prevailed in the landfill body that contributes to nitrite reduction towards ammonia. Hydrolysis and fermentation of organic containing protein and amino acids also contributed to high ammonia level.

Heavy metal concentrations in the leachate were relatively lower than that was found literally in other landfills of similar age. This could be explained by two factors namely waste composition and biodegradation process in the landfill. High organic contents of the waste support the comparatively low concentration of heavy metals. Average pH value of 7.5 to 8.1 in the landfill leachate indicates high precipitation of heavy metals and subsequent lower level in the leachate influent.

4.2 Leachate Treatment

According to the study conducted by Venkataramani *et al.* (1984) and Chian *et al.* (1976) on the relationship between the nature of leachates and the expected efficacy of various physical or chemical methods of organic removal, the leachates of AHSL could be treated 'good' by biological process. Sequential Batch Reaction (SBR) system of Biological methods of leachate treatment process was used in AHSL.

The performance range of removal of pollutants, as shown in Figure 1 to 4 and Table 5, shows high variations indicating very poor (< 30%) to good (80-90%) level. Statistical analysis of the performances of LTP shows that there is a very high correlation between removal percentage of COD and the COD concentration. Higher the COD level in the influent higher the performance in COD removal. On the other hand, performances of the LTP with the increase in BOD and NH₃-N level show moderate correlation i.e. 0.54 and 0.51 respectively. Very low correlation (0.32) was found in removal efficiency of TSS by LTP indicating rather a slow settling rate. However better performance was found at the higher concentration level. The fluctuation of the treatment performance could be attributed by other factors like retention time, process operational conditions, aeration rate, and ammonia /air stripping etc. (Gianni *et al.*, 1992; Uloth *et al.*, 1976).

There was not much difference found between average level of heavy metals in the leachate influents and effluents. In fact no significant conclusions could be drawn from the LTP performance on heavy metal removal. As shown

in Table 5, no visible trend in removal of heavy metal from the leachate influent was established. Heavy metal concentrations in the effluent fluctuate over the concentration level in the influent leachate. This may be attributed by the variations in heavy metal concentration in the incoming influent, settling of the particulate matters, sun drying effects.

Even with the highest achievable performance level, existing LTP could not achieve the desired level as set by DOE. Adjustment in the process with respect to retention time, coagulation & flocculation, aeration rate, sand bed filtration may be tried to improve the performance level.

5. CONCLUSION

The study concluded that the Air Hitam Sanitary Landfill is a relatively young landfill. Leachate pollutant concentration levels reveal that landfill composting process is in its methanogenic stage. Performance level of the leachate treatment plant fluctuates and except for COD., there was no significant relationship found between other leachate pollutant concentrations and the LTP performance level. Adjustment in operational process of the LTP is recommended. Existing method of leachate treatment may not be enough for further removal of heavy metal concentrations.

REFERENCES

- APHA., 1989, Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater, (17th ed.), American Public Health Association, Washington, USA.

- Boltan, K. A. and L. J. Evans. 1991. **Water, Air, and Soil Pollution**. 60:43-45.
- Chian, S. K. and F. B. DeWalle. 1976. Sanitary Landfill Leachate and Their Treatment. **Journal of the Environmental Engineering Division**. 102(2), 411-431.
- Chian, S. K. and F. B. DeWalle. 1977. Sanitary Landfill Leachate and Their Treatment. **Journal of the Environmental Engineering Division**. 11(12), 744-745.
- Fatta, D. V., C. Papadopoulos, A. and M. Loizidou. 1998. Leachate Quality of a MSW Landfill. **Journal of Environmental Science Health**. A33(5):749-763.
- Gianni, A. and P. Cannas. 1992. Chemical and Biological Characteristics of Landfill Leachate. In pages:65-88. Christensen T.H., R. Cossu and R. Stegmann (Eds). **Landfilling of Waste: Leachate**. 1e. Elsevier Applied Science, New York.
- Hassan, M.N.; Z. Zakaria; and A. R. Rakmi. 1998. Managing Costs of Urban Pollution in Malaysia: the Case of Solid Wastes. In pages: 127-147. Haan, L., P. Blaikie (Eds). **Looking at maps in the dark**. Netherlands Geographic Studies 240. AGIDS, Faculty of Environmental Sciences: Amsterdam.
- Husain, T., A. Hoda and R. Khan. 1989. Impact of sanitary landfill on groundwater quality. **Water, Air and Soil Pollution**. 45-46 (1-4):191-206.
- Mendez, R., J. M. Leena, R. Blazqwez, M. Pan and C. Forjan. 1989. Characteristic and Anaerobic Treatment of Leachate from Old and Young Landfills. **Water Science Technologies**. 145-155 pp.
- Ragel, N., J. Kissel, J. E. Ongerth and F. B. DeWalle. 1995. Composition and variability of leachate from recent and aged areas within a municipal landfill. **Journal of Water Environment Research**. 67(2):238-243.
- Tchobanaglou, G., H. Thaeisen and S. Virgil. 1993. **Integrated Solid Waste Management Engineering Principle and Management Issue**. Mc-Graw Hill, New York.
- Uloth, V.C. and D.S. Mavinic. 1977. Aerobic Bio-Treatment of a High-Strength Leachate. **The Journal of the Environmental Engineering Division**. 103 (EE4) : 647-666.
- Venkataramani, E.S.; R.C. Ahlert; and P. Corbo. 1984. Biological Treatment of Landfill Leachates. **CRC Critical Review of Environmental Contaminants**. 14(4) : 333-376.
- Wong, K.H., 1997. Carbon Dioxide and Methane Gas Emissions from a New Landfill Site at Air Hitam, Selangor. (Unpublished Dissertation for B.Sc. degree).

Bi-refrangent Fibers Polarization Mode Coupling Control for Optical Switching

P.P. Yupapin*

Abstract

This research is a study of an optical power switch using birefringent fibers with a polarization mode coupling control method. Coupled polarization modes occurred and were observed using mechanically squeezed fibers, and the selected birefringent fibers were employed and investigated. Results obtained have shown that one birefringent fiber known as the bow-tie fiber gave good coupling efficiency/switching characteristics and cross-talk effects. The optical cross-talk output of - 0.14 dB was achieved associated with an applied force of 5 N on the fiber optic switching device.

1. Introduction

An optical switch is a popular subject in the area of optical communication and networks[1-3], and optical switching techniques are a main area of research interest for future technology. Switches for optical power, wavelength routing and channel selection using such methods as mechanical, acousto-optical, thermal, magneto-optical switches are investigated. Most research concentrates on the use of simple optical components and systems, i.e. using just few optical devices[4-6].

In this work the use of birefringent fibers for optical power switching by polarization mode coupling methods are presented. The coupling power between two polarization modes occurred

which could be controlled, when the birefringent fiber was coupled to the external environment. The coupling power of 90% was achieved by using the squeezing method with the applied force of 5 N, before the fiber was broken. The advantages of this research are the use of simple methods to study the switching characteristics using the polarization mode coupling technique to control the required optical output, and the employed devices are inexpensive components. This research may improve the model of economical switching devices.

2. Theoretical background

The phase of polarized light propagating along a length (L) of birefringent fiber which is

* *Lighthwave Technology Research Center, Department of Applied Physics, Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand*

linearly polarized is expressed as [4]

$$E_{iX} = E_X \cdot e^{i(kZ - \omega t + \phi_X)} \quad (2a)$$

$$\Delta\phi = (2\pi/\lambda)\Delta nL \quad (1) \quad \text{and} \quad E_{iY} = E_Y \cdot e^{i(kZ - \omega t + \phi_Y)} \quad (2b)$$

Where λ is the light source wavelength, Δn is the optical fiber birefringence which is equal to $n_f - n_s$, n_f and n_s are the fiber refractive, and indices of fast and slow axes respectively, and L is an optical fiber length. The optical field travelling through the optical fiber as in Fig.1 is linearly polarized which is given by the relation

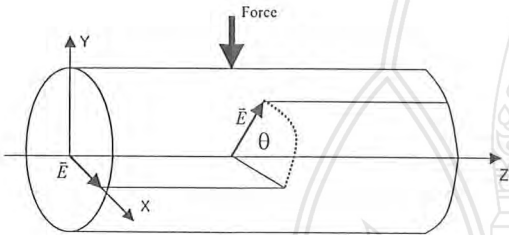


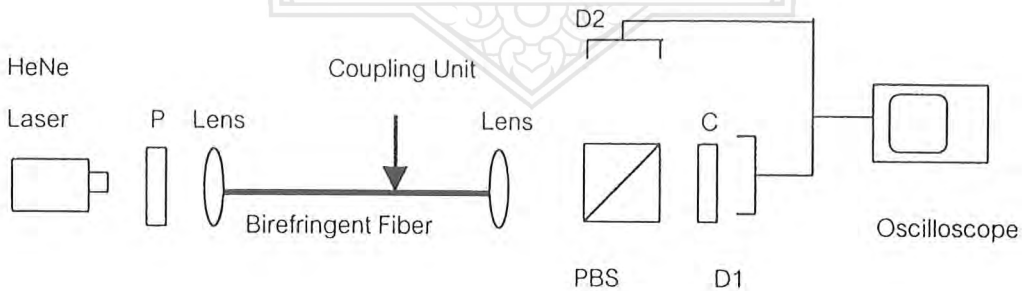
Figure 1. Illustration of light propagation in a polarization maintaining fiber.

E_x and E_y are the electrical field components which are paralleled to X and Y axes respectively, ω is the angular frequency and t is time. ϕ_x and ϕ_y are the initial phase components in the X and Y axes. Equation (2) can be expressed in terms of matrix form as

$$\begin{bmatrix} E_{iX} \\ E_{iY} \end{bmatrix} = E_o \begin{bmatrix} e^{i(kZ - \omega t + \phi_X)} \\ e^{i(kZ - \omega t + \phi_Y)} \end{bmatrix} \quad (3)$$

where E_o is an input optical field. When linearly polarized light travels into the optical system as shown in Fig.2, the relationship between the optical input and output fields is expressed as [3-5]

$$\begin{bmatrix} E_{oX} \\ E_{oY} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\theta \cdot e^{i(kZ - \omega t + \phi_X)} & -\sin\theta \cdot e^{i(kZ - \omega t + \phi_X)} \\ \sin\theta \cdot e^{i(kZ - \omega t + \phi_Y)} & \cos\theta \cdot e^{i(kZ - \omega t + \phi_Y)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e^{i(kZ - \omega t + \phi_X)} & 0 \\ 0 & e^{i(kZ - \omega t + \phi_Y)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_{iX} \\ E_{iY} \end{bmatrix} \quad (4)$$



P : Polarizer, PBS : Polarizing Beamsplitter, C : Chopper, and Ds : Detectors

Figure 2. Illustration of the experimental set up.

where ϕ_x, ϕ_y are the initial phase components parallel to X and Y axes respectively, and ϕ'_x, ϕ'_y are the new initial phase components paralleled to X and Y axes. From equation (4), the coupling power is varied with to the output polarized angle, θ , which may be desired in each of experimental cases, which is expressed as

$$\begin{bmatrix} E_{oX} \\ E_{oY} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e^{i(kZ - \omega t + \phi_x)} & 0 \\ 0 & e^{i(kZ - \omega t + \phi_y)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_{iX} \\ E_{iY} \end{bmatrix} \quad (5)$$

Where the coupling ratio of polarized light travelling through the fiber, at each coupling point is given by[4]

$$K = G[\sin(\pi Bw/\lambda)]^2 f^2 \quad (6)$$

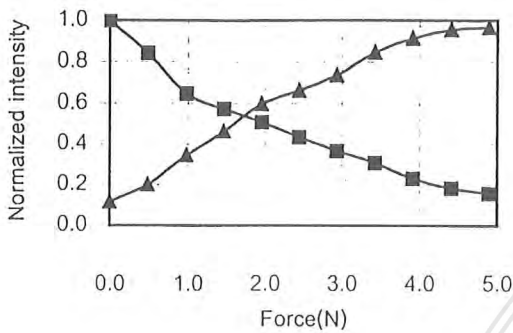
where G is a constant, λ is the light source wavelength, B is the fiber birefringence, w is the width of the coupling device (i.e. the coupling tooth width), and f is the coupling force per unit length.

3. Experiment and Results

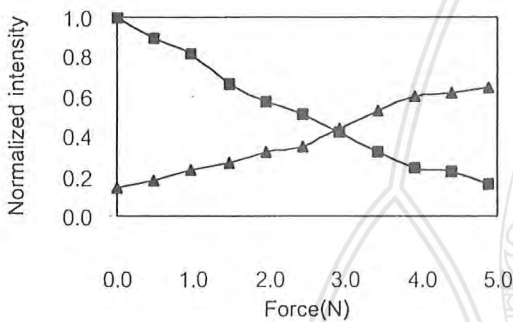
The experimental system of this study is as shown in Fig. 2. Light from a HeNe laser source with wavelength of 632.8 nm was controlled to be linearly polarized before entering into the birefringent fiber. The polarization eigenmodes could be aligned to the required input axes by controlling the input polarizer. In this study, one polarization mode was input into the birefringence fiber axis then passed to the coupling unit where the applied physical environment such as force, heat and vibration could be employed and classified. Three fiber types of birefringent fibers such as

Bow-tie, E-core and single mode fibers[4] were used for primary research. The coupling of power from one mode to another occurred, and the level of the coupling power could be measured relative to the applied physical parameters. The coupling power between polarization modes was observed using a polarizing beam splitter, then the signal was detected and shown on the oscilloscope. Three types of optical fibers were investigated as shown in Fig.3. The optical power showed switching characteristics when a force of 5 N was applied on the coupling unit. A signal to noise ratio (SNR) of 42.656 dB was achieved.

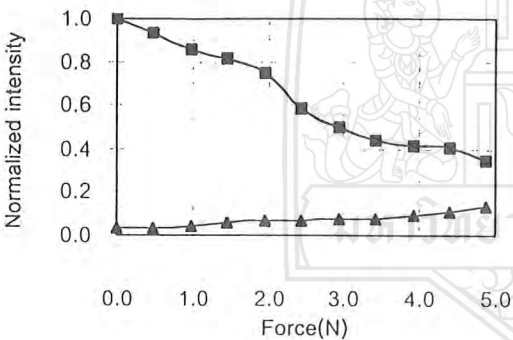
To avoid signal detection ambiguity, the mechanical chopper was employed to obtain distinct dc signals. A comparison of results from the different fibers is plotted in Fig.3. The one using a bow-tie fiber showed good switching characteristics for optical power switching. Fig. 4 shows the signal cross-talk levels. The bow-tie fiber has shown good potential for use in an optical power switching device, where the initial cross-talk of -9.329 dB was achieved. In practice, the coupling unit may be fabricated as a micro-optical device, which may realize the idea of optical switching for all optical communication as previously by discussed.



(a)



(b)



(c)

Figure 3. Plots of the normalized intensity against the applied force using ($\blacktriangle$ = D1, $\blacksquare$ = D2) : (a) Bow-tie, (b) E-core, and (c) Single mode fibers.

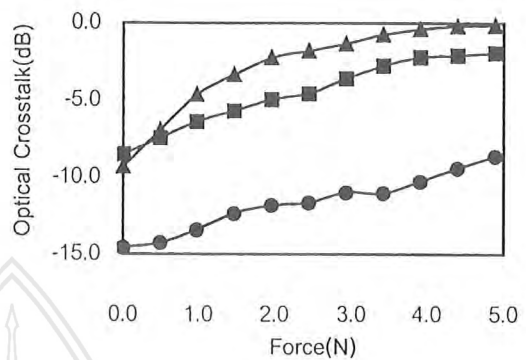


Figure 4. Plots of optical cross-talk against the applied force using Bow-tie ($\blacktriangle$), E-core ($\blacksquare$) and Single mode ($\bullet$) fibers.

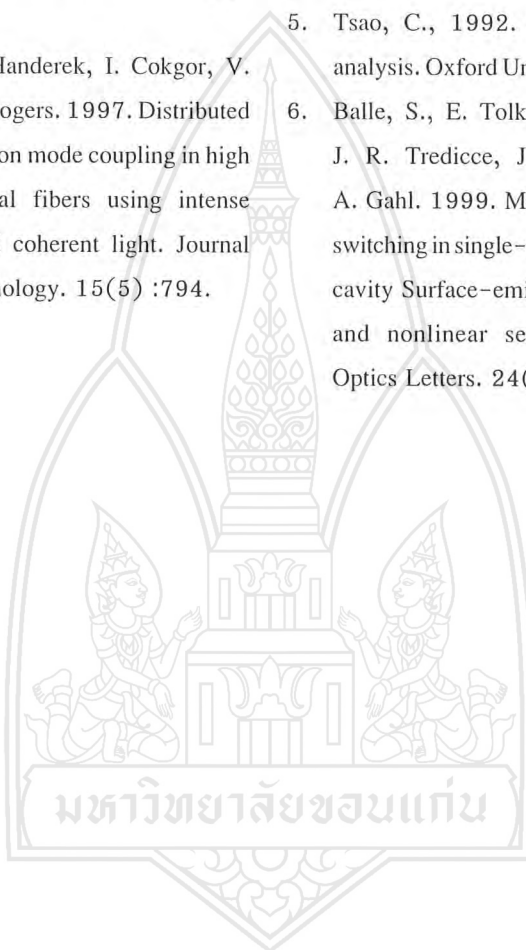
4. Conclusion

Optical power switching using birefringent fibers was investigated. Coupling power with SNR of 42.656 dB was achieved, and optical cross-talk of -9.329 dB was noted. Bow-tie fiber shows the switching behavior when an applied force of more than 2 N was employed. E-core fiber was switched when the applied force larger than 3 N was used. The single mode fiber did not show switching characteristics. A bow-tie fiber has shown good coupling ratio and cross-talk effects compared to the other two optical fibers, and may be used to fabricate fiber switching device.

References

1. Yamazaki, S., T. ONO, H. Shimizu and K. Emura. 1990. A bidirectional common polarization control method for coherent optical FDM transmission system, IEEE Photonics Technology Letters. 2(2) :135.

2. Yamazaki, S., T. ONO, H. Shimizu and K. Emura. 1994. Polarization control method for suppressing polarization mode dispersion influence in optical transmission system. *Journal of Lightwave Technology*. 12(5):891.
3. Zhang, J., V. A. Handerek, I. Cokgor, V. Pantelic, and A. J. Rogers. 1997. Distributed sensing of polarization mode coupling in high birefringence optical fibers using intense arbitrarily polarized coherent light. *Journal of Lightwave Technology*. 15(5) :794.
4. Yupapin, P.V.P., 1993. Optical pressure sensors using interferometric techniques, A thesis Submitted to City University of London for the Degree of Doctor of Philosophy, 1993. ‘
5. Tsao, C., 1992. Optical fiber waveguide analysis. Oxford University Press, New York.
6. Balle, S., E. Tolkachova, M. San Miguel, J. R. Tredicce, J. Martin-Regalado, and A. Gahl. 1999. Mechanisms of polarization switching in single-transverse-mode vertical-cavity Surface-emitting lasers: thermal shift and nonlinear semiconductor dynamics. *Optics Letters*. 24(16):1121.



ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสาร วิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและการเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ปกติ มีช่วงห่างระยะบรรทัดตามมาตรฐาน พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเนียวสัน) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด หรือต้นฉบับพิมพ์ 1 ชุด และ Diskette ของบทความนั้น
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะทำสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตนเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนหรือภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษตลอดทั้งการเขียนตัวสะกดการันต์ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน
7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์
8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแกใจความเฉพาะตอนในบทความ ข้อความที่จำเป็นจะต้องมีเชิงอรรถให้ใช้เครื่องหมายดอกจัน (*) กำกับท้าย
9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว - ดำ ขนาดโปสการ์ด ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม
10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

อภิธานการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหา นั้น ให้ใช้ระบบหมายเลขเรียงตามลำดับที่อ้างอิง การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างไว้แล้วในเนื้อหาเท่านั้น

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง จึงไม่ต้องมีหมายเลขกำกับในรายงาน แต่สรุปเป็นรายชื่อเอกสารในส่วนของบรรณานุกรมโดยคำนึงถึงลำดับตัวอักษร (order system)

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.). ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น, อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ก.ศ.). ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักงานพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

2. เอกสารราชการ

ชื่อหน่วยราชการ. (เลขปี พ.ศ. หรือ ก.ศ.). ชื่อเรื่อง. ชื่อหนังสือ. เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์.

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่) : เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น, อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ก.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่) : เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

หมายเหตุ

- กรณีที่เป็นการเอกสารอ้างอิงจากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดข้างต้น เช่น จดสาร, หนังสือพิมพ์ ฯลฯ ให้ยึดหลักการเขียนตามแบบข้างต้นโดยอนุโลม
- กรณีที่ผู้เขียน 2 หรือ 3 คน ให้เขียนตามแบบของผู้เขียนคนแรก แต่ให้เดิมคำว่า “และ” หรือ “and” หน้าชื่อสุดท้ายในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
- กรณีที่ผู้เขียนมากกว่า 3 คนขึ้นไป ให้ใส่เฉพาะผู้แต่งชื่อแรกและใส่คำว่า “และคณะ” หรือ “et. al.” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
- ถ้าเอกสารที่ถูกอ้างอิงอยู่ในระหว่างตีพิมพ์ ให้บอกรายละเอียดมากที่สุดและใช้คำว่า “ระหว่างตีพิมพ์” หรือ “in press” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ โดยวงเล็บต่อท้ายเอกสารอ้างอิงนั้น

