โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

ชื่อนิสิต นางสาวณิชากร รักษาสนธิ์ รหัสประจำตัว 5932317523

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าวมาผลิตแคโรทีนอยด์ด้วย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

Utilization of wastewater from coconut processing industry for carotenoids production by *Rhodopseudomonas faecalis* W1

ชื่อนิสิต นางสาวณิชากร รักษาสนธิ์ **เลขประจำตัว** 5932317523

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	การนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าวมาผลิตแคโรทีนอยด์ด้วย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1
โดย	นางสาวณิชากร รักษาสนธิ์ 5932317523
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ

(ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ชื่อโครงการ

การนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าวมาผลิตแคโรทีนอยด์ด้วย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

นิสิตในโครงการ
นางสาวณิชากร รักษาสนธิ์
รหัสนิสิต 5932317523

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ปีการศึกษา 2562
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าวมาผลิตแคโรทีนอยด์ด้วย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1
นิสิตผู้เสนอโครงการ นางสาวณิชากร รักษาสนธิ์ รหัสนิสิต 5932317523
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าวมีค่าซีโอดีสูง จึงสามารถนำน้ำเสียดังกล่าวมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ทั้งยังผลิตสารที่สำคัญหลายอย่างได้ เช่น แคโรทีนอยด์ และแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ในปัจจุบันแคโรทีนอยด์ถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิด เช่น ยา อาหารเสริม อาหารสัตว์ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถัน โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนในการผลิตแคโรทีนอยด์ เริ่มแรกผู้วิจัยได้ทดสอบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันคือ อาหารเหลว LB50% และ RCVB เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทปเป็นเวลา 5 วัน พบว่า *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 สามารถเจริญในอาหารเหลว RCVB ได้ดีกว่า LB50% เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียสร้างสารสีได้มากกว่า จากนั้นจึงนำ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 มาตรึงบน Aquaporous gel ขนาด 2 และ 4 กรัม ในขวดดูแรน 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว RCVB อยู่ 220 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทปเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อตรึงด้วยวัสดุตรึงเซลล์ Aquaporous gel 4 กรัม เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจึงนำมาทดสอบต่อกับตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว 3 ชนิด คือ น้ำ soft pH 4, น้ำ soft pH 6-7 และ น้ำเสียจากบ่อบำบัด แล้วได้ทดสอบการเจริญเทียบกับการเจริญของแบคทีเรียชนิดดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำเสียจากบ่อบำบัดในการเจริญได้ อาจเนื่องมาจากสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญ ในอนาคตอาจมีการเพิ่มแหล่งคาร์บอนจากสารตัวอื่นเข้าไปในน้ำเสียแล้วเปรียบเทียบการเจริญ และวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ในลำดับต่อไป

Project title Utilization of wastewater from coconut processing industry for carotenoids production by *Rhodopseudomonas faecalis* W1
Investigator Miss Nichakorn Ruksason Student ID 5932317523
Project Advisor Assoc. Prof. Ekawan Luepromchai, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

Abstract

Wastewater from coconut processing plants has a high COD value. Therefore, the wastewater can be used as a carbon source for purple non-sulfur bacteria. These bacteria can grow under anaerobic and anaerobic conditions and can also produce many important substances such as carotenoids bacteriochlorophyll. Nowadays, carotenoids are used in many products, such as pharmaceuticals animal feed supplements. This research aims to produce carotenoids from purple non-sulfur bacteria by using wastewater from coconut processing factory as a carbon source to reduce the production costs. Initially, the researcher compared the growth of *Rhodopseudomonas faecalis* W1 in LB50% and RCVB medium under photoheterotroph condition for 5 days. *Rhodopseudomonas faecalis* W1 grown in RCVB medium better than LB50% and the bacterial cells produce more red pigments. After that, *Rhodopseudomonas faecalis* W1 was immobilized on 2 and 4 g Aquaporous gel in a 250 mL Duran bottle containing 220 mL RCVB medium under photoheterotroph for 5 days and then measured the optical density at 660 nm wavelength. *Rhodopseudomonas faecalis W1* grown best when immobilized with 4 g Aquaporous gel cell. The optimum condition was tested with wastewater samples from coconut processing factory and compared to RCVB liquid medium. There were 3 types of wastewater samples including soft pH 4 water, soft pH 6-7 water and wastewater from treatment ponds. The results showed that the bacteria could not utilize all wastewater samples for growth. This might be due to the insufficient nutrients. In the future, carbon sources from other substances may be added to the wastewater. The growth and carotenoid yields should be compared later.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่ถ่ายทอดความรู้ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย อีกทั้งยังช่วยตรวจทานแก้ไขโครงการฉบับนี้สมบูรณ์มากขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในด้านต่าง ๆ รวมถึงการใช้ชีวิตในอนาคต และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดการทาโครงการฉบับนี้

ขอขอบพระคุณบริษัทอำพลฟูดส์ โพรเซสซิ่ง จำกัด ที่กรุณามอบน้ำเสียจากโรงงานมาให้ดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการดำเนินโครงการนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ แก้ปัญหาต่างๆ ตลอดจนเป็นกำลังใจสำคัญให้ผู้วิจัยเรื่อยมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

ณิชากร รักษาสนธิ์

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญรูปภาพ ฉ
สารบัญตาราง ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ 1
1.2 วัตุประสงค์ของโครงการ 10
1.3 เป้าหมาย 10
1.4 วิธีการดำเนินงาน 11
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 11
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบ 12
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 12
2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง 14
3.1 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 14
3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 14
3.1.2 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเหลว LB50% และ RCVB 14
3.1.3 การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย 15
3.1.4 การวิเคราะห์ค่า Chemical oxygen demand และค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าวอำพลฟูดส์ 15
3.1.5 การวิเคราะห์การเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เมื่อใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดโรงงานอำพลฟูดส์เป็นแหล่งคาร์บอน 15
3.2 การหาปริมาณ Aquaporous gel ที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 15
3.2.1 การเตรียม Aquaporous gel 15
3.2.2 การวิเคราะห์การตรึงเซลล์ของ Aquaporous gel ที่ตรึง *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 16

3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 แบบเซลล์ตรึง โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว 17
บทที่ 4 ผลการทดลอง 18
4.1 ผลการวัดค่า COD ของน้ำเสียทั้ง 3 ชนิดที่เก็บมาจากโรงงานอำพลฟูดส์ 18
4.2 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเหลว LB50% RCVB และน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว 18
4.3 ผลการวิเคราะห์การตรึงเซลล์ของ Aquaporous gel ที่ตรึง *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 19
4.4 ผลการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในน้ำเสียตัวอย่างที่เก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานอำพลฟูดส์ 19
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 21
เอกสารอ้างอิง 23
ภาคผนวก 25
ภาคผนวก ก 26
ภาคผนวก ข 29
ภาคผนวก ค 30

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 การเปลี่ยนสารตั้งต้นใน activated sludge เป็น PHA 3
รูปที่ 2 รูปโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ 4
รูปที่ 3 รูปโครงสร้างโมเลกุลเบต้า-แคโรทีน (beta-carotene) และไลโคพีน (lycopene) 4
รูปที่ 4 รูปโครงสร้างโมเลกุลลูทีน (lutein) ซีแซนทีน (zeaxanthin) 4
รูปที่ 5 ขั้นตอนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในพืช 5
รูปที่ 6 ตัวอย่างการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในมะเขือเทศ 6
รูปที่ 7 ขั้นตอนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆในจุลินทรีย์ 7
รูปที่ 8 วัสดุตรึงเซลล์ Aquaporous gel 9
รูปที่ 9 การเจริญและการสร้างสารสีของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50% (ฝาสีขาว) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB (ฝาสีดำ) 14
รูปที่ 10 Aquaporous gel ขนาด 0.8 x 0.8 x 0.8 เซนติเมตร 16
รูปที่ 11 การตรึงเซลล์ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 16
รูปที่ 12 ผลการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เมื่อใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดโรงงานอำพลฟูดส์เป็นแหล่งคาร์บอน 21
รูปที่ 13 ปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ของเชื้อที่มีการเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเปรียบเทียบช่วงการเติมผงถ่านกัมมันต์ในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน 22

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียกลุ่ม Rhodopseudomonas 8

ตารางที่ 1ข แสดงการวัด COD ที่ความเข้มข้นต่างๆด้วย Hanna instrument COD reagent 29

ตารางที่ 1ค ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าซีโอดี (mg/L) ของน้ำเสียทั้ง 3 ชนิด 30

ตารางที่ 2ค ผลการนับจำนวนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50% และ RCVB 30

ตารางที่ 3ค ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของการตรึงเซลล์ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ด้วยวัสดุตรึง Aquaporous gel 31

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

อุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าว

มะพร้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย เนื่องจากคนไทยรู้จักใช้มะพร้าวในการบริโภคเป็นอาหารทั้งคาวและหวาน โดยสามารถแบ่งกลุ่มอุตสาหกรรมมะพร้าวออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ผลิตภัณฑ์แปรรูปเพื่อการบริโภค เช่น อุตสาหกรรมมะพร้าวแห้ง อุตสาหกรรมน้ำมะพร้าว อุตสาหกรรมกะทิเข้มข้น อุตสาหกรรมมะพร้าวฝอยแห้ง อุตสาหกรรมน้ำตาลมะพร้าว และผลิตภัณฑ์เพื่ออุตสาหกรรมและอุปโภค เช่น อุตสาหกรรมเส้นใยมะพร้าว อุตสาหกรรมแท่งเพาะชำ อุตสาหกรรมเผาถ่านจากกะลามะพร้าว ซึ่งในปัจจุบันมะพร้าวมีความสำคัญในภาคอุตสาหกรรมอย่างมาก โดยอุตสาหกรรมเหล่านี้มักมีการปล่อยน้ำเสียออกจากโรงงานลงสู่สิ่งแวดล้อม เช่น ในโรงงานผลิตวุ้นมะพร้าว ในเบื้องต้นพบว่ามีลักษณะสมบัติของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตวุ้นมะพร้าวมีค่าซีโอดี (Chemical oxygen demand, COD) อยู่ในช่วง 1,945 – 4,943 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณน้ำเสียเฉลี่ย 5.7 ลูกบาศก์เมตรต่อผลผลิต 1 ตัน (ปิยนุช ก้องกิตต์ไพศาล, 2542) ซึ่งน้ำเสียที่มาจากกระบวนการผลิตส่วนใหญ่นั้น คือ น้ำเสียที่มาจากการล้างวุ้น เศษวุ้นที่เหลือจากการตัดแต่ง และน้ำเสียที่มาจากการล้างภาชนะหมักวุ้น ส่วนประกอบของน้ำเสียส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมาจากส่วนประกอบในเนื้อวุ้นมะพร้าว เช่น ไขมัน ไฟเบอร์ โปรตีน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งแร่ธาตุลางชนิด เช่น แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส (ปิยนุช ก้องกิตต์ไพศาล, 2542) เมื่อปล่อยน้ำเสียเหล่านี้ลงสู่สิ่งแวดล้อมจึงมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมจึงมีประกาศเรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม นิคมอุตสาหกรรม และเขตประกอบการอุตสาหกรรม โดยโรงงานอุตสากรรมแต่ละโรงงานสามารถปล่อยน้ำเสียออกมาได้โดยห้ามให้มีค่าซีโอดี (Chemical oxygen demand, COD) เกินกว่า 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามประกาศกระทรวงในข้างต้น

การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเหมาะกับน้ำเสียชุมชนหรือน้ำเสีย จากการเกษตร และน้ำเสียจากโรงงานที่มีสารอินทรีย์สูง แบ่งตามจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดได้เป็น 2 ประเภท คือ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Aerobic process) และ ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (Anaerobic process) สำหรับระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ (Aerobic process) เป็นกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องอาศัยออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen) หรือออกซิเจนอิสระในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรีย กลุ่มที่ใช้อากาศ (Aerobic Bacteria) สามารถจำแนกได้เป็น 2 ขั้นตอน ตามลำดับนี้

ขั้นตอนที่ 1 จุลินทรีย์จะส่งเอนไซม์ออกมาสลายสารอินทรีย์ที่มาเกาะที่ผนังเซลล์ เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารโมเลกุลเล็ก เพื่อที่จะซึมผ่านเข้าไปในเซลล์จุลินทรีย์ได้

ขั้นตอนที่ 2 เป็นกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อที่จะผลิตพลังงานไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ และการสร้างเซลล์ใหม่ เมื่อสารอินทรีย์ในน้ำเสียถูกเปลี่ยนรูปมาเป็นจุลินทรีย์เซลล์ใหม่ จะรวมตัวกันเป็นฟล็อก (Biological Flocculation) ก็จะมีน้ำหนักมากขึ้น และแยกออกจากน้ำเสียได้ง่ายด้วยการตกตะกอน

ระบบบำบัดแบบ Aerobic process ที่นิยมใช้ ประกอบด้วยระบบแบบ Activated sludge ระบบแบบบ่อปรับเสถียร

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (Anaerobic process) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้แบคทีเรียแบบไม่ใช้อากาศในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยหลักการทำงานของระบบคือ เป็นระบบที่ใช้แบคทีเรียแบบไม่ใช้อากาศในการบำบัดน้ำเสีย โดย จุลินทรีย์จะอาศัยสารประกอบอื่นเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen) หรือออกซิเจนอิสระ กลไกการย่อยสลายารอินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศหรือออกซิเจน สามารถแบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอน ตามลำดับดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เป็นกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดย อาศัยเอนไซม์ (Enzyme) ที่ถูกส่งออกมานอกเซลล์เพื่อเปลี่ยนสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็ก

ขั้นตอนที่ 2 เป็นกระบวนการสร้างกรด (Acidogenesis) โดย แบคทีเรียสร้างกรดซึ่งจะเปลี่ยนผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสใน ขั้นนตอนที่ 1 ไปเป็นกรดไขมันระเหย (Volatile Fatty Acid; VFA)

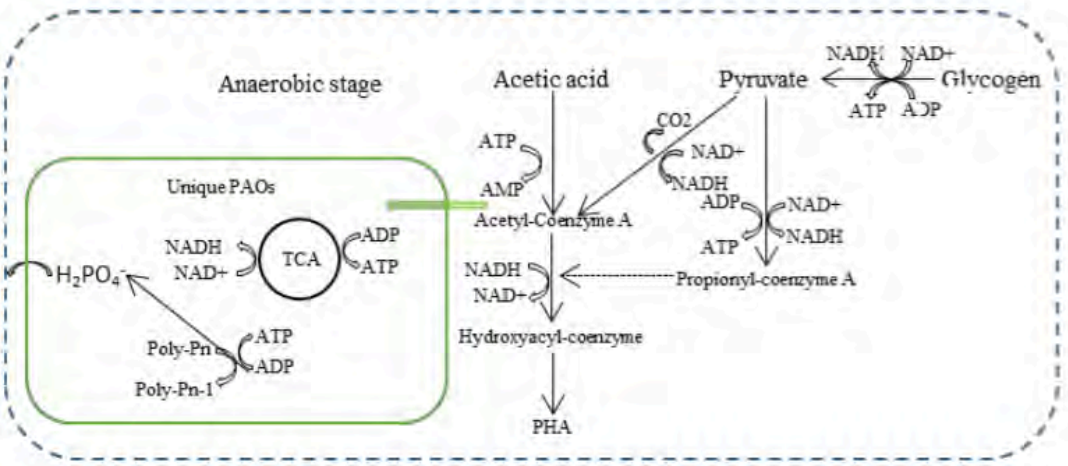
ขั้นตอนที่ 3 เป็นกระบวนการสร้างกรดแอซีติกจากกรดไขมันระเหย (Acetogenesis) โดยแบคทีเรียกลุ่มอะซีโตเจนิก (Acetogenic Bacteria) จะเปลี่ยนกรดไขมันระเหยไปเป็นผลผลิตสำคัญในการสร้างก๊าซ

ขั้นตอนที่ 4 เป็นกระบวนการสร้างมีเทน (Methanogenesis) โดยผลผลิตที่ได้จากแบคทีเรียสร้างกรดในขั้นตอนที่ 3 จะถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนโดยแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทน

ระบบบำบัดแบบ Anaerobic process ที่นิยมใช้ ประกอบด้วยระบบแบบถังกรองไร้อากาศ ระบบคัฟเวอร์ลากูน ระบบฟิกซ์โดม ระบบยูเอเอสบี (กรมควบคุมมลพิษ, 2558)

การนำน้ำเสียไปใช้ประโยชน์

น้ำเสียที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ส่วนใหญ่มีค่าซีโอดีที่สูง ดังนั้นการนำน้ำเสียไปแปรรูปหรือใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถสร้างมูลค่าให้กับน้ำเสียที่ถูกปล่อยออกมาได้ เช่น การผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์โดยใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหารหรือแหล่งคาร์บอน โดยสารชีวภาพที่ผลิตจากน้ำเสียส่วนใหญ่ในปัจจุบันคือ ไบโอพลาสติก เอทานอล และสารลดแรงตึงผิว ในการผลิตไบโอพลาสติกจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้แบคทีเรีย Consortium และสารประกอบ Volatile fatty acids ในระบบบำบัดน้ำเสีย ในระบบบำบัดน้ำเสียพบว่า activated sludge สามารถถูกทำให้เปลี่ยนรูปเป็น PHA ได้โดยแบคทีเรียภายในโดยใช้กระบวนการ Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) (รูปที่ 1) โดย PHA ที่ผลิตได้สามารถนำไปผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพได้ (Liu *et. al.*, 2019)



รูปที่ 1 การเปลี่ยนสารตั้งต้นใน activated sludge เป็น PHA (Liu *et. al.*, 2019)

จากตัวอย่างข้างต้นจะพบว่าน้ำเสียสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย จากองค์ประกอบของน้ำเสียที่มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์จำนวนมาก จึงทำให้แบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญได้ จากประโยชน์ดังกล่าวจึงทำให้การนำน้ำเสียมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในปัจจุบันได้รับความนิยมมาก หนึ่งในผลิตภัณฑ์หรือสารที่สำคัญที่เป็นที่สนใจในการผลิตดังกล่าวก็คือ แคโรทีนอยด์ การผลิตแคโรทีนอยด์นี้สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิด Photosynthetic bacteria และการใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนให้แบคทีเรียดังกล่าวก็สามารถทำให้ผลิตแคโรทีนอยด์ออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถบำบัดน้ำเสียโดยสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในการบำบัดได้มากขึ้น ตัวอย่างเช่น การนำน้ำเสียจากโรงงานผลิตเบียร์มาบำบัดด้วย Photosynthetic bacteria และผลิตแคโรทีนอยด์ จากงานวิจัยดังกล่าวพบว่าสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำเสียลงไปได้ต่ำกว่า 80 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ออกมาได้ 2.53 มิลลิกรัมต่อกรัม (Lu *et. al.*, 2019)

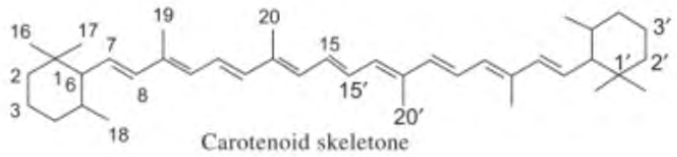
แคโรทีนอยด์ (Carotenoid)

แคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มของสารสีกลุ่มใหญ่ที่ต้องการมากในปัจจุบัน สารสีที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เสื้อผ้า เครื่องสำอาง และยารักษาโรค มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการเสื่อมสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ

แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) อยู่ในกลุ่มไอโซพีนอยด์ (Isoprenoid) จัดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ ที่มีคุณสมบัติเป็น โปรวิตามินเอ (Provimamin A) แคโรทีนอยด์ยังสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แคโรทีนและแซนโทฟิลล์ โดยแคโรทีนเป็นรงควัตถุที่มีสีส้ม หรือ ส้ม-แดง เป็นสายยาวของไฮโดรคาร์บอน มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสองไอโซเมอร์หลัก คือ แอลฟา-แคโรทีนและเบต้า-แคโรทีน ส่วนแซนโทฟิลล์ มีสีเหลือง หรือ ส้ม-เหลือง เป็นสายยาวของไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งแซนโทฟิลล์มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับระดับ Oxidation ของโมเลกุล แคโรทีนอยด์ในอาหารธรรมชาติมีประมาณ 600 ชนิด ที่พบมากมี 6 ชนิด คือ

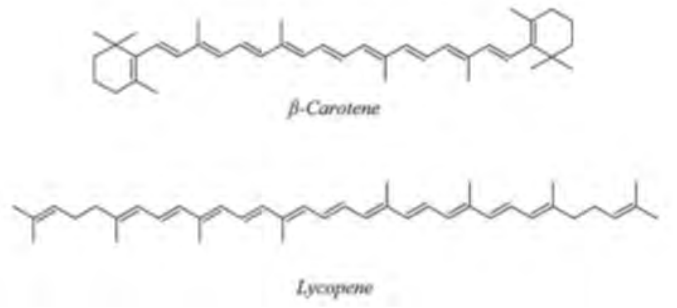
แอลฟาแคโรทีน (alpha-carotene) เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) เบต้าคริพโตแซนทีน (beta-cryptoxanthin) ไลโคปีน (lycopene) ลูทีน (lutein) และซีแซนทีน (zeaxanthin)

โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) จำนวน 8 หน่วย ที่เกิดพันธะโควาเลนต์และทำให้เกิดคอนจูเกชันของพันธะคู่เป็นสายยาว (extensive conjugated double bond) (รูปที่ 2)



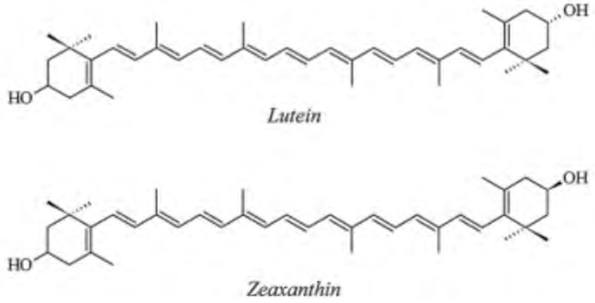
รูปที่ 2 รูปโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ (Habtemariam *et. al*, 2017)

ซึ่งระบบคอนจูเกชันที่ทาให้แคโรทีนอยด์สามารถดูดกลืนพลังงานแสงอัลตราไวโอเลตและแสงสีขาว ทำให้แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีสีและมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของแคโรทีนอยด์อาจเป็น เส้นตรง ดังที่พบในไลโคพีน (lycopene) หรือเป็นวงแหวน (ring) ที่ปลายโซ่ของโมเลกุล ดังที่พบในเบต้าแคโรทีน (beta-carotene) สามารถจำแนกแคโรทีนอยด์เป็น 2 กลุ่ม คือ Hydrogenated และ Oxygenated carotenoid derivatives โดยกลุ่ม hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (carotene) จะประกอบไปด้วยเบต้าแคโรทีน (beta-carotene) และไลโคพีน (lycopene) (รูปที่ 3) (Simpson *et. al.*, 1989)



รูปที่ 3 รูปโครงสร้างโมเลกุลเบต้า-แคโรทีน (beta-carotene) และไลโคพีน (lycopene) (Habtemariam *et. al*, 2017)

ส่วนกลุ่มที่ 2 คือกลุ่ม oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) จะประกอบไปด้วย ลูทีน (lutein) ซีแซนทีน (zeaxanthin) (รูปที่ 4)

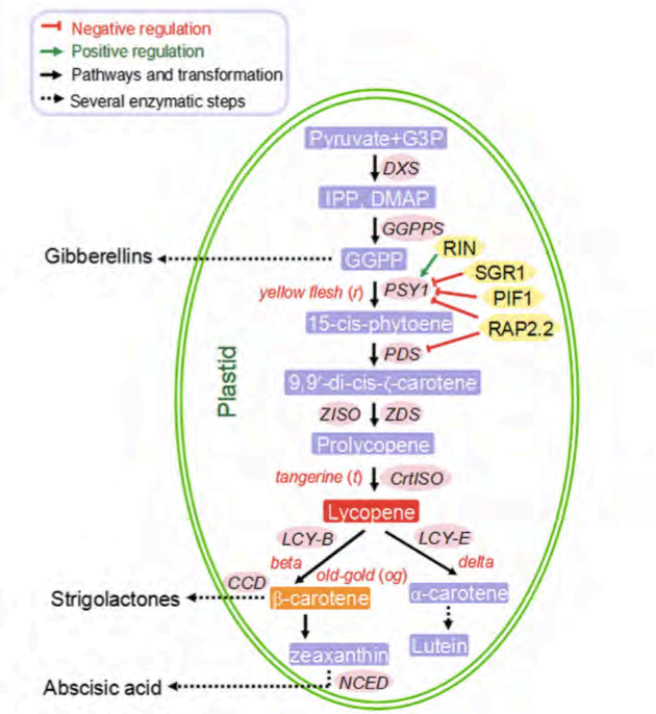


รูปที่ 4 รูปโครงสร้างโมเลกุลลูทีน (lutein) ซีแซนทีน (zeaxanthin) (Habtemariam *et. al*, 2017)

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Carotenoid synthesis)

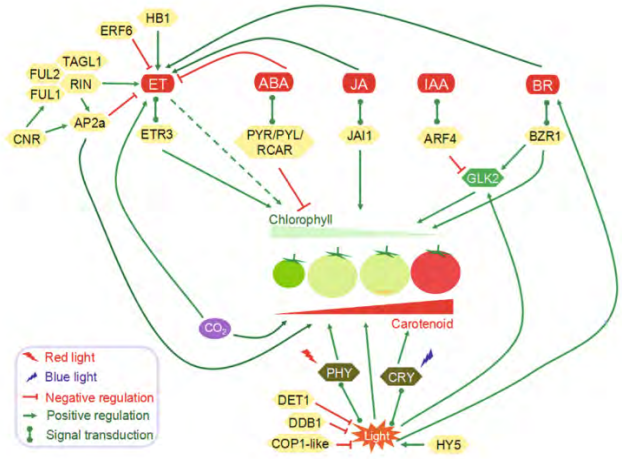
แคโรทีนอยด์เป็นสารที่สามารถสังเคราะห์ได้จากธรรมชาติทั้งในผัก ผลไม้ และสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ต่างๆ

สำหรับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในพืชหรือผัก ผลไม้ชนิดต่างๆ ปัจจัยหลักๆของการสังเคราะห์ขึ้นอยู่กับปริมาณ Isopentenyl diphosphate (IPP) และ dimethylallyl diphosphate (DMAPP) ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และสารทั้งสองตัวนี้ยังเป็นสารที่สำคัญต่อการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) ในปัจจุบันพบว่าพืชก่อนที่จะสังเคราะห์สารกลุ่มไอโซพรีนอยด์และแคโรทีนอยด์ออกมาจะต้องสังเคราห์ IPP และ DMAPP ออกมาก่อน โดยกระบวนการสังเคราะห์จะเรียกว่า non-mevalonate หรือ 2-C-methyl-D-erythiol-4-phosphate (MEP) สำหรับวิถีปฏิกิริยาขั้นแรกของ MEP จะเกิดการรวมตัวกันของ pyruvate กับ glyceraldehyde-3-phosphate ได้เป็น 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) โดยเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) และผ่านกระบวนการอีกหลายขั้นตอนจนได้ IPP และ DMAPP จากนั้นจึงใช้เอนไซม์ Geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPPS) สังเคราะห์ต่อจนได้แคโรทีนอยด์ออกมา (Liu *et. al.*, 2015) (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ขั้นตอนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในพืช (Liu *et. al.*, 2015)

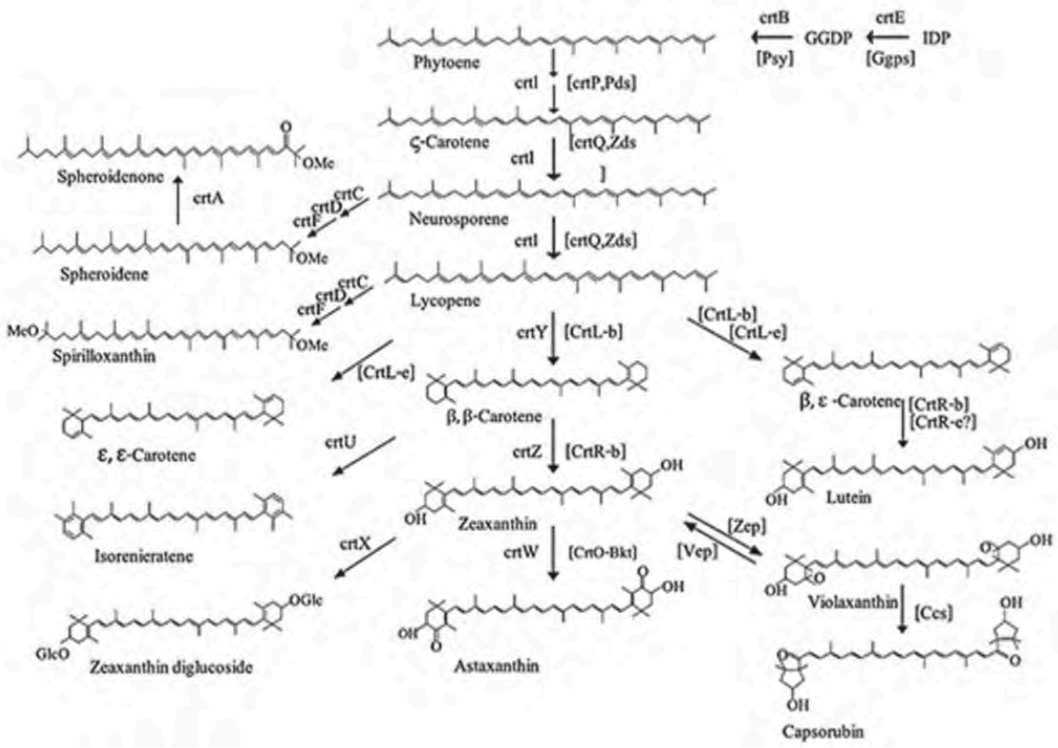
ในการผลิตแคโรทีนอยด์ในพืชนอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกเช่น ฮอร์โมนพืช Abscisic acid (ABA) Ethylene (ET) และปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ การกระตุ้น ET และลดการแสดงออกของ ABA จะทำให้พืชผลิตแคโรทีนอยด์ออกมาได้มากขึ้น (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ตัวอย่างการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในมะเขือเทศ (Liu *et. al.*, 2015)

การสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์แสง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ ได้แก่

1. การเปลี่ยนรูปของ acetyl Co-A เป็น 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA (HMG-CoA) และ เปลี่ยนไปเป็น Mevalonic Acid (MVA) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนจำนวน 6 อะตอม ซึ่งเป็น สารตั้งต้นชนิดแรกในวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่ม Terpenoid จากนั้น MVA จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น Isopentyl Pyrophosphate (IPP) โดยการทำงานของเอนไซม์ MVA kinase และตามด้วยปฏิกิริยา Decarboxylation เป็นลำดับ (รูปที่ 7)
2. ปฏิกิริยา Isomerization ของ IPP เป็น Dimethylallyl Pyrophosphate (DMAPP) โดยการเติม IPP จำนวน 3 โมเลกุลใน DMAPP โดยการทำงานของ เอนไซม์ Prenyl Transferase เพื่อให้ได้สาร Geranyl Geranyl Pyrophosphate (GGPP) ที่มีจำนวน คาร์บอน 20 อะตอม ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (รูปที่ 7)
3. การทำปฏิกิริยาระหว่าง GGPP 2 โมเลกุลแบบ Head to Head โดยการทำงานของเอนไซม์ Phytoene Synthase ทำให้เกิดสารตัวกลาง Phytoene เป็นสารที่ไม่มีสี และจัดเป็น Carotenoid ชนิดแรก จากวิถีการสังเคราะห์ และเมื่อเกิดปฏิกิริยา Desaturation ในการเติมพันธะคู่แบบ Conjugated Double Bond จะได้เป็น Lycopene ตามด้วยการสังเคราะห์สารกลุ่ม Carotenoid ชนิดอื่นๆทั้ง Cyclic และ Acyclic Carotenoid โดยวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่จำเพาะในแต่ละขั้นตอนแสดงในรูปที่ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ขั้นตอนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆในจุลินทรีย์ (ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด, 2017)

เอนไซม์ Phytoene Synthase จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการกำหนดและควบคุมวิถี การสังเคราะห์ Carotenoid ในสิ่งมชีวีต โดยจะแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มจุลินทรีย์ เช่น ยีนในการควบคุมการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ *PSY* ในสาหร่ายสีเขียว จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะตอบสนองต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกันขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่

การผลิตแคโรทีนอยด์โดยใช้พืชในปัจจุบันพบว่ายังมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่าง ทั้งการควบคุมการผลิต ความเป็นพิษจากสารสกัดแคโรทีนอยด์ ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ ทั้งนี้จึงทำให้ปัจจุบันนิยมใช้จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ หรือสาหร่าย ในการผลิตแคโรทีนอยด์มากกว่าการใช้พืชในการผลิต (ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด, 2017)

การใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันสำหรับผลิตแคโรทีนอยด์

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และกลุ่มแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas* sp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถัน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Zhang *et. al*, 2002) จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มโพรทีโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) โดยการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ขึ้นกับ ปริมาณออกซิเจน สารอาหารที่ได้รับ การได้รับแสงและการไม่ได้รับแสง นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อนำไปใช้ในการเจริญของแบคทีเรียได้ สำหรับ *Rhodopseudomonas faecalis*

สายพันธุ์ W1 ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกในประเทศไทย มีคุณสมบัติในการเจริญภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน สามารถผลิตชีวมวล แคโรทีนอยด์ และแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ออกมาได้ปริมาณมาก เมื่อเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานผลิตผลไม้แปรรูป (พีรดนย์ เอื้อนศิริกุล, 2017)

ตารางที่ 1 : เปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียกลุ่ม Rhodopseudomonas

PNSB	Condition				Biomass (g/L)	Carotenoid (mg/g CDW)
	Light	Anaerobic	Temperature (celcius)	Fermentation		
Rhodopseudomonas faecalis PA2 (Saejung et. al, 2019)	4000lux, LED	/	26-30	Batch culture 5-L bioreactor	33.9	7.2
Rhodopseudomonas palustris B1 (Getha et.al, 1998)	2000lux, Fluorescent	/	28-32	Batch culture 20 mL in 25 mL screw cap	2.5	1.1

จากตารางดังกล่าวพบว่าแบคทีเรียชนิดสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันในกลุ่ม Rhodopseudomonas ที่ยกตัวอย่ามาจากงานวิจัยในอดีต เมื่อนำมาเปรียบเทียบการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่ายังได้ปริมาณที่น้อย จากปี 2017 ได้มีการพัฒนาการผลิตแคโรทีนอยด์ด้วยวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย เรื่องการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ด้วยตะกอนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันแบบเม็ด โดยพีรดนย์ เอื้อนศิริกุล จากงานวิจัยดังกล่าวพบว่า *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เมื่อนำไปตรึงด้วย activated carbon ในน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้พบว่ามีปริมาณชีวมวลสูงถึง 22 g/L และได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 4.1 mg/g จากปริมาณที่ได้นี้เมื่อเทียบกับ *Rhodopseudomonas palustris* B1 ที่ผลิตในระดับใกล้เคียงกันพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์และชีวมวลที่ได้ค่อนข้างแตกต่างกันมาก และจากปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจาก *Rhodopseudomonas faecalis* PA2 ในถังหมักขนาด 5 L กลับพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ไม่ได้มีค่าสูงนัก จากความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ออกมาได้อยู่ในเกณฑ์ที่ดี จึงเลือกแบคทีเรียชนิดนี้มาศึกษาและวิจัยต่อ

ปัจจัยส่งเสริมการผลิตแคโรทีนอยด์และการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถัน

ปัจจัยที่ส่งเสริมการผลิตแคโรทีนอยด์และการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันมี 3 ปัจจัยหลักๆ คือ การตรึงเซลล์แบคทีเรีย การให้แสงกระตุ้นผลิตสารสีของเซลล์แบคทีเรีย และสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย สำหรับปัจจัยแรกการใช้วัสดุตรึงเซลล์ในการตรึงเซลล์แบคทีเรียจะช่วยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เมื่อเซลล์สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ออกมาได้ผลิตภัณฑ์จะถูกแยกออกมาจากเซลล์ได้ง่ายการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระ ในงานวิจัยนี้ได้นำ Aquaporous gel มาใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์สำหรับแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 โดยวัสดุตรึงเซลล์ดังกล่าวเป็นวัสดุมีรูพรุนที่ผลิตโดยบริษัท Nisshinbo, JAPAN (รูปที่ 8) มีองค์ประกอบทางเคมีเป็น Polyester urethane มากถึง 98% (Hoang Nhat Phong Vo และคณะ, 2019) มีคุณสมบัติในการดูดจับกับน้ำที่สูง สามารถจับกับแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารเคมีโดยใช้รูพรุนบนผนังของโครงสร้าง Polyester urethane ตรึงแบคทีเรียให้กลุ่มกันไว้บนผนังเซลล์ตรึง โดยนิยมนำวัสดุเซลล์ตรึงนี้ไปใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย

รูปที่ 8 วัสดุตรึงเซลล์ Aquaporous gel (Nisshinbo, JAPAN)

ปัจจัยในลำดับถัดมาคือการให้แสงกระตุ้นผลิตสารสีของเซลล์แบคทีเรีย ในสภาวะกึ่งมีอากาศและมีแสงสว่างเพียงพอ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงจะมีการใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยมีการผลิตสารสีเพื่อทำหน้าที่รวบรวมแสง ได้แก่แบคเทอริโอคลอโรฟิลด์ เป็นรงควัตถุที่เป็นองค์ประกอบของศูนย์กลางปฏิกิริยา มีช่วงคลื่นการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 815-960 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังมีการผลิตสารสีแคโรทีนอยด์เพื่อมาช่วยในการสังเคราะห์แสงด้วย โดยจะดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นการดูดกลืนแสงที่ 450-550 นาโนเมตร ทำให้มองเห็นเป็นสีแดง แดงเข้ม น้ำตาล เหลือง ส้ม เขียว ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (พีรดนย์ เอื้อนศิริกุล, 2017) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกแหล่งกำเนิดแสงอื่นนอกเหนือจากแสงธรรมชาติเพื่อกระตุ้นการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยแหล่งกำเนิดแสงที่เลือกมาคือ Incandescent light bulb หรือหลอดไส้เป็นหลอดไฟที่ให้แสงสว่างโดยการให้ความร้อนแก่ไส้หลอดที่เป็นลวดโลหะกระทั่งมีอุณหภูมิสูงและเปล่งแสง ซึ่งแสงที่ออกมานั้นจะเป็นแสงสีเหลือง ซึ่งหลอดชนิดนี้ได้มีการทำการทดลองกับการเลี้ยงเชื้อ Photosynthetic bacteria พบว่าหลอดไฟชนิดนี้ให้อัตราการเจริญที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับหลอดชนิดอื่นอย่าง LED และ Fluorescent (Fu-Shin Kuo, 2012) และปัจจัยในลำดับสุดท้ายที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์และการเจริญ

ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันคือสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียจะใช้แร่ธาตุไอออนอย่างเหล็ก แมกนีเซียม โคบอลท์ นิกเกิล ในปฏิกิริยารีดอกซ์และการสังเคราะห์สารสีประเภทต่างๆ เช่น แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ (Kis *et. al*., 2015) สำหรับการเจริญของแบคทีเรียนี้ต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญ ในงานวิจัยได้ใช้น้ำตาลกลูโคสและทริปโตนเป็นสารอาหารให้แบคทีเรียใช้ในการเจริญนอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันสามารถผลิตชีวมวลออกมาได้ปริมาณมาก (พีรดนย์ เอื้อนศิริกุล, 2017)

ภาพรวมของงานวิจัย

ในงานนี้ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการผลิตแคโรทีนอยด์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมกำมะถันโดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากปัจจุบันแคโรทีนอยด์ที่สกัดผ่านกระบวนการทางเคมีและชีวภาพนั้น สกัดออกมาได้น้อยกว่าเป้าหมายที่ตั้งไว้และมีประสิทธิภาพที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐาน อาจมาจากสาเหตุของฤดูกาลและสภาพภูมิอากาศ (ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด, 2017) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจใช้แบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 มาตรึงใน Aquaporous gel เพื่อให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง แล้วนำไปผลิตแคโรทีนอยด์จากน้ำเสียอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าว ซึ่งจะเป็นการนำน้ำเสียมาใช้ประโยชน์ในการผลิตสารชีวภาพที่มีมูลค่าสูง โดยแคโรทีนอยด์มีการนำไปใช้ประโยชน์ดังต่อไปนี้ สีผสมอาหาร อาหารเสริม อาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจำพวกผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ อาหารเหลว LB50% อาหารเหลว RCVB และ น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว

2.2 เพื่อหาปริมาณ Aquaporous gel ที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

2.3 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 แบบเซลล์ตรึง โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว

3. เป้าหมาย

3.1 ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

3.2 ได้ปริมาณของ Aquaporous gel ที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

3.3 ได้แคโรทีนอยด์ที่มีปริมาณมากและมีต้นทุนถูก เนื่องจากใช้น้ำเสียเป็นสารตั้งต้น

4. วิธีการดำเนินงาน

4.1 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ อาหารเหลว LB50% อาหารเหลว RCVB และ น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว

4.1.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

4.1.2 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเหลว LB50% RCVB

4.1.3 การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

4.1.4 การวิเคราะห์ค่า Chemical oxygen demand และค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าวอำพลฟูดส์

4.1.5 การวิเคราะห์การเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เมื่อใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดโรงงานอำพลฟูดส์เป็นแหล่งคาร์บอน

4.2 การหาปริมาณ Aquaporous gel ที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

4.2.1 การเตรียม Aquaporous gel

4.2.2 การวิเคราะห์การตรึงเซลล์ของ Aquaporous gel ที่ตรึง *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตแคโรทีนอยด์และบำบัดน้ำเสียจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยคาดหวังว่า Aquaporous gel ที่ใช้ตรึงเซลล์แบคทีเรียจะสามารถตรึงเซลล์ได้ดี ส่งเสริมให้แบคทีเรียมีปริมาณมากขึ้นและไม่รบกวนกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ นอกจากนี้การยังคาดหวังว่าแบคทีเรียจะสามารถใช้น้ำเสียนี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้และสามารถทำให้ค่า COD ของน้ำเสียลดลงจนอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

บทที่ 2
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- ยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer), Biomate 35, Thermo scientific
- หลอดไส้ 60 W (Incandescent lamp) Phillips. Indonesia
- ตู้อบความร้อน (hot air oven) รุ่น UE 600, Memmert, Germany
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S, Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AG 285, Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer GENIE 2 รุ่น G560E), Scientific industries USA
- เครื่องวัดค่า (pH meter), Metler Toledo, Switzerland
- ตู้ดูดควัน (Fumehod) รุ่น Airone 12009s, Safelab systems, English
- เครื่องวัดค่าซีโอดี, Hanna instruments, Italy
- ตู้ปลอดเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV-124, International Scientific supply Co., Ltd., Thailand
- หลอดฝาเกลียว (Vial tube) 25 มิลลิลิตร
- วัสดุตรึงเซลล์ชนิด Aquaporous gel ขนาด 0.8 x 0.8 x 0.8 มิลลิเมตร
- ขวดดูแรน ขนาด 250 มิลลิลิตร
- เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer), C-MAG HS7

2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), Ajax Finechem Pty Ltd., New Zealand
- กรดบอริก (H_3BO_3) APS Finechem, Australia
- โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) VWR chemicals, Belgium
- ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) Merck, Germany
- น้ำตาลกลูโคส (D-glucose)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) Fisher Chemical, Belgium
- แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Merck, Germany
- แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) Merck, Germany
- โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) Carlo erba reagent, Italy
- คอปเปอร์ (II) ไนเตรต ไตรไฮเดรต ($Cu(NO_3)2 \cdot 3H_2O$) Honeywell Riedel, Germany
- กรดเอเดติก (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) Merck, Germany
- แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) Merck, Germany
- ชุดทดสอบค่าซีโอดี, Hanna instruments, Italy
- ผงอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani) Broth Becton, Dickinson and Company, USA
- หางกะทิจากตลาดสามย่าน
- น้ำเสีย AMPOL FOOD

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

นำแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 (MSCU 0924) จากคลังจุลินทรีย์ของภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเพิ่มจำนวนโดยขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB 50% (อาทิมา, 2016) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง พร้อมให้แสง Incandescent light เป็นเวลา 5 วัน

3.1.2 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเหลว LB50% และ RCVB

นำแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB 50% ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิห้องพร้อมให้แสง Incandescent light เป็นเวลา 5 วัน จาก 4.1.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB50% RCVB และน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว จาก 4.1.3 โดยนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่เลี้ยงไว้เบื้องต้นมา 5 ลูป ใส่ใน vial tube ขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB50% RCVB และน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว จากนั้นจึงนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที พร้อมให้แสง incandescent light เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงนำมาเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 โดยสังเกตุจากสีของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 9)

รูปที่ 9 การเจริญและการสร้างสารสีของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50% (ฝาสีขาว) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB (ฝาสีดำ)

จากนั้นจึงนำตัวอย่างสารละลายของแต่ละชุดการทดลองมานับจำนวนเซลล์ โดยปิเปตต์ตัวอย่างสารละลายมา 1 mL ทำให้เจือจางด้วยสารละลาย NaCl 0.85% จนได้ความเข้มข้นเป็น 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} จากนั้นจึงปิเปตต์สารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร แล้ว spread ลงบนเพลทอาหารที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องพร้อมให้แสง incandescent light

3.1.3 การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอำพลฟูดส์ ตำบลกระทุ่มล้ม อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม โดยเก็บตัวอย่างมา 1 แกลลอน ปริมาตร 5 ลิตร ซึ่งโรงงานนี้มีระบบการบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ และใช้เทคโนโลยี Modified covered lagoon ร่วมด้วย ตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บมาจะมีทั้งหมด 3 ตัวอย่าง คือ น้ำ soft pH 4 น้ำ soft pH 6-7 และน้ำเสียจากบ่อบำบัดของโรงงานอำพลฟูดส์

3.1.4 การวิเคราะห์ค่า Chemical oxygen demand และค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าวอำพลฟูดส์

นำตัวอย่างน้ำเสียที่จะใช้ในการทดลองมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 เท่าจากนั้นจึงนำไปทดสอบค่า Chemical oxygen demand ด้วยชุดทดสอบ Hanna COD HR reagent HI93754 C-25 และนำน้ำเสียแต่ละความเข้มข้นไปวัดค่า pH ด้วย pH meter จากนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าวที่เหมาะสมมาใช้ในการทำการทดลองต่อ

3.1.5 การวิเคราะห์การเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เมื่อใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดโรงงานอำพลฟูดส์เป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการวิเคราะห์ค่า COD ในน้ำเสียทั้ง 3 ชนิด ใน 3.1.4 ผู้วิจัยจึงเลือกน้ำเสียจากบ่อบำบัดโรงงานอำพลฟูดส์เป็นแหล่งคาร์บอนให้ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 โดยขั้นตอนการวิเคราะห์นี้จะใช้วิธีการเดียวกับ 3.1.2 และเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าวเมื่อเลี้ยง *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ครบ 5 วัน

3.2 การหาปริมาณ Aquaporous gel ที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

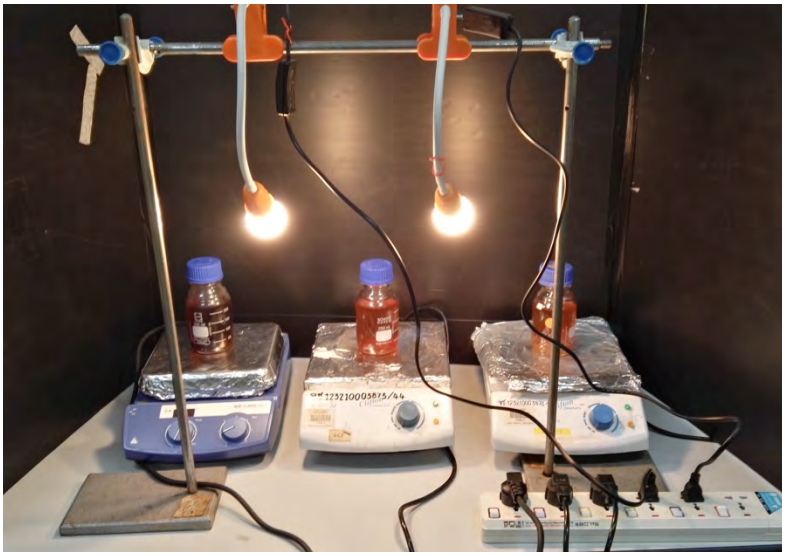
3.2.1 การเตรียม Aquaporous gel

นำ Aquaporous gel มาตัดให้ได้ขนาด 0.8 x 0.8 x 0.8 เซนติเมตร (Length x Width x Height) (Vo และคณะ, 2019) (รูปที่ 10) จากนั้นจึงนำ Aquaporous gel ไปชั่งน้ำหนักให้ได้ 2 และ 4 กรัม ตามลำดับ แล้วนำไปใส่ในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร

รูปที่ 10 Aquaporous gel ขนาด 0.8 x 0.8 x 0.8 เซนติเมตร (Length x Width x Height)

3.2.2 การวิเคราะห์การตรึงเซลล์ของ Aquaporous gel ที่ตรึง *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

นำชุดการทดลองที่ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เจริญได้ดีที่สุดจาก 3.1.4 มาทดสอบการตรึงเซลล์ด้วย Aquaporous gel โดยนำขวดดูแรน 250 มิลลิลิตร ที่มี Aquaporous gel ขนาด 2 และ 4 กรัม เติมอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดการทดลองดังกล่าว ปริมาตร 220 มิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุมที่ไม่ใส่วัสดุตรึงเซลล์ จากนั้นจึงนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้จาก 3.1.4 ปิเปตต์มา 20 มิลลิลิตร ใส่ในแต่ละขวดดูแรนที่เตรียมไว้ พร้อมนำไปคนให้เข้ากันด้วย stirrer ที่อุณหภูมิห้องและให้แสง incandescent light เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งชุดการทดลองทุกชุดโดยทำอย่างละทำ 2 ซ้ำ (รูปที่ 11) เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบทั้ง 5 วัน นำตัวอย่างสารละลายเซลล์ในแต่ละขวดดูแรนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นขนาด 660 นาโนเมตร



รูปที่ 11 การตรึงเซลล์ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 แบบเซลล์ตรึง โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว

นำน้ำเสียจาก 3.1.3 ที่วัดค่า COD แล้วอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมมาทำการทดลองต่อ โดยนำน้ำเสียนี้มา 220 มิลลิลิตร ใส่ในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณ Aquaporous gel ที่เหมาะสมจากการทดลอง 3.2.2 โดยมีชุดควบคุมเป็นขวดดูแรนที่มีน้ำเสีย 220 มิลลิลิตร ไม่มี Aquaporous gel จากนั้นจึงนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้จาก 3.1.4 มา 20 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำเสีย 220 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ก่อนหน้า จากนั้นจึงไปเลี้ยงเชื้อโดยการ stir ภายใต้ incandescent light ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน โดยทำควบคู่ไปกับการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดจาก 3.1.4 เพื่อเป็นการเปรียบเทียบการเจริญและการสร้างสารสี โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นจึงนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากแต่ละชุดทดลองไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนชั้นน้ำใสไปวัดค่า COD ส่วนตะกอนที่ได้นั้นจะนำมาวิเคราะห์ชีวมวล โดยนำตะกอนไประเหยน้ำออกด้วยตู้อบลมร้อนเป็นเวลา 1 วัน แล้วนำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) และคำนวณน้ำหนักเซลล์ต่อปริมาตร 1 ลิตร (พีรดนย์ เอื้อนศิริกุล, 2018) การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์สามารถทำได้โดยนำสารละลายเซลล์ตัวอย่างมาเจือจาง 100 เท่า และวัดปริมาณแคโรทีนอยด์โดยใช้วิธี Colorimetry ในเครื่อง TU-1900 Spectrophotometer (Beijing Puckinje General Instrument Co.) กำหนดความยาวคลื่นแสงขนาด 473 นาโนเมตร และนำไปคำนวณในสมการ Carotenoid concentration (Meng, 2017)

$$\text{Carotenoid concentration} = A_{473} \times 10000/250 \times L \times w$$

L ; ความยาวของคิวเวตต์ (Cuvett) หน่วยเซนติเมตร

W ; จำนวนเท่าที่เจือจางสารละลาย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการวัดค่า COD ของน้ำเสียทั้ง 3 ชนิดที่เก็บมาจากโรงงานอำพลฟูดส์

น้ำ Soft 4 มีค่าซีโอดีเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 4,536 mg/L น้ำ Soft 6-7 มีค่าซีโอดีเฉลี่ย คือ 2,217 mg/L และน้ำเสียจากบ่อบำบัดมีค่าซีโอดีเฉลี่ย คือ 2,664 mg/L ค่าซีโอดีเป็นเป็นค่าที่วัดถึงปริมาณทั้งหมดของออกซิเจนที่ใช้โดยจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ สารอินทรีย์ในน้ำเสียอย่างกรดไขมันพบว่ามีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแบบไม่สะสมกัมมะถัน กรดไขมันที่มีความเข้มข้นสูงจะไปทำลายเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าวทำให้ไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงเลือกน้ำเสียจากบ่อบำบัดมาใช้ในการทดลองผลิตแคโรทีนอยด์โดยใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

4.2 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเหลว LB50% RCVB และน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปมะพร้าว

จากการทดสอบการเปรียบเทียบการเจริญใน 3.1.4 พบว่าชุดการทดลองทั้ง 2 ชุด คือ ชุดการทดลองที่มีอาหารเลี้งเชื้อเหลว LB50% และ RCVB พบว่า *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 สามารถเจริญและสร้างสารสีได้ทั้งคู่ โดยสารสีที่สร้างขึ้นมานั้นเป็นสารสีสีอดง จากการเปรียบเทียบการสร้างสารสีของแต่ละชุดการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB แบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 นั้นสร้างสารสีแดงออกมาได้มากกว่าชุดการทดลองที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50% เมื่อนำไปนับจำนวนเซลล์ของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี spread plate พบว่าได้ผลดังนี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50% ที่ความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 10^{-6} สามารถนับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้ 128 $\pm$ 12.01 โคโลนี และเมื่อคำนวณเป็น CFU/mL จะได้เท่ากับ (1.28×10^{9}) $\pm$ 12.01 CFU/mL ส่วนผลการนับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB พบว่า ที่ความเข้มข้น 10^{-6} สามารถนับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้ 136 $\pm$ 15.04 โคโลนี และเมื่อคำนวณเป็น CFU/mL จะได้เท่ากับ (1.36×10^{9}) $\pm$ 15.04 ดังตารางที่ 2 ค จากผลที่ได้ทั้งหมดสรุปได้ว่า *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50%

4.3 ผลการวิเคราะห์การตรึงเซลล์ของ Aquaporous gel ที่ตรึง *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1

จากการทดลองการตรึงเซลล์ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ด้วย Aquaporous gel พบว่าทั้งชุดการทดลองทั้ง 3 ชุด คือ ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่มี Aquaporous gel 2 กรัม และ ชุดการทดลองที่มี Aquaporous gel 4 กรัม แบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 สามารถเจริญและสร้างสารสีออกมาได้ทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่มีการสร้างสารสีออกมาได้ดีที่สุดคือชุดการทดลองที่มี Aquaporousgel 4 กรัม พร้อมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ปริมาตร 220 มิลลิลิตร

เมื่อนำตัวอย่างสารละลายแต่ละชุดการทดลองไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง พบว่าได้ค่าการดูดกลืน

แสงดังนี้ ชุดการทดลองควบคุม RCVB 220 mL + magnetic bar พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร อยู่ที่ 1.420 และ 0.560 เมื่อนำมาคิดค่าเฉลี่ยจะได้เท่ากับ 0.99 ± 0.61 ชุดการทดลองถัดมา Aquaporous gel 2 g + RCVB 220 mL + magnetic bar พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.41 และ 0.87เมื่อนำมาคิดค่าเฉลี่ยจะได้ 1.14 ± 0.39 และชุดการทดลองลำดับสุดท้าย Aquaporous gel 4 g + RCVB 220 mL + magnetic bar พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.21 และ 1.10 เมื่อนำมาคิดค่าเฉลี่ยจะได้ 1.15 ± 0.08 ดังตารางที่ 3 ค

จากผลที่ได้พบว่าชุดการทดลองที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดคือชุดการทดลอง Aquaporous gel 4 g + RCVB 220 mL + magnetic bar 0 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลอง Aquaporous gel 2 g + RCVB 220 mL + magnetic bar ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวัสดุตรึงเซลล์ Aquaporous gel ขนาด 4 กรัม ทำให้แบคทีเรียเจริญและสร้างสารสีออกมาได้มากที่สุด

4.4 ผลการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในน้ำเสียตัวอย่างที่เก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานอำพลฟูดส์

จากตัวอย่างน้ำเสียทั้ง 3 ชนิดที่เก็บมาจากโรงงานอำพลฟูดส์ จากการวัดค่า pH และค่าซีโอดีพบว่าน้ำเสียที่มีปริมาณซีโอดีสูงที่สุดคือ น้ำ soft pH4 คือ 4,536 mg/L ตามด้วยน้ำเสีย soft pH 6-7 โดยมีค่าซีโอดีอยู่ที่ 2,217 mg/L และในลำดับสุดท้าย คือ น้ำเสียจากบ่อบำบัดของโรงงานอำพลฟูดส์ซึ่งมีค่าซีโอดีอยู่ที่ 2,264 mg/L จากค่าที่ได้ดังกล่าวผู้วิจัยจึงเลือกน้ำเสียจากบ่อบำบัดมาใช้เป็นแหล่คาร์บอนในการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เนื่องจากน้ำเสียดังกล่าวมีค่าซีโอดีที่ไม่ต่ำจนเกินไปและไม่สูงจนเกินไปที่จะมีโอกาสเสี่ยงที่จะเกิดความเป็นพิษต่อตัวเซลล์ของแบคทีเรียจากองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ทั้งนี้จากผลการทดลองที่ได้พบว่า *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ไม่สามารถใช้น้ำเสียดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ไม่เกิดการสร้างสารสีหรือเกิดความขุ่นจากการเจริญแบคทีเรียเนื่องจากสีของสารละลายน้ำเสียยังคงเป็นสีเดิมเมื่อเลี้ยงเชื้อผ่านไป 5 วัน (รูปที่ 12)

รูปที่ 12 ผลการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เมื่อใช้น้ำเสียจากบ่อบำบัดโรงงานอำพลฟูดส์เป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองที่ได้มาดังกล่าวนี้จึงทำให้ต้องเพิ่มแผนการทดลองขึ้นมาหาสภาวะที่แบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 จะสามารถเจริญได้ในน้ำเสียและสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ โดยเริ่มจากนำน้ำเสียทุกชนิดที่เก็บมาจากโรงงานอำพลฟูดส์มาทดสอบการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 โดยอาจเพิ่มสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญและสร้างสารสีลงไป เช่น กรดมาลิกหรือน้ำตาลกลูโคสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน เติมโลหะทรานซิชันเพื่อกระตุ้นการสร้างสารสี จากนั้นจึงเปรียบเทียบผลจากน้ำเสีย 3 ชนิด ถ้ามีน้ำเสียชนิดใดชนิดหนึ่งที่แบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญได้ จึงนำน้ำเสียนั้นมาทดสอบการตรึงเซลล์เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ต่อ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับคือแบคทีเรียสามารถสร้างสารสีแคโรทีนอยด์ออกมาได้ปริมาณมากจากการใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนและการตรึงเซลล์ด้วย Aquaporous gel และคาดหวังว่าแคโรทีนอยด์ที่ผลิตออกมาได้จะมีประสิทธิภาพที่ดีและมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับตารางที่ 1

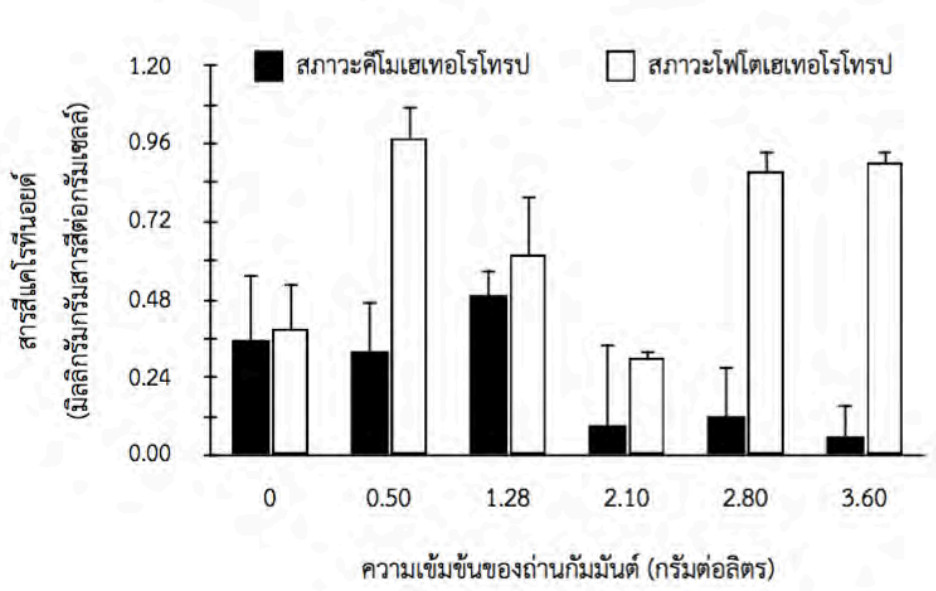
บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเรื่อง การนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าวมาผลิตแคโรทีนอยด์ด้วย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 โดยเริ่มจากการทดลองเปรียบเทียบการเจริญ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50% และ RCVB ในสภาวะกึ่งอากาศ พร้อมให้แสง Incandescent light เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์สารสีในเซลล์ของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB แบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญและสังเคราะห์สารสีออกมาได้มากกว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียใน LB50% ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากองค์ประกอบของอาหาร RCVB ที่มีองค์ประกอบเป็นสารจำพวกโลหะทรานซิชัน ซึ่งสารพวกนี้จะเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์ แคโรทีนอยด์ และแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ อย่างเช่น แมกนีเซียมในวงพอร์ไฟรินของสารสีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (Kis *et. al.,* 2015) ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีผลทำให้ชุดทดลองที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB สามารถกระตุ้นให้ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 นั้นสามารถผลิตสารสีออกมาได้มากกว่าในชุดทดลองที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50% ดังนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB มาเป็นแหล่งคาร์บอนให้แบคทีเรีย *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เพื่อทดสอบการตรึงเซลล์และสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในลำดับต่อไป

ในการตรึงเซลล์ด้วยวัสดุ Aquaporous gel ซึ่งเป็นวัสดุที่มีรูพรุนสูงจะทำให้แบคทีเรียสามารถจับกับวัสดุตรึงเซลล์ได้ดี จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการใช้วัสดุตรึงเซลล์ Aquaporous gel ขนาด 4 กรัม ในสภาวะแบบกึ่งอากาศพร้อมให้แสง Incandescent light จะทำให้ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เจริญได้ดีที่สุดและสร้างสารสีออกมามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงเซลล์ด้วยถ่านกัมมันต์หรือ activated carbon ด้วยสภาวะคีโมเฮเทอโรโทป (พีรดนย์ เอื้อนศิริกุล, 2017) พบว่าการใช้วัสดุในสภาวะดังกล่าวให้ปริมาณชีวมวลและสารสีแคโรทีนอยด์ออกมาค่อนข้างน้อย โดยได้ปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์อยู่ที่ประมาณ 1.0±0.1 mg/g นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคของ Activated carbon สามารถเสียหายได้ง่ายเนื่องจากโครงสร้างถูกต่ออยู่ในรูปแบบ amorphous structure (Judai *et. al*., 2016) ในทางกลับกัน Aquaporous gel นั้นมีโครงสร้างแข็งแรงกว่าและสามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียให้สามารถผลิตสารสีออกมาได้เช่นกัน แต่ทั้งนี้อาจต้องเพิ่มชุดการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของแบคทีเรียและการสร้างสารสีให้ดีมากยิ่งขึ้น พร้อมทั้งนำตัวอย่างที่ได้ไปสกัดแคโรทีนอยด์หลังจาก *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 เจริญดีแล้วภายใต้การตรึงเซลล์ เพื่อที่จะได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงเซลล์ดังกล่าวกับวัสดุตรึงเซลล์อื่นๆได้ และนอกจากนี้เพื่อที่จะได้เก็บเป็นข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบการตรึงเซลล์เมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียดังกล่าวอาจต้องเพิ่มสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญลงไปในน้ำเสียเพิ่ม เช่น เหล็ก แมกนีเซียม ในรูปของจุลธาตุ (trace element) เพื่อให้แบคทีเรียสามารถดูดซึมไปใช้ได้โดยง่ายและผลิตสารสีแคโรทีนอยด์ออกมา นอกจากนี้อาจต้องเติมแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจนเข้าไปเพิ่มในน้ำเสียเพื่อกระตุ้นการเจริญของ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ควรได้มากกว่า 4.1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อ

เทียบกับงานวิจัยการผลิตแคโรทีนอยด์ของพีรดนย์ปี 2017 ที่เลี้ยงเซลล์ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรปและคีโมเฮเทอโรโทรปโดยใช้ถ่านกัมมันต์เป็นวัสดุตรึงเซลล์ (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 ปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ของเชื้อที่มีการเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเปรียบเทียบช่วงการเติมผงถ่านกัมมันต์ในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน (พีรดนย์ เอื้อนศิริกุล, 2017)

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. คู่มือความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับระบบบำบัดน้ำเสียเบื้องต้นต้นและการตรวจสอบระบบบำบัดน้ำเสียด้วยตนเอง. 2558

ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด. (2017). Microbial Carotenoid Biosynthesis. วารสารมหาวิทยาลัยราชมงคลอีสาน ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 10, ฉบับที่ 3.

ปิยนุช ก้องกิตต์ไพศาล. (2542). การบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวด้วยเครื่องกรองไร้อากาศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.

พีรดนย์ เอื้อนศิริกุล. (2017). การบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ด้วยตะกอนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันแบบเม็ด. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาทิมา ปุญญวา. (2016). การผลิตสารสีจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถันและการประยุกต์ในเซลล์สุริยะชนิดสีย้อมไวแสง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fu-Shin K., Yew-Hu C., and Chan-Jiang C. (2012). Effects of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas palustris*. Bioresource Technology. 113, 315-318

Habtemarium, S. (2017). The African and Arabian Moringa Species 1st edition. Elsevier. 230.

H.N. Phong Vo,. X.-T. Bui., H.-H. Nyugen., T.-D. Tranc., K.-J. Lee., T.-T. Nyugen., B.-T. Dang., M.- H. Bui., D.D. Nyugen., and T.-T.-M. Ngo. (2019). Effects of dissolved oxygen concentration on the performance of sponge membrane bioreactor treating hospital wastewater. Desalination and Water Treatment. 151, 128–137

Judai, K., Iguchi, N., and Hatakeyama, Y. (2016). Low-Temperature Production of Genuinely Amorphous Carbon from Highly Reactive Nanoacetylide Precursors. Journal of Chemistry. Volume 2016. 6 pages

Kis, M., Sipka, G., Aszatalos, E., Razga, Z. and Maroti, P. (2015). Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 151, 110-117

Krishnasamy, G., Sabaratnam, V., and Chong, V. (1998). Isolation and growth of the p hototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain B1 in sago-starch-processing wastewater. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 14, 505-511

Liu, F., Li, J. and Zhang, L, X. (2019). Bioplastic production from wastewater sludge and application. The 5th International Conference on Water Resource and Environment. 344.

Liu, L., Shao Z., Zhang M., and Wang Q. (2015). Regulation of Carotenoid Metabolism in Tomato. Mol. Plant. 8, 28–39.

Meng, F., Yang, A., Zhang, G., and Wang, H. (2017). Effects of dissolved oxygen concentration on photosynthetic bacteria wastewater treatment: Pollutants removal, cell growth and pigments production. Bioresource Technology. 241, 993-997

Zhang, D., Yang, H., Huang, Z., Zhang, W., and Shuang-Jiang Liu. (2002). *Rhodopseudomonas faecalis* sp. nov., a phototrophic bacterium isolated from an anaerobic reactor that digests chicken faeces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52, 2055-2060.

Saejung, C. and Ampornpat, W. (2019). Production and Nutritional Performance of Carotenoid-Producing Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas faecalis* PA2 Grown in Domestic Wastewater Intended for Animal Feed Production. Waste Biomass Valor. 10, 299-310

Simpson, K. L., I.S.T.C. Tsou, and C.O. Chichester. (1989). Biochemical methodology for the assessment of carotene. The International Vitamin A Consultative Group (IVACG).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและการคำนวณปริมาณองค์ประกอบในอาหาร

อาหารเหลว RCVB

มีองค์ประกอบต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ดังนี้

ส่วนที่ 1 : สารอาหารหลัก

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.20 กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.75 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.85 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	8.00 กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	1.00 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.00 กรัม

ส่วนที่ 2 : Trace element

กรดบอริก (H_3BO_3)	2.80 มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดทไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.75 มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.24 มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	2.10 มิลลิกรัม
คอปเปอร์ (II) ไนเตรตไตรไฮเดรต ($Cu(NO_3)2 \cdot 3H_2O$)	0.04 มิลลิกรัม
กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอาเซติก (EDTA)	2.00 มิลลิกรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	11.8 มิลลิกรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.75 มิลลิกรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 ±0.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ก่อนทาให้ปลอดเชื้อด้วย autoclave

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) เจือจาง 50%

มีองค์ประกอบต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ดังนี้

ทริปโตน (tryptone)	10 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5 กรัม

เจือจางเป็น 50% โดยผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ก่อนทำให้ปลอดเชื้อด้วย autoclave กรณีเตรียมเป็นอาหารแข็ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 18 กรัม ลงในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตรก่อนทาให้ปลอดเชื้อ

คำนวณปริมาณคาร์บอน

น้ำตาลกลูโคส มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 180.156 กรัมต่อโมล ใช้น้ำตาลกลูโคส 4 กรัม คิดเป็น 0.0222 โมล น้ำตาลกลูโคส มีคาร์บอน 12 อะตอม ดังนั้น มีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 0.0222 x 12 x 4 = 1.0656 กรัม

คำนวณปริมาณไนโตรเจน

อาหารเหลว RCVB ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีแหล่งคาร์บอน 2 ส่วน คือ จากแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และสารสกัดจากยีสต์

- ปริมาณไนโตรเจนจากแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

แอมโมเนียมคลอไรด์ มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 53.491 กรัมต่อโมล ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 1 กรัม คิด เป็น 0.0187 โมล

แอมโมเนียมคลอไรด์มีไนโตรเจน 1 อะตอม ดังนั้น มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.0187 x 14 = 0.2618 กรัม

- ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10% หากใช้ปริมาณ 4 กรัม มีปริมาณ ไนโตรเจนเท่ากับ 0.4 กรัม

รวมมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเท่ากับ 0.26 + 0.4 = 0.66 กรัม

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด เท่ากับ 2:1

คำนวณปริมาณเหล็ก

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 278.01 กรัมต่อโมล ใช้เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.02 กรัม คิดเป็น 0.00007 โมล เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตมีไอออน 1 อะตอม ดังนั้น มีปริมาณไอออนเท่ากับ 0.00007 x 55.85 = 0.0039 กรัม

คำนวณปริมาณแมกนีเซียม

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 246.47 กรัมต่อโมล ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.4 กรัม คิดเป็น 0.0016 โมล แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตมีแมกนีเซียม 1 อะตอม ดังนั้น มีปริมาณแมกนีเซียมเท่ากับ 0.0016 x 24.31 = 0.039 กรัม

ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณ COD ในน้ำเสียด้วย

1. ดูดตัวอย่างน้ำเสียที่ต้องการทำการทดลองด้วย syringe ตามปริมาตรดังนี้

ตารางที่ 1 ข แสดงการวัด COD ที่ความเข้มข้นต่างๆด้วย Hanna instrument COD reagent

Range COD (mg/L)	Reagent code	Vial color	Sample quantity (mL)
0-150	HI 93754A-25 LR	red	2.0
0-1500	HI 93754B-25 MR	white	2.0
0-15000	HI 93754C-25 HR	green	0.2

หมายเหตุ ; LR = Low range, MR = Medium range, HR = High range

2. เอียง vial COD reagent ที่ต้องการใช้ทำมุม 45 องศา แล้วค่อยๆปล่อยตัวอย่างน้ำเสียใน syringe ลงไป

3. ผสม reagent ใน vial กับตัวอย่างน้ำเสียให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วปิดฝาเกลียว

4. เตรียม blank โดยนำ vial COD reagent หลอดใหม่ผสม DI water ด้วย syringe ปริมาตรเดียวกันกับตัวอย่างน้ำเสีย

5. นำหลอด reagent ที่เป็น blank และที่ผสมน้ำเสียไปวางบน Heat reactor (ทำในตู้ดูดควัน) จากนั้นจึงคลายเกลียวพร้อมตั้งอุณหภูมิให้อยู่ที่ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6. เมื่อครบ 2 ชั่วโมง จึงปิดฝาเกลียวแล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ให้เย็นแล้วนำไปวัดค่า COD ด้วยเครื่อง Hanna COD meter

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ 1ค ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าซีโอดี (mg/L) ของน้ำเสียทั้ง 3 ชนิด

ชนิดของน้ำเสีย	pH	COD (mg/L)			COD เฉลี่ย (mg/L)
น้ำ Soft pH 4	5.01	4,260	4,524	4,905	4,536
น้ำ Soft pH 6-7	6.56	2,007	2,614	2,029	2,217
น้ำเสียจากบ่อบำบัด	5.34	2,573	2,655	2,764	2,664

ตารางที่ 2ค ผลการนับจำนวนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB50% และ RCVB

Medium	Dilution	Cell count	Average	Avg. Std.	CFU/mL
LB50%	10^{-4}	TNTC	TNTC	-	-
	10^{-4}	TNTC			
	10^{-4}	TNTC			
	10^{-5}	TNTC	TNTC	-	-
	10^{-5}	TNTC			
	10^{-5}	TNTC			
	10^{-6}	116	128	12.01	1.28×10^{9}
	10^{-6}	129			
	10^{-6}	140			
RCVB	10^{-4}	TNTC	TNTC	-	-
	10^{-4}	TNTC			
	10^{-4}	TNTC			
	10^{-5}	TNTC	TNTC	-	-
	10^{-5}	TNTC			
	10^{-5}	TNTC			
	10^{-6}	137	136	15.04	1.36×10^{9}
	10^{-6}	150			
	10^{-6}	120			

ตารางที่ 3ค ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของการตรึงเซลล์ *Rhodopseudomonas faecalis* สายพันธุ์ W1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ด้วยวัสดุตรึง Aquaporous gel

ชุดการทดลอง	ลำดับที่	Optical density (660 nm)	Optical density เฉลี่ย (660 nm)	Std.
Control : RCVB 220 mL + magnetic bar	1	1.42	0.99	0.61
	2	0.56		
Aquaporous gel 2 g + RCVB 220 mL + magnetic bar	1	1.41	1.14	0.39
	2	0.87		
Aquaporous gel 4 g + RCVB 220 mL + magnetic bar	1	1.21	1.15	0.08
	2	1.10		