



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต Bacteriochlorophyll และ Carotenoid
ของ *Rhodopseudomonas palustris* AS85

ชื่อนิสิต นางสาวอารีญา เลิศประสบสุข รหัสประจำตัว 6032359323

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต Bacteriochlorophyll และ Carotenoid ของ <i>Rhodopseudomonas palustris</i> AS85	
ชื่อนิสิต	นางสาวอารีญา เลิศประสพสุข	เลขประจำตัว 6032359323
ภาควิชา	จุลชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2563	

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ชื่อโครงการ ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต Bacteriochlorophyll และ Carotenoid ของ
Rhodopseudomonas palustris AS85

โดย นางสาวอารีญา เลิศประสพสุข รหัสประจำตัวนิสิต 6032359323

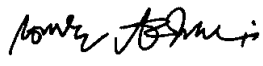
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์

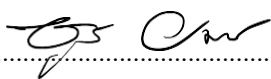
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์


..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

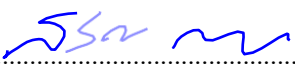
คณะกรรมการสอบโครงงาน


..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สิริสา ญ ป้อมเพ็ชร)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต Bacteriochlorophyll และ Carotenoid ของ
Rhodopseudomonas palustris AS85

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์

นิสิตในโครงการ

นางสาวอารีญา เลิศประสพสุข รหัสประจำตัวนิสิต 603 23593 23

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ

การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ชื่อโครงการ ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต Bacteriochlorophyll และ Carotenoid ของ *Rhodopseudomonas palustris* AS85

ชื่อนิสิต นางสาวอาริยา เลิศประสบสุข

รหัสประจำตัวนิสิต 6032359323

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชช์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

คาร์บอนเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในการเจริญของสิ่งมีชีวิตแหล่งคาร์บอนที่ต่างชนิดกันส่งผลให้มีพฤติกรรมในการเจริญที่แตกต่างกัน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงแบบไม่สะสมกำมะถัน (Purple non-sulfur bacteria; PNSB) เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่มีเมแทบอลิซึมที่หลากหลายและสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด PNSB สามารถผลิตรงควัตถุแคโรทีนอยด์และแบคทีริโอคลอโรฟิลล์เมื่อเจริญแบบ photoheterotroph ในภาวะที่มีแสงและไม่มีอากาศ ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่งส่งผลให้มีการสร้างรงควัตถุที่แตกต่างกันคือแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆต่อการผลิตแบคทีริโอคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของ *Rhodopseudomonas palustris* AS85 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารที่ใช้ซัคซิเนตเป็นแหล่งของคาร์บอนที่ส่งผลให้มีการเจริญของ *R. palustris* AS85 ที่ดีที่สุด โดยมีค่า OD₆₆₀ และ cell dry-weight สูงที่สุดเท่ากับ 7.47 ± 0.23 และ 1.8 ± 0.01 มก./มล. ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อใช้อาหารที่มีอะซิเตตเป็นแหล่งของคาร์บอนและผลิตแคโรทีนอยด์และแบคทีริโอคลอโรฟิลล์ได้สูงที่สุด โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 3.101 ± 0.136 mg/g นำหนักแห้งเซลล์ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าซัคซิเนตเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของ *R. palustris* AS85

Project Effect of carbon sources on carotenoid and bacteriochlorophyll production by

Rhodopseudomonas palustris AS85

Student Ms. Areeya Lertprasopsuk

ID no. 6032359323

Project advisor Kobchai Pattaragulwanit, Dr.rer.nat.

Department of Microbiology, Faculty of science, Chulalongkorn University

Abstract

Carbon source is one of the most important factors in the growth of living organisms. Different carbon sources may result in different growth behaviors. Purple non-sulfur bacteria (PNSB) are bacteria with versatile metabolic mode and can use a variety of carbon sources for growth. PNSB can produce pigments including carotenoids and bacteriochlorophyll when photoheterotrophic grown under light and anaerobic conditions. One important factor affecting pigment production is carbon source. Therefore, in this research, we are interested in investigating the effects of different carbon sources on pigment production of pigment of *Rhodopseudomonas palustris* AS85. The results revealed that succinate was the best carbon source that resulted in the optimal growth of *R. palustris* AS85, with the highest OD₆₆₀ and cell dry-weight values of 7.47 ± 0.23 and 1.8 ± 0.1 mg / mL respectively on day 5 of cultivation. High content of carotenoids and bacteriochlorophyll were obtained when using acetate as a carbon source with carotenoids content of 3.101 ± 0.136 mg / g cell dry- weight. Therefore, it can be concluded that succinate is a suitable carbon source for growth and acetate is a suitable carbon source for the pigment production of *R. palustris* AS85.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย อีกทั้งยังคอยดูแลเอาใจใส่ และเป็นกำลังใจในหลายๆ เรื่อง รวมทั้งยังช่วยแก้ไขตรวจทานโครงการนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆและให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ งบประมาณภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงานในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่สมาชิกห้องวิจัย 1704/13 และพี่สมาชิกชั้น 17 ทุกคน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อน-พี่-น้อง ในภาคจุลชีววิทยา ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา สมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญ คอยให้การสนับสนุน คอยรับฟังปัญหาและช่วยเหลือผู้วิจัยในทุกๆด้าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ สารเคมี	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	16
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก ก	33
ภาคผนวก ข	35

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 : โครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์บางชนิด	7
รูปที่ 4.1 : ลักษณะของ liquid culture เมื่อเลี้ยง <i>R. palustris</i> AS85 ในอาหารเหลว RCVB ที่ภาวะ chemoheterotroph	16
รูปที่ 4.2 : การเจริญในภาวะ photoheterotroph ของ <i>R. palustris</i> AS85 ในอาหารเหลว RCVB	17
รูปที่ 4.3 : ลักษณะโคโลนีของ <i>R. palustris</i> AS85 บนอาหารแข็ง RCVB เมื่อเลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph (ก) และภาวะ photoheterotroph (ข)	17
รูปที่ 4.4 : การเจริญของ <i>R. palustris</i> AS85 เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน malate , acetate , succinate และ fumarate	18
รูปที่ 4.5 : การเจริญของ <i>R. palustris</i> AS85 เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน propionate , molasses , sucrose , glucose และ corn steep liquor	19
รูปที่ 4.6 : น้ำหนักของเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน malate , acetate , succinate และ fumarate	19
รูปที่ 4.7 : น้ำหนักของเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน propionate , molasses , sucrose , glucose และ corn steep liquor	20
รูปที่ 4.8 : กราฟปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ <i>R. palustris</i> AS85 ในอาหารเหลวของแหล่งคาร์บอน acetate และ succinate	21
รูปที่ 4.9 : กราฟปริมาณแบคทีเรียโอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่อเซลล์ (OD770/OD660) ของ <i>R. palustris</i> AS85 ในอาหารเหลวของแหล่งคาร์บอน acetate และ succinate	21
รูปที่ 5.1 : MEP pathway	25

บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria)

Photosynthetic bacteria (PSB) คือ สามารถใช้แสงเป็นแหล่งของพลังงานได้และเป็นแบคทีเรียที่มีเมแทบอลิซึมที่หลากหลาย ส่งผลให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในหลายสภาวะแวดล้อม ทั้งในที่ที่มีแสง ไม่มีแสง มีอากาศและไม่มีอากาศ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แหล่งอาหารที่หลากหลายเพื่อใช้ในการเจริญ ในการเจริญแบบใช้แสงของแบคทีเรียชนิดนี้ จะใช้กรดอินทรีย์และแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และจะใช้รงควัตถุที่เรียกว่าแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ทำหน้าที่รับแสงช่วงคลื่นต่างๆ คล้ายกับคลอโรฟิลล์ในพืช เพื่อใช้เป็นพลังงานในการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อผลิตเป็นสารพลังงานสูงหรือ ATP ที่จำเป็นต้องมีเพื่อดำเนินเมแทบอลิซึมต่างๆภายในเซลล์ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่มีความเป็นพิษทั้งยังสามารถผลิตสารชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมายรวมถึงรงควัตถุต่างๆที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ทำให้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมเกษตร และอุตสาหกรรมอาหาร Photosynthetic bacteria แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามความสามารถในการผลิตออกซิเจนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Qi และคณะ, 2018) ได้แก่

Oxygenic photosynthetic bacteria

คือกลุ่มของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีกระบวนการใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอนคล้ายกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอตหรือในพืชชั้นสูง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ มีออกซิเจนเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์จากกระบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ Cyanobacteria , Prochlorophytes (Idi, 2015)

Anoxygenic photosynthetic bacteria

คือแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ไม่สามารถใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงไม่มีออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ แต่สามารถใช้สารอินทรีย์อื่นๆเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแทนได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 2 กลุ่ม คือ Green Bacteria และ Purple Bacteria โดยอาศัยความแตกต่างกันของชนิดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ทำให้มีสีที่ต่างกัน โดยแบคทีเรียในกลุ่ม Green Bacteria จะมีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ชนิด c และ d และในกลุ่ม Purple Bacteria จะมีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ชนิด a และ b แสง (Qi และคณะ, 2018)

Photosynthetic Green Bacteria

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว มีโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า chlorosome ทำหน้าที่ดูดกลืนแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสง ภายในประกอบด้วยแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ c , d และ e เป็นจำนวนมาก (Thweatt และคณะ, 2019) โดยปริมาณของแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดจะส่งผลถึงสีโคโลนีของเชื้อ ที่มีตั้งแต่สีเขียวจนถึงสีน้ำตาล (Thiel และคณะ, 2018) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวยังสามารถแบ่งกลุ่มตามความสามารถในการสะสมกำมะถันได้เป็น green sulfur bacteria เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวที่มีการสะสมกำมะถัน แบคทีเรียชนิดนี้เจริญภายใต้ภาวะที่ไม่มีอากาศและมีแสง มีการใช้ S^{2-} , H_2 หรือ Fe^{2+} เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน มักนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (Takaiekhosani และคณะ, 2017) แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ แฟมิลี *Chlorobiaceae* (Lu และคณะ, 2019) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวอีกกลุ่มคือ green non-sulfur bacteria เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวที่ไม่มีการสะสมกำมะถัน แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะ photoautotroph , photoheterotroph และ mixotroph มีการใช้สารประกอบอินทรีย์ กรดไขมันขนาดเล็ก กรดแอมโมเนีย และเอทานอล เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ แฟมิลี *Chloroflexaceae* (Lu และคณะ, 2019)

Photosynthetic Purple bacteria

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงมีการผลิตตรงควัตถุแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ชนิด a , b และแคโรทีนอยด์ทำให้มีลักษณะของเชื้อมีสีเหลืองจนถึงม่วงแดงขึ้นกับปริมาณของรงควัตถุแต่ละชนิด (Thiel และคณะ, 2018) มีการใช้สารอินทรีย์และสารประกอบซัลเฟอร์อนินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงมีการแบ่งกลุ่มตามความสามารถในการสะสมกำมะถันเช่นเดียวกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว คือ purple sulfur bacteria เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่สะสมกำมะถัน เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการสารประกอบซัลเฟอร์อนินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เช่น H_2S หรือ SO_3^{2-} แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ แฟมิลี *Chromatiaceae* และ *Ectothiorhodospirillaceae* แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงอีกกลุ่มคือ purple non-sulfur bacteria เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมกำมะถัน เป็นแบคทีเรียที่มีการใช้สารประกอบอินทรีย์ เช่น อะซีเตต , มาเลต , พูมาเรต และ โพรพิโอเนต เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ แฟมิลี *Rhodospirillaceae* (Lancaster, 2018)

Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB)

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นรูปท่อน (rod shape) เป็น proteobacteria เช่นเดียวกับกับ *E.coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม purple bacteria ที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดใน Photosynthetic bacteria ตามธรรมชาติจะอยู่แบบ phototroph ในการเจริญภาวะนี้ PNSB จะมีการผลิตตรงควัตถุ ได้แก่ แบคทีเรีย

คลอโรฟิลล์ชนิด a , b และแคโรทีนอยด์ (Thiel และคณะ, 2018) เพื่อทำหน้าที่รับแสงในช่วงคลื่นต่างๆ เพื่อใช้เป็นพลังงานในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ โดยการเจริญแบบใช้แสงของ PNSB ยังแบ่งได้ตามชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญแหล่งชนิดของตัวให้อิเล็กตรอน คือ การเจริญแบบ photoautotroph จะใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอน การเจริญแบบ photoheterotroph จะใช้สารอินทรีย์ต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีการเจริญแบบ photolithoautotroph โดยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งของคาร์บอนและใช้สารอนินทรีย์เช่น S^{2-} , H_2 หรือ Fe^{2+} เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เนื่องจาก PNSB มีระบบแสง (photosystem) เพียง 1 ชนิด อยู่ใน intracellular membrane ทำให้ไม่มีพลังงานมากพอในกระบวนการแยกน้ำเพื่อให้ได้อิเล็กตรอน แต่ PNSB สามารถใช้กรดอินทรีย์สายสั้นและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เพื่อเป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ (Xu, 2007) ในภาวะที่ไม่มีแสง PNSB ก็สามารถเจริญได้เช่นกัน โดยจะมีการเจริญแบบ chemoheterotroph จะใช้สารอินทรีย์ต่างๆ เป็นแหล่งของคาร์บอนและไม่มีการสร้างรงควัตถุ จากการที่แบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการปรับตัวที่ดี ส่งผลให้สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ทั่วไป ทั้งในดินและแหล่งน้ำต่างๆ เช่น ดินตะกอน , แม่น้ำ , บ่อน้ำ , มหาสมุทร รวมถึงบ่อบำบัดน้ำเสีย และยังสามารถพบในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิสูง กรดสูง หรือมีเกลือสูง (Madigan และคณะ, 2008)

การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียในกลุ่ม PNSB

ด้านสิ่งแวดล้อมและพลังงาน

จากความสามารถของ PNSB ที่สามารถดำรงชีวิตได้ในหลายสภาวะแวดล้อม รวมถึงความทนทานต่อความเป็นพิษของสารต่างๆ เช่น H_2S และโลหะหนัก ทำให้ PNSB ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อมมากมาย (Saleem และคณะ, 2019) ตัวอย่างการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ผลิตเชื้อเพลิง Biohydrogen ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงสะอาดที่ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่าสามารถใช้ทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลได้ (Saleem และคณะ, 2018) กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นเมื่อ PNSB อาศัยในแหล่งอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนหรือน้อย และต้องอยู่ในที่ที่ได้รับแสง โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนที่ได้จากระบวนการ electron transport chain โดยมีแสงเป็นแหล่งพลังงาน เปลี่ยนโปรตอนให้เป็นก๊าซไฮโดรเจน (Xu, 2007) ด้วยประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อมจึงทำให้วิธีการผลิตไฮโดรเจนนี้ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากมาย ตัวอย่างงานวิจัยในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในปี 2012 การศึกษาของ Han และคณะ โดยใช้ *Rhodobacter sphaeroides* RV พบว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 794 mmol H_2 /mol-substrate เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนร่วมกัน 2 ชนิด คือ acetate และ succinate และพบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนร่วมกัน 2 ชนิด จะส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ในปี 2011 การศึกษาของ Pandey และคณะ เมื่อใช้ *Rhodobacter sphaeroides* NMBL-01 พบว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุดเมื่อใช้ malate เป็นแหล่งคาร์บอนและ glutamate เป็นแหล่งของไนโตรเจน ประโยชน์ต่อมาคือการใช้ PNSB เพื่อผลิต Bioplastic ซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ สังเคราะห์ได้จาก

PHB หรือ polyhydroxybutarate เช่น ในปี 2021 การศึกษาของ Carozzi และ Touloupakis ได้มีการใช้ *Rhodovulum sulfidophilum* DSM-1374 เพื่อผลิต poly-3-hydroxybutarate (P3HB) พบว่ามีการผลิต 596 mg/L เมื่อใช้ acetate เป็นแหล่งคาร์บอน ประโยชน์สุดท้ายที่จะกล่าวถึง คือการใช้ PNSB ในการบำบัดน้ำเสีย PNSB นิยมนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียเพราะเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีราคาถูก (Idi และคณะ, 2015) เช่นในปี 2011 Madukasi และคณะ ได้ใช้ *Rhodobacter sphaeroides* Z08 เพื่อบำบัดน้ำเสียจากการผลิตยาและน้ำเสียจากการผลิตถั่วเหลือง พบว่าค่า COD ลดลง 50% ในน้ำเสียจากการผลิตยาที่เจือจางลง 4 เท่า และ ลดลง 80% ในน้ำเสียจากการผลิตถั่วเหลือง และการศึกษาของ Negadomi และคณะ ในปี 2000 ได้มีการตรึง *Rhodobacter sphaeroides* NR-3 และ *Rhodopseudomonas palustris* ในวัสดุเซรามิกที่มีรูพรุน ใส่ลงในน้ำเสียจากท่อน้ำทิ้ง พบว่ามีค่า COD ลดลง 89% H₂S ลดลง 99.8% และปริมาณของฟอสเฟตและไนเตรด ลดลง 77% และ 99% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่า PNSB สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้จากกระบวนการสะสม polyphosphate เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อแบคทีเรียอยู่อาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนจะนำ polyphosphate ออกมาใช้ ในกระบวนการเผาผลาญ polyphosphate จะมีการปลดปล่อยอิเล็กตรอน และเกิดเป็นกระแสไฟฟ้าในระบบ Microbial fuel cell จากการศึกษาในปี 2017 ของ Lai และคณะ พบว่า *Rhodopseudomonas palustris* G11 สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้ 0.03 V โดยประมาณ ในระบบ photo-Microbial fuel cell

ด้านการเกษตร

PNSB สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ในรูปของ Single cell protein เพื่อเป็นอาหารเสริมในสัตว์ประเภท กุ้ง ปลา และไก่ เนื่องจากโปรตีนของ PNSB มีโภชนาการสูง รวมถึงมีรงควัตถุและวิตามินต่างๆ ที่สำคัญคือไม่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ การผลิตโปรตีนด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ (Chumpol และคณะ, 2018) และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม วิธีการผลิตอาจทำร่วมกับการบำบัดน้ำเสียได้อีกด้วย จากตัวอย่างการศึกษาของ Chumpol และคณะ ในปี 2018 พบว่าเมื่อใช้ *Rhodobacter sphaeroides* SS15 ในการเลี้ยงกุ้งสายพันธุ์ *Litopenaeus vannamei* กุ้งมีการเจริญเพิ่มขึ้นและมีอัตราการอยู่รอดที่สูงขึ้น ในการศึกษาของ Alloul และคณะ ในปี 2021 ที่มีการใช้ *Rhodopseudomonas palustris* และ *Rhodobacter capsulatus* ในการเลี้ยงกุ้งสายพันธุ์ *Penaeus vannamei* พบว่าทำให้กุ้งมีความทนต่อความเครียดจากปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นและยังช่วยลดการติดเชื้อของ *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรคตายด่วนในกุ้ง (Tanno และคณะ, 2016)

นอกจากนี้ PNSB ยังได้รับความสนใจมากขึ้นในการใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชเนื่องจากสามารถผลิตและสะสมสารที่ให้ประโยชน์แก่พืช (plant growth-promoting substrate) เช่น 5-aminolevulinic acid (ALA) ที่มีหน้าที่ในการควบคุมการเจริญของพืช (Sakarika และคณะ, 2020) เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเมื่ออยู่

ในภาวะที่มีความเครียด เช่น reductase , catalase และ glutathione (Sakpirom และคณะ, 2017) และยังผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆของพืช เช่น cell extension , cell division และ cell specialization ทั้งยังช่วยให้พืชสามารถทนต่อความเครียด เช่น ความเค็มและโลหะหนัก (Sakarika และคณะ, 2020)

ด้านการแพทย์

แบคทีเรียกลุ่ม PNSB สามารถผลิต coenzyme Q10 (CoQ10) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยในการเผาผลาญพลังงานของเซลล์ CoQ10 ถูกใช้เป็นส่วนประกอบใน เครื่องสำอาง , อาหารเสริมและผลิตภัณฑ์ยา (Zhi และคณะ, 2019) โดยมีฤทธิ์เช่น รักษาภาวะหัวใจล้มเหลว , เสริมภูมิคุ้มกัน , รักษาเนื้องอกและบรรเทาความเหนื่อยล้า (Cao และคณะ, 2020) นอกจากนี้ PNSB ยังมีการผลิตแคโรทีนอยด์ในการเจริญเติบโต ภาวะ phototroph แคโรทีนอยด์เป็นหนึ่งในรงควัตถุที่ PNSB สร้างขึ้น เพื่อทำหน้าที่ดูดกลืนพลังงานจากแสงมีคุณสมบัติ Pro-Vitamin A และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับ CoQ10 แคโรทีนอยด์ถูกใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมความงาม เช่น ครีมบำรุง , ครีมกันแดด และเครื่องสำอาง และถูกใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริมกล่าวว่าจะช่วยลดโอกาสการเป็นต่อกระจก บำรุงหัวใจและหลอดเลือด จนถึงลดโอกาสการเกิดมะเร็งบางชนิดได้ (Eggersdorfer และ Wyss, 2018)

จากเนื้อความข้างต้นทำให้ทราบว่า PNSB นั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย ซึ่งเป็นผลประโยชน์จากการมีเมตาบอลิซึมที่หลากหลายของ PNSB ทั้งยังสามารถพบได้ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อม รูปแบบการนำ PNSB ไปใช้ประโยชน์มีทั้งการใช้เชื่อที่ยังมีชีวิต เช่น ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ และใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืช และยังสามารถนำเซลล์ที่ไม่มีชีวิตไปใช้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น การใช้ PNSB เป็น Single cell protein ในการเลี้ยงกุ้ง , ปลา และไก่ และการสกัด CoQ10 และรงควัตถุเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ ยา และเครื่องสำอาง ด้วยประโยชน์เหล่านี้ จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษา PNSB โดยมุ่งเน้นไปที่ความสามารถในการผลิตรงควัตถุ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆได้อีกมากมาย

รงควัตถุ (Pigment)

รงควัตถุมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในการดำรงชีวิตแบบ photoautotrophs และ photoheterotroph ของ PNSB เนื่องจากเป็นสิ่งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เพื่อใช้ในการรับพลังงานจากแสงช่วงคลื่นต่างๆในการเจริญ รงควัตถุที่ PNSB สร้าง ประกอบด้วย แบคทีเรียโอคโคลโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) และ แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) รงควัตถุแต่ละชนิดจะมีช่วงคลื่นในการดูดซับที่จำเพาะแตกต่างกัน และในแบคทีเรียแต่ละชนิดก็จะผลิตในปริมาณและชนิดที่ต่างกัน รงควัตถุเหล่านี้นอกจากมีชนิดที่ต่างกันกันในแบคทีเรียต่างชนิดแล้ว แม้กระทั่งใน

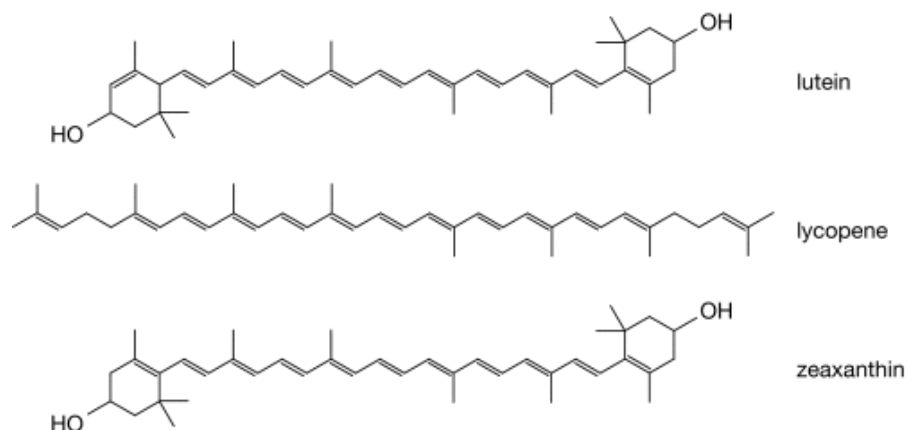
แบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่อยู่ในสภาพแวดล้อมและสารอาหารที่ไม่เหมือนกันจะส่งผลให้ผลิตรงควัตถุในปริมาณที่ไม่เท่ากันด้วย

แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll)

แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่ไวต่อแสง กรด และการถูกออกซิไดซ์ด้วยสารเคมี ถูกสร้างขึ้นในแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงไม่สร้างออกซิเจน (Oren, 2011) เช่น PNSB แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุหลักที่มีหน้าที่ในการดูดซับแสงเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยช่วงคลื่นที่มีการดูดซับได้ดีนั้นจะขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ เช่น แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์-เอ จะดูดซับได้ดีที่ความยาวคลื่น 800-870 นาโนเมตร (Oren, 2011) , แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์-จี จะดูดซับได้ดีที่ความยาวคลื่น 670-788 นาโนเมตร (Amit และคณะ 2020) แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์สามารถใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยาความไวของแสง (photosensitizer) ในการรักษาแบบ photodynamic (Wang และคณะ, 2017)

แคโรทีนอยด์ (Carotenoid)

แคโรทีนอยด์เป็นสารประกอบ polyisoprenoid hydrocarbons (Karin และคณะ, 2016) มีสีเหลือง ส้ม จนถึงแดง พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่มีการสังเคราะห์แสง หน้าที่ของแคโรทีนอยด์คือการดูดซับแสงเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยดูดซับได้ดีที่สุดที่ช่วงคลื่นของแสงสีฟ้าที่มีความยาวคลื่น 400-550 นาโนเมตร (Krishnaswamy และคณะ, 2020) ด้วยโครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์ที่มีพันธะคู่ (รูปที่ 1.1) ทำให้สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แคโรทีนอยด์ยังมีหน้าที่ในการรักษาความเสถียรให้กับระบบแสง (photosystem) ด้วย (Shuang, 2015) แคโรทีนอยด์ยังสามารถแบ่งย่อยได้มากกว่าอีก 700 ชนิด แต่แคโรทีนอยด์ที่ถูกพูดถึงและใช้งานมีอยู่ประมาณ 20 ชนิด เช่น แอลฟา-แคโรทีน, บีตา-แคโรทีน , ไลโคปีน , ลูทีนและซีแซนทีน แคโรทีนอยด์ที่ใช้งานในปัจจุบันนั้นมาจากธรรมชาติโดยตรง ทั้งจากพืชและผลไม้รวมถึงจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง การนำไปใช้ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ ในด้านการแพทย์ ที่อาศัยคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น แคโรทีนอยด์ถูกใช้ในการลดอักเสบของเซลล์ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ มีผลที่ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งไม่ว่าจะเป็นมะเร็งผิวหนังหรือมะเร็งปอด (Kiara, 2018) และยังมีการศึกษาถึงผลปริมาณแคโรทีนอยด์ที่มารดาได้รับในช่วงระหว่างตั้งครรภ์ที่หากไม่เพียงพออาจส่งผลกับพัฒนาระบบการมองเห็นของทารกในครรภ์ (Addo และคณะ, 2021) ในด้านอุตสาหกรรมความงาม มีการใช้แคโรทีนอยด์เป็นส่วนผสมของครีมบำรุงผิวและครีมกันแดด นอกจากนี้ในด้านปศุสัตว์ก็อาศัยสีของแคโรทีนอยด์เพื่อนำมาใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสีให้กับปลาสวยงามอีกด้วย (นงลักษณ์ สำราญราษฎร์, 2017)



รูปที่ 1.1 : โครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์บางชนิด

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472001203>)

แคโรทีนอยด์นั้นสามารถพบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ แต่วิธีการผลิตแคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง ก็เป็นอีกทางเลือกในการผลิต เนื่องจากเป็นวิธีที่ต้นทุนต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เช่นในปี 2000 จากการศึกษาของ Buzzini และ Martini โดยการใช้ *Rhodotorula glutinis* เลี้ยงในของเสียจากอุตสาหกรรม การเกษตร พบว่ามี biomass และแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 630 $\mu\text{g/g}$ dry-weight cell และ 5.95 mg/L ตามลำดับเมื่อเลี้ยงแบบ batch เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และการศึกษาของ Saejung และ Ampornpat ในปี 2019 ในการเลี้ยง *Rhodospseudomonas faecalis* PA2 เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยเลี้ยงใต้หลอดไฟความสว่าง 4000 lux และเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที พบว่า มี biomass และแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 33.9 g/L และ 40.9 mg/L

การสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียกลุ่ม PNSB

รงควัตถุที่แบคทีเรีย PNSB ผลิต ได้แก่ แคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอคลอโรฟิลล์ โดย PNSB จะมีการสร้างรงควัตถุเหล่านี้ในขณะที่มีการเจริญแบบ Phototroph หรือก็คือเจริญโดยใช้แสง แสงเป็นปัจจัยส่งผลต่อการผลิตรงควัตถุโดยตรง เนื่องจากรงควัตถุมีหน้าที่ในการดูดกลืนแสงมาใช้เป็นพลังงานในกระบวนการต่างๆของเซลล์เช่นในการศึกษาของ Zhou และคณะ ในปี 2015 พบว่า เมื่อใช้หลอดไฟเป็นแหล่งกำเนิดแสง จะมีการสร้างแคโรทีนอยด์มากกว่าแบคทีเรียโอคลอโรฟิลล์ เนื่องจากช่วงแสงที่หลอดไฟส่งออกมานั้นมีความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร มากที่สุด ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่แคโรทีนอยด์ดูดกลืนได้ดี คือ 450-550 นาโนเมตร ในขณะที่แบคทีเรียโอคลอโรฟิลล์สามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 715-1050 นาโนเมตร นอกจากปัจจัยของแสงแล้ว แหล่งคาร์บอนก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่าแบคทีเรียในกลุ่ม PNSB นอกจากสามารถเจริญได้ในหลายสภาวะแล้ว ยังพบว่ามีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ PNSB ใช้ได้

เช่น malate, succinate, fumarate, acetate, ethanol, lactate, propionate (Sojka, 1978; Trüper และ Pfennig, 1981) บางชนิดยังสามารถใช้สารประกอบอะโรมาติก เช่น benzoate, อนุพันธ์ไฮดรอกซิลของ benzoate และ cyclohexane carboxylate (Gibson และ Harwood, 1995) ซึ่งแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดนี้เอง ก็ส่งผลให้มีการเจริญและการสร้างรงควัตถุที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากความสามารถของแบคทีเรีย PNSB แต่ละสายพันธุ์ ก็จะมีกระบวนการการนำคาร์บอนไปใช้ที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลทำให้แหล่งคาร์บอนบางชนิดอาจส่งเสริมการเจริญและการผลิตรงควัตถุที่ดีในสายพันธุ์หนึ่ง แต่กลับยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่ง เพราะแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมือนกัน เช่นใน *Rhodobacter sphaeroides* พบว่าในอาหารที่มี succinate เป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตรงควัตถุได้มากกว่าอาหารที่มี acetate เป็นแหล่งคาร์บอนในระยะเวลาที่เท่ากัน (Huia และคณะ, 2015) หรือการใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งอาจไม่สามารถทำให้มีการเจริญได้ เช่น PNSB เองที่พบว่า lactate ที่ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวได้ (Govindaraju และคณะ, 2019) หรือใน *Rs. rubrum* ที่พบว่าไม่มี glucose transporter ทำให้ไม่สามารถใช้ glucose ในการเจริญได้ (Hädicke และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังมีการนำ PNSB ไปบำบัดน้ำเสียหรือของเสียไม่มีมูลค่าจากอุตสาหกรรม ของเสียเหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความซับซ้อนและยังมีองค์ประกอบของสารชนิดอื่นๆที่หลากหลาย เช่น น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารที่มีส่วนประกอบของ volatile fatty acids (VFAs) สูง ในการเลี้ยง *Rhodospseudomonas palustris* ACCC10649 พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณรงควัตถุแคโรทีนอยด์เท่ากับ 2719.3 mg/L และ 3.91 mg/g-biomass ตามลำดับ (Liu และคณะ, 2016) นอกจากนี้ปัจจัยของชนิดแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลแล้ว ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอนก็มีผลเช่นเดียวกัน เช่น การเลี้ยงเชื้อผสม PNSB ด้วยน้ำเสียจากการผลิตไวน์ พบว่าเมื่อนำน้ำเสียไปเจือจางลง 1 เท่า ทำให้มีการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำเสียโดยที่ไม่ได้เจือจาง (Policastro และคณะ, 2020)

ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญและการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย PNSB ในแง่ของการผลิตรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้มากมาย และการนำ PNSB ไปบำบัดน้ำเสียชนิดต่างๆจากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อลดปัญหาสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาเพื่อยืนยันผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญของเชื้อ และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุ และจากที่กล่าวในข้างต้นว่า PNSB มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย ตั้งแต่คาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนจนถึงคาร์บอนที่มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน จึงได้เลือกแหล่งคาร์บอนพื้นฐาน 7 ชนิด ได้แก่ acetic acid , succinic acid , fumaric acid , malic acid , propionic acid , sucrose และ glucose และแหล่งคาร์บอนที่มีความซับซ้อน 2 ชนิด ได้แก่ corn steep liquor (CSL) และ โมลาส (molasses) ซึ่งแหล่งคาร์บอนพื้นฐานทั้ง 7 ชนิดนี้ล้วนแล้วแต่เกี่ยวข้องกับ TCA cycle ซึ่งเป็นวัฏจักรเพื่อการสร้างพลังงานในรูป ATP ของสิ่งมีชีวิต ในขณะที่ corn steep liquor (CSL) และ โมลาส (molasses) ที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ซับซ้อนนั้นเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งข้าวโพดและการผลิตน้ำตาล โดยมีรายละเอียดและส่วนประกอบดังนี้

Corn steep liquor

Corn steep liquor (CSL) หรือน้ำแช่ข้าวโพด มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลหนืดเล็กน้อย เป็นของเสียจากกระบวนการผลิตแป้งข้าวโพดด้วยวิธีการโม่แบบเปียกในขั้นตอนการแช่ข้าวโพดเพื่อให้เมล็ดคั้นน้ำและเพื่อให้เกิดการสร้างกรดแลคติกและแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ CSL จะประกอบด้วยน้ำ 40-60 % ส่วนที่เหลือเป็นส่วนหนึ่งของแข็งที่อุดมไปด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นๆ เช่น อะลานีน , อาร์จินีน , ฮิสทีดีน , ฮีสทีดีน และ ไอโซลิวซีน นอกจากนี้ยังมีกรดแลคติก , วิตามิน เช่น ไบโอฟลาเวิน , ไนอาซิน และ ไพโรดอกซีน , โลหะหนักในปริมาณน้อย เช่น แมงกานีส , ตะกั่ว , อะลูมิเนียม และ คอปเปอร์

โมลาส (molasses)

โมลาส (molasses) หรือ กากน้ำตาล เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายซึ่งมาจากส่วนของเหลวในการต้มข้าวโพดหรือข้าวสาลีเพื่อแยกผลึกน้ำตาล มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม มีปริมาณน้ำตาลได้มากถึง 85° Brix และมีองค์ประกอบอื่นๆ คือ แมงกานีส , แมกนีเซียม , คอปเปอร์ , วิตามินบี-6 , เซเลเนียม , โปแทสเซียม , เหล็ก และ แคลเซียม โดยโมลาสที่ใช้จะเป็นโมลาสชนิด Blackstrap Molasses เป็นโมลาสที่นำออกมาในช่วงท้ายของกระบวนการต้ม มีสีเข้มที่สุด ความหวานน้อยมากและมีรสขม มีวิตามินและเกลือแร่สูง และมีสารต้านอนุมูลอิสระ

Rhodopseudomonas palustris AS85

Rhodopseudomonas palustris สายพันธุ์ AS85 เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน ที่คัดแยกได้จากแอคทิเวเทดสลัดจ์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ติดสีแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้นและสามารถเคลื่อนที่ได้ ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีในภาวะ photoheterotroph บนอาหารแข็ง RCVB คือ กลมมูน ขอบเรียบ สีแดงเข้ม และภาวะ chemoheterotroph บนอาหารแข็ง RCVB มีลักษณะโคโลนี กลมมูน ขอบเรียบ สีขาว ตรงกลางมีสีออกส้ม ซึ่งสายพันธุ์ AS85 เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงชนิดแรกที่มีรายงานการย่อยสลาย 1% ดีเซลได้และให้ผลการบำบัดดีเซลในน้ำจืดได้มากถึง 80% ในเวลา 14 วัน จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำที่มีการปนเปื้อนดีเซลได้ (ชินสุมน บุญเจริญ, 2559)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆต่อการผลิตแบคทีเรียโอบิโอฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas palustris* AS85

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX, USA
2. ขวดลูกชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX, USA
3. เข็มฉีดยาพลาสติกขนาด 20 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
4. คิวเวตต์ควอตซ์ (Quartz cuvette) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Fisher Scientific, USA
5. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG6002-S ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
6. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) รุ่น AG285 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องวัดความเข้มแสง (Digital lux meter) รุ่น LX 801 ของบริษัท Nicety, china
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S20 SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
9. เครื่องเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Visible Spectrophotometer) รุ่น Genesys 30 ของบริษัท Thermo Scientific Industries, USA
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Superspeed table-top centrifuge)
11. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
12. เครื่องเขย่าชนิดหมุนรอบ (Orbital shaker) รุ่น innova2300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
13. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ของบริษัท Greiner Bio-One, Thailand
14. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเทตขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Sartorius Biolab Product, Germany
15. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
16. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น LV1250 ของบริษัท Official Equipment Manufacturing, Thailand
17. ตู้อบแห้ง (Oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand
18. ตู้แช่เยือกแข็ง (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
19. ตู้อบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท HIRAYAMA, Japan
20. ถุงมือยาง (Examination gloves) ของบริษัท Sri Trang Gloves, Thailand

21. ทิปไมโครปิเปต (Pipette Tips) ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Hycon plastic
22. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
23. ปีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX, USA
24. หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร ของบริษัท BioMerieux, France
25. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France
26. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16x150 มิลลิลิตร ของบริษัท PYREX, USA
27. หลอดเอฟเพนด์อर्फ (Eppendorf tube) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท AXYGEM, USA
28. หลอดไฟชนิดไส้ร้อน (Incandescent light bulb) 60 วัตต์ ของบริษัท Sighify Philippines, Philippines

เคมีภัณฑ์

1. กรดมาลิก (DL-Malic acid) ของบริษัท Loba chemie, India
2. กรดอะซิติก (Acetic acid) ของบริษัท Scharlau, Spain
3. โซเดียมโพรพิโอเนต (Sodium propionate) ของบริษัท Sigma-aldrich, Germany
4. กรดซัคซินิก (Succinic acid) ของบริษัท May and Baker, England
5. กรดฟูมาริก (Fumaric acid) ของบริษัท British Drug Houses, England
6. โมลาส (Molasses) ของบริษัท Matahari, Paraguay
7. โมลาส (Molasses) ของบริษัท Mitr Phol, Thailand
8. คอร์นสตีปเคอร์ (Corn steep liquor) ของบริษัท Spectrum Chemical, USA
9. กลูโคส (D(+)-Glucose) ของบริษัท Merck, Germany
10. ซูโครส (Sucrose) ของบริษัท Mitr Phol, Thailand
11. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
12. ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
14. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Merck, Germany
15. สารสกัดจากยีสต์ ของบริษัท Difco Laboratories, USA
16. กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia
17. ไดโซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA
18. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA
19. แมงกานีส (II) ซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท M.B. Laboratories, England
20. คอปเปอร์ (II) ไนเตรตไตรไฮเดรต ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA

21. กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติก (Ethylene diamine tetraacetic acid;EDTA) ของบริษัท Sigma, USA
22. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Sigma, USA
23. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
24. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
25. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
26. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, Germany
27. เอทานอลสัมบูรณ์ (absolute ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
28. อะซีโตน (acetone) ของบริษัท Merck, Germany
29. อาหารเลี้ยงเชื้อ NB (Nutrient Broth) ของบริษัท Merck, Germany

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Rhodopseudomonas palustris* AS85 จากคลังแบคทีเรียของภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คัดแยกได้จากแอททิเวเทดสลัดจ์ (ซินสุมน บุญเจริญ, 2559)

3.2 เตรียมหัวเชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* AS85

3.2.1 การกระตุ้นเชื้อ

นำ *R. palustris* AS85 ที่เก็บในอุณหภูมิ -80°C มาชັดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มในภาวะ chemoheterotroph ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ละชนิดแบบเรียงตามลำดับ ได้แก่ Nutrient broth (NB), 1:1 Nutrient broth: RCVB และ RCVB (Tao และคณะ, 2008) โดยจะใส่เชื้อและบ่มให้เจริญตามวิธีในข้อ 3.2.2 เมื่อเชื้อเจริญครั้งที่ 1 นำเชื้อจากครั้งที่ 1 ใส่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงในครั้งที่ 2 บ่มให้เชื้อเจริญอีกครั้งและใส่ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงในครั้งที่ 3 ทำเช่นนี้จนครบในอาหารทั้ง 3 ชนิดข้างต้น ในอาหาร 1 ชนิด จะเลี้ยงทั้งหมด 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งของการเลี้ยง จะเลี้ยงครั้งละ 3-7 วันเพื่อกระตุ้นเมตาบอลิซึมของเซลล์ และเพื่อให้คุ้นเคยกับสารอาหารของ RCVB

3.2.2 การเพาะเลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph

การเลี้ยงเชื้อแบบ chemoheterotroph ทำได้โดยใส่อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรใส่หัวเชื้อ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ไม่มีแสง

3.2.3 การเพาะเลี้ยงในภาวะ Photoheterotroph

การเลี้ยงเชื้อแบบ photoheterotroph ทำได้โดยใส่อาหารเหลว RCVB 18 มิลลิลิตรในหลอดฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร และใส่หัวเชื้อที่เพาะเลี้ยงตามข้อ 3.2.2 จนมีปริมาณรวมเกือบเต็มหลอด (ประมาณ 2 มิลลิลิตร) จากนั้นเลี้ยงใต้แสงโดยใช้หลอดไฟทั้งสแตนกำลังไฟ 60 วัตต์ ที่ความสว่างประมาณ 3000 lux หรือที่ความห่างจากหลอดไฟประมาณ 30 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส ในระหว่างการบ่มกลับหลอดเชื้อวันละอย่างน้อย 1 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ของเชื้อไม่ตกตะกอน

ที่กั้นหลอด บ่มเป็นเวลา 3-7 วัน จึงถ่ายลงอาหารหลอดใหม่ เลี้ยงในสภาวะนี้อย่างน้อย 3 ครั้ง จึงนำไปทำการทดสอบต่อไป

3.3 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างรงควัตถุ

3.3.1 การแปรผันแหล่งคาร์บอน

เพาะเลี้ยง AS85 แบบ photoheterotroph ตามวิธีในข้อ 3.2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCVB ที่มี malate เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนมีสีแดงทั้งหมด ปรับ OD₆₆₀=1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง เพาะเลี้ยง *R. palustris* AS85 ใน RCVB ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ acetate, malate, succinate, propionate, fumarate, sucrose, glucose, corn steep liquor และ molasses โดยใช้ปริมาณเดียวกันกับ malate คือ 4 กรัม เพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2.2 สุ่มเก็บตัวอย่างนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm และทำ cell-dry weight ตามวิธีในข้อ 3.3.3 นำข้อมูลที่ได้ไปวาดกราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ เพื่อหาระยะในช่วง late log phase ของอาหารแต่ละชนิด จากนั้นเก็บตัวอย่างในช่วง late log phase เพื่อนำมาสกัดรงควัตถุ ตามวิธีในข้อ 3.3.2

3.3.2 การสกัดรงควัตถุ

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเอพเพนดอร์ฟปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส (supernatant) และเติมน้ำปลอดเชื้อ (sterile water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จากนั้น เติมน้ำอะซิโตนและเมทิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 7:2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใส (supernatant) ที่มีรงควัตถุอยู่มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร (Kang และคณะ, 2016) และที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร (Pollich และคณะ, 1995) ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยมีวิธีการคำนวณปริมาณรงควัตถุตามสมการต่อไปนี้

- ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร) = $\frac{AD(V1)}{0.16(V2)}$

- เมื่อ
- A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร
 - D คือ dilution factor ของตัวอย่าง
 - V1 คือ ปริมาณของ acetone : methanol ที่เติมลงไป (มิลลิลิตร)
 - V2 คือ ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)
 - 0.16 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของแคโรทีนอยด์ (Kang และคณะ, 2016)

- ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียโคลิกโรฟิลล์ทั้งหมดต่อเซลล์ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร (OD_{770})/ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) (Pollich และคณะ, 1995)

3.3.3 การหา cell-dry weight

นำตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเอพเพนดอร์ฟ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่มีส่วนน้ำใส (supernatant) ล้างตะกอนเซลล์สองครั้งด้วยการใช้น้ำปลอดเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วย vertex mixer และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และที่ส่วนน้ำใส (supernatant) นำส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ที่ได้หลังจากการล้างตะกอนไปอบในตู้อบ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 วัน นำมาชั่งน้ำหนักแบบทศนิยม 4 ตำแหน่งทุกวันจนน้ำหนักที่ได้คงที่แล้วจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อมิลลิลิตร (Soon และคณะ, 2014)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

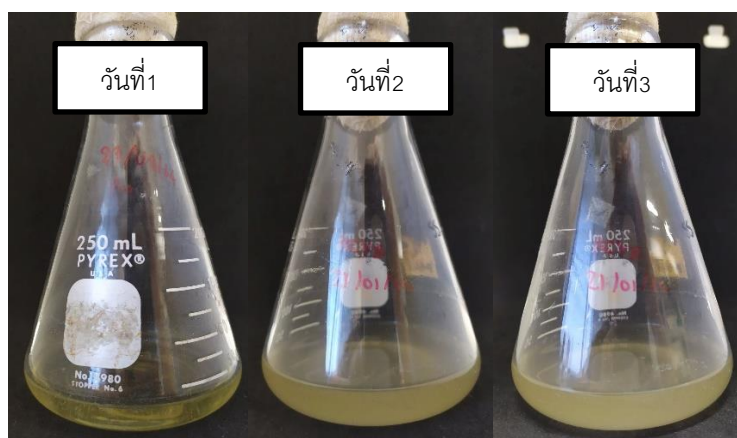
ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของ *R. palustris* AS85

การเจริญแบบภาวะ chemoheterotroph

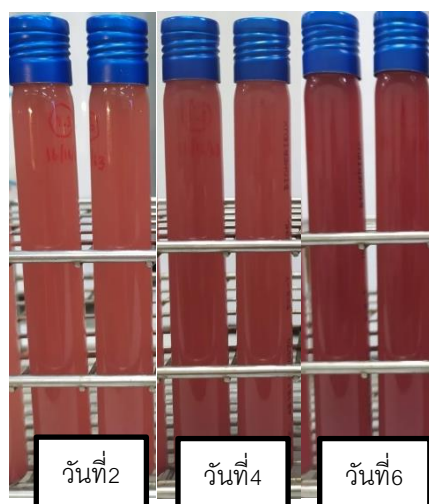
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว RCVB โดยการบ่มบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลืองอ่อน ความขุ่นมากขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยง (รูปที่ 4.1) ในอาหารแข็ง RCVB โคโลนีของเชื้อมีสีชมพูอ่อน ขนาดเล็ก ลักษณะโคโลนี กลม นูน ขอบเรียบ มันวาว (รูปที่ 4.3 ก)

ในการเจริญแบบภาวะ photoheterotroph

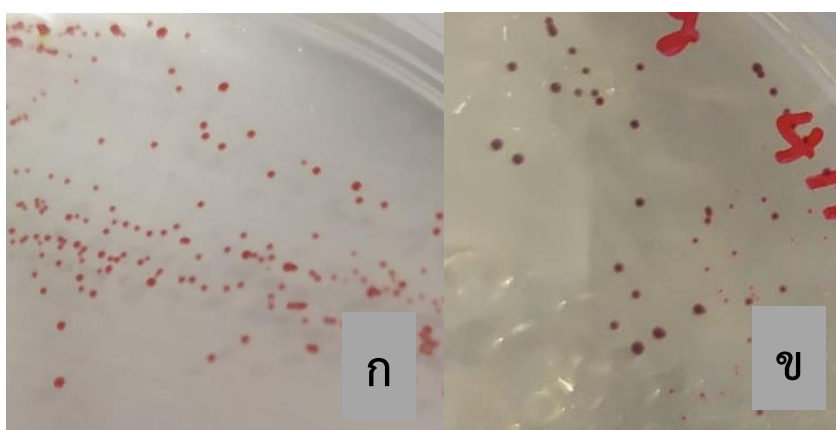
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว RCVB แบบ photoheterotroph พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีแดงอมม่วงและสีเข้มขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยง ในวันที่ 3 เป็นต้นไปจะสังเกตเห็นตะกอนสีแดงอยู่ที่ก้นหลอด และเพิ่มปริมาณมากขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยง (รูปที่ 4.2) ในอาหารแข็ง RCVB โคโลนีของเชื้อมีสีแดงเข้ม ขนาดใหญ่ ลักษณะโคโลนี กลม นูน ขอบเรียบ มันวาว (รูปที่ 4.3 ข)



รูปที่ 4.1 : ลักษณะของ liquid culture เมื่อเลี้ยง *R. palustris* AS85 ในอาหารเหลว RCVB ที่ภาวะ chemoheterotroph



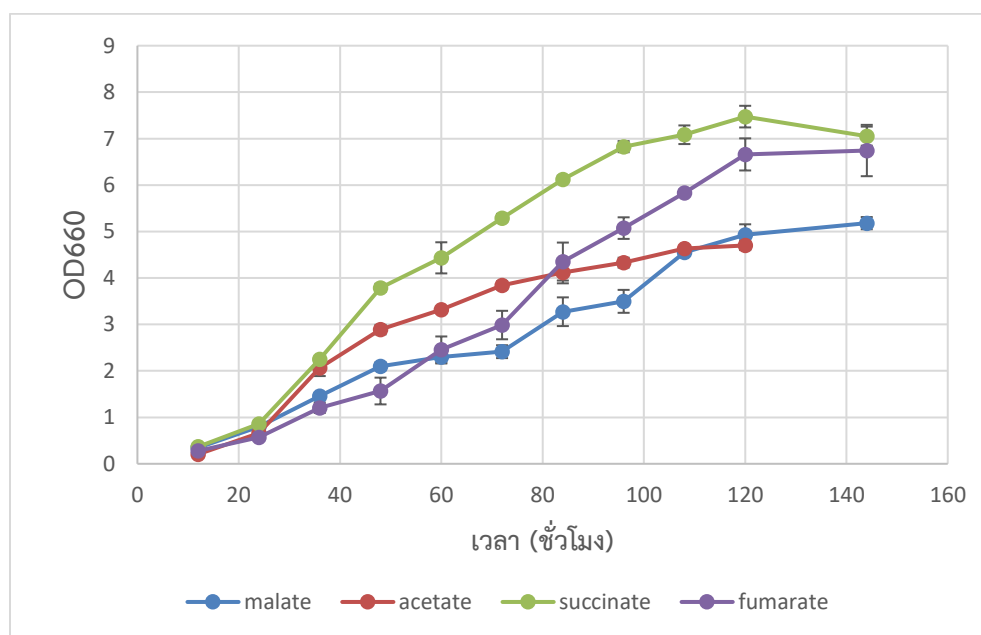
รูปที่ 4.2 : การเจริญในภาวะ photoheterotroph ของ *R. palustris* AS85 ในอาหารเหลว RCVB



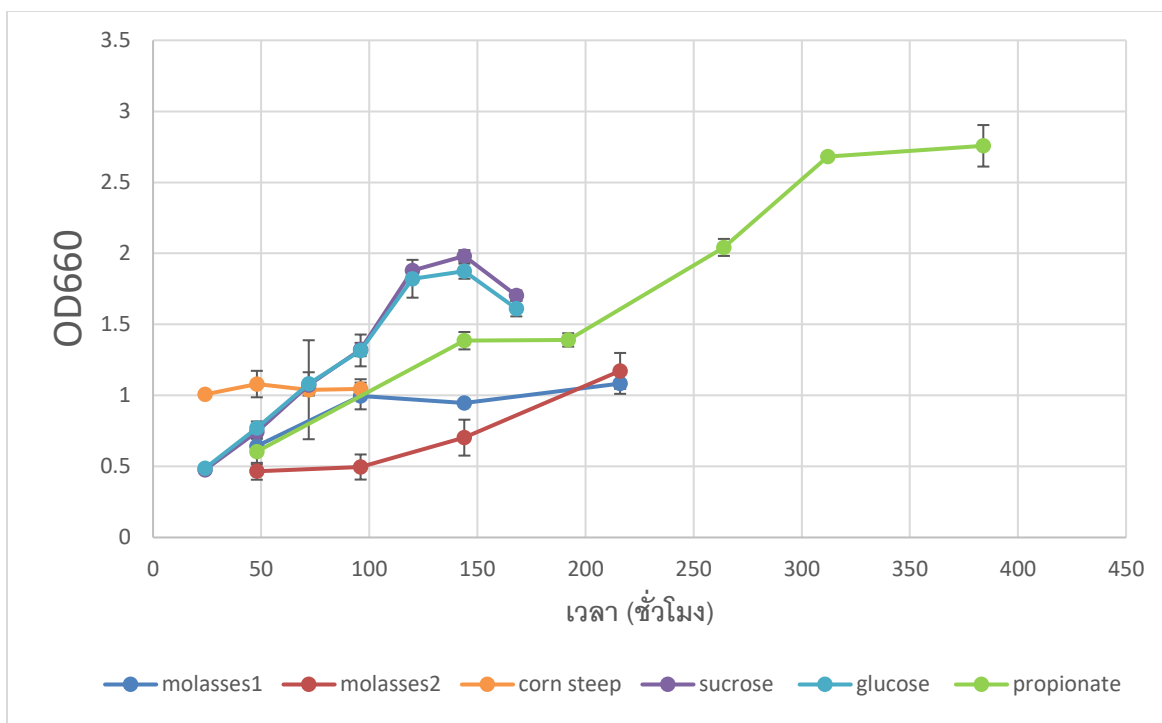
รูปที่ 4.3 : ลักษณะโคโลนีของ *R. palustris* AS85 บนอาหารแข็ง RCVB เมื่อเลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph (ก) และภาวะ photoheterotroph (ข)

ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของ *R. palustris* AS85

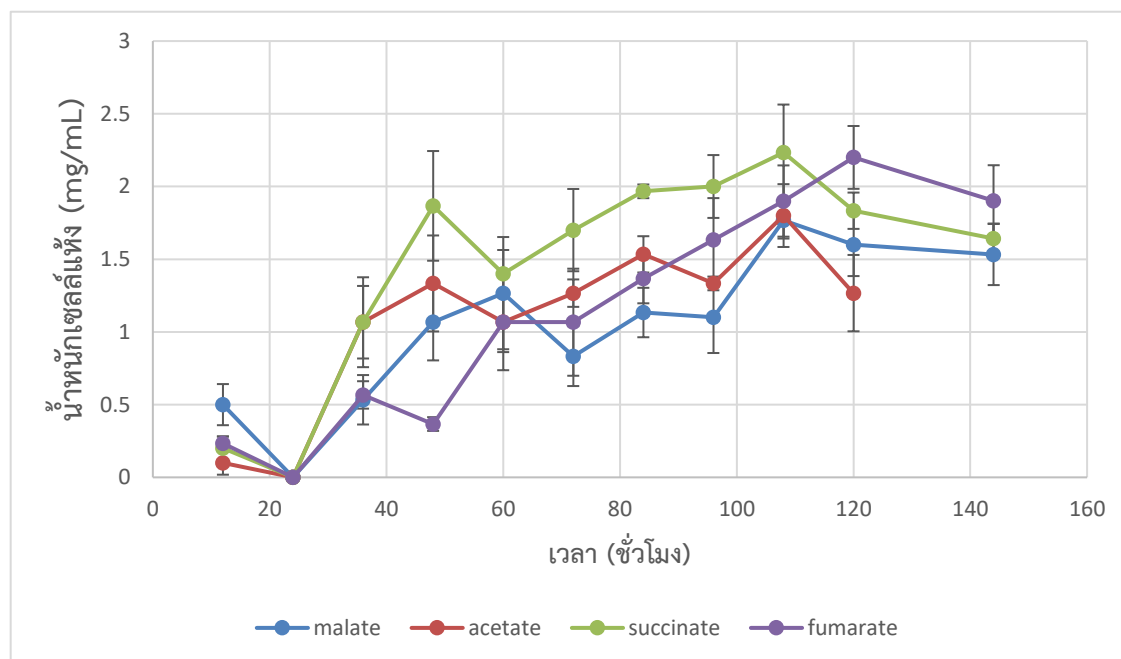
จากการเลี้ยง *R. palustris* AS85 ในภาวะ photoheterotroph ในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร ได้หลอดใสขนาด 60 วัตต์ ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 9 ชนิด ได้แก่ acetate , succinate, malate , fumarate, propionate , sucrose , glucose , corn steep liquor และ molasses ในระหว่างที่เลี้ยงเก็บตัวอย่างมาเพื่อสร้าง growth curve และหาระยะ late log phases ของ *R. palustris* AS85 ในอาหารแต่ละชนิด พบว่าในอาหารที่มีการใช้ acetate มีเวลาที่อยู่ในช่วง late log phases ที่ 108 ชั่วโมง อาหารที่ใช้ malate , succinate , fumarate , sucrose และ glucose มีเวลาที่อยู่ในช่วง late log phases ที่เวลา 120 ชั่วโมง และอาหารที่ใช้ propionate มีเวลาที่อยู่ในช่วง late log phases ที่เวลา 312 ชั่วโมง ส่วนใน corn steep liquor และ molasses ยังไม่ปรากฏช่วง late log phases เมื่อพิจารณาค่า OD₆₆₀ และ cell dry-weight ในช่วง late log phase ของอาหารแต่ละชนิด พบว่าอาหารที่มีการใช้ succinate มีค่า OD₆₆₀ และ cell dry-weight สูงที่สุดเท่ากับ 7.47 ± 0.23 และ 1.8 ± 0.1 mg/mL ในชั่วโมงที่ 120 และมีค่า OD₆₆₀ และ cell dry-weight ที่น้อยที่สุดในอาหารที่มีการใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน



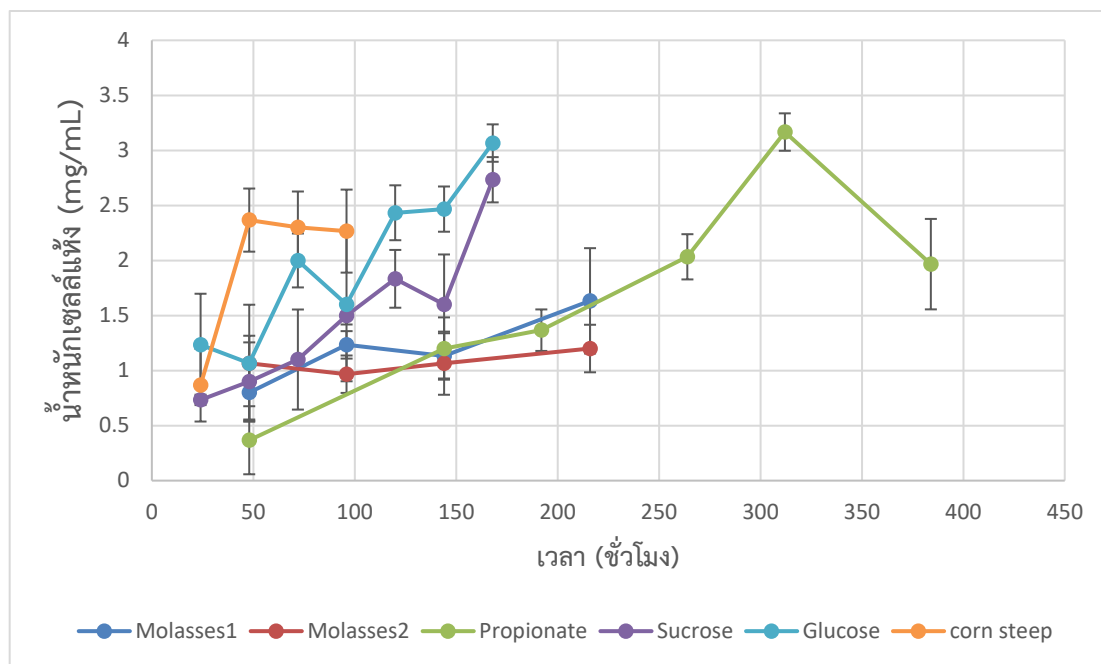
รูปที่ 4.4 : การเจริญของ *R. palustris* AS85 เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน malate , acetate , succinate และ fumarate



รูปที่ 4.5 : การเจริญของ *R. palustris* AS85 เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน propionate , molasses , sucrose , glucose และ corn steep liquor



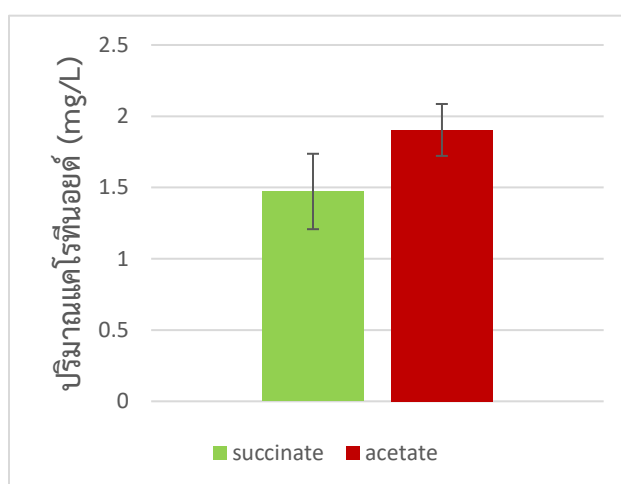
รูปที่ 4.6 : น้ำหนักของเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน malate , acetate , succinate และ fumarate



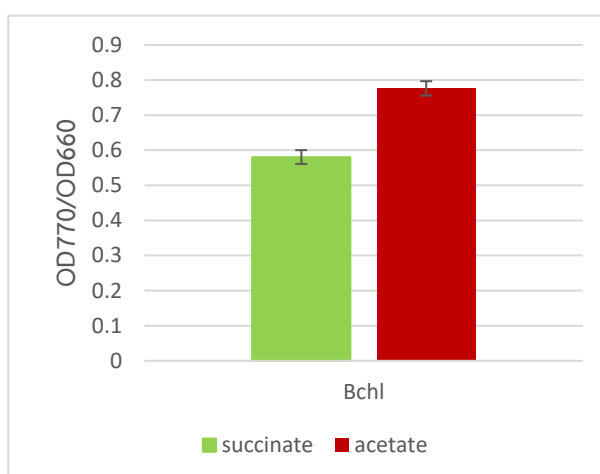
รูปที่ 4.7 : น้ำหนักของเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน propionate , molasses , sucrose , glucose และ corn steep liquor

ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตรงควัตถุของ *R. palustris* AS85

จากผลการทดลองการวัด Growth curve ทำให้ทราบว่า *R. palustris* AS85 จะเข้าสู่ช่วง late log phase ในอาหารที่ใช้ acetate และ succinate ที่เวลา 108 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับเมื่อนำตัวอย่างของ *R. palustris* AS85 ในช่วงเวลาดังกล่าวของอาหารแต่ละชนิดมาสกัดรงควัตถุ พบว่าในอาหารที่ใช้ acetate มีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 1.904 ± 0.182 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณแบคทีอริโอคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่อเซลล์เท่ากับ 0.776 ± 0.020 และอาหารที่ใช้ succinate ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 1.472 ± 0.264 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณแบคทีอริโอคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่อเซลล์เท่ากับ 0.580 ± 0.019 ซึ่งเมื่อเทียบกันแล้วพบว่า อาหารที่ใช้ acetate ส่งผลให้มีการผลิตแคโรทีนอยด์และแบคทีอริโอคลอโรฟิลล์มากกว่าอาหารที่ใช้ succinate



รูปที่ 4.8 : กราฟปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของ *R. palustris* AS85 ในอาหารเหลวของแหล่งคาร์บอน acetate และ succinate



รูปที่ 4.9 : กราฟปริมาณแบคทีอริโอคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่อเซลล์ (OD₇₇₀/OD₆₆₀) ของ *R. palustris* AS85 ในอาหารเหลวของแหล่งคาร์บอน acetate และ succinate

เนื่องจากสถานการณ์ COVID-19 การทดลองไม่ยังครบถ้วนสมบูรณ์ ดังนั้นสิ่งที่ผู้วิจัยจะทำต่อไปมีดังนี้

1. วัดการเจริญของอาหารอีก 2 ชนิด ได้แก่ corn steep liquor และ molasses จนถึงช่วง late log phase ในการเจริญของเชื้อ
2. สกัดรงควัตถุในช่วง late log phase ของอาหาร 8 ชนิด ได้แก่ malate , fumarate , propionate , sucrose , glucose , corn steep liquor และ molasses

ผลการทดลอง ในด้านการเจริญของเชื้อ คาดว่าจากแหล่งคาร์บอนที่เหลือ 2 ชนิด (corn steep liquor และ molasses) อาจไม่ส่งเสริมการเจริญได้ดีเทียบเท่า แหล่งคาร์บอนอีก 6 ชนิดที่เหลือ (succinate , acetate , malate , fumarate , propionate , sucrose และ glucose) เนื่องจาก corn steep liquor , และ molasses เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนซึ่งยากแก่การนำไปใช้ในการเจริญของแบคทีเรีย เมื่ออ้างอิงจากผลการเจริญในเบื้องต้นของ corn steep liquor เอง ก็สังเกตได้ว่าการเจริญที่น้อยมากใน 96 ชั่วโมงแรก เช่นเดียวกับผลของปริมาณรงควัตถุ คาดว่า succinate , acetate , malate , fumarate และ propionate อาจส่งผลให้มีผลิตรงควัตถุในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นกรดไขมันสายสั้น และยังเป็นสารมัธยันตรใน TCA cycle ที่เป็นวัฏจักรในการสร้างพลังงานของเซลล์ ทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้ รองลงมาเป็น sucrose และ glucose ที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนขึ้น และสุดท้ายคือ corn steep liquor และ molasses ที่มีความซับซ้อนของโครงสร้างทางเคมีมากที่สุด

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 การเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยาของ *R. palustris* AS85

จากผลการเลี้ยง *R. palustris* AS85 เพื่อศึกษาการเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยาในภาวะ chemoheterotroph และ photoheterotroph ทั้งในอาหารแข็ง NA และในอาหารเหลว RCVB พบว่า เมื่อ *R. palustris* AS85 เจริญในภาวะ chemoheterotroph ในอาหารเหลว จะไม่มีการผลิตรงควัตถุ สังเกตจากอาหารที่มีลักษณะขุ่นเป็นสีเหลืองอ่อน ในขณะที่ในอาหารแข็งเชื้อยังมีการผลิตรงควัตถุอยู่เล็กน้อย ทำให้เห็นเป็นสีชมพูอ่อนของโคโลนี ในขณะที่การเจริญในภาวะ photoheterotroph ของ *R. palustris* AS85 พบว่า มีการผลิตรงควัตถุสีแดงเข้ม ในอาหารเหลว โดยจะเริ่มเห็นได้ชัดในวันที่ 3 เป็นต้นไป ในทำนองเดียวกัน ในอาหารแข็งโคโลนีของเชื้อมีสีแดงเข้มที่แตกต่างจากโคโลนีในการเลี้ยงแบบ chemoheterotroph อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่กล่าวไว้ว่า กระบวนการสร้างรงควัตถุของ PNSB นั้นจะถูกกดการแสดงออกเมื่อมีออกซิเจน (Cohen-Bazire และคณะ, 1957) ทั้งนี้ ในกรณีของ *R. palustris* AS85 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งในภาวะ chemoheterotroph แต่สังเกตว่ายังมีการผลิตรงควัตถุในปริมาณน้อยอยู่นั้น อาจเป็นเพราะปริมาณของออกซิเจนในเพลตอาจไม่มากพอที่จะยับยั้งกระบวนการสร้างรงควัตถุทั้งหมดเหมือนกับการเลี้ยงและเขย่าในอาหารเหลว หรืออาจเป็นเพราะต้นเชื้อจากคลังจุลินทรีย์ที่มีการเก็บเชื้อจากการเลี้ยงในภาวะ photoheterotroph ทำให้ยังมีรงควัตถุหลงเหลืออยู่ภายใน ทำให้เป็นเป็นลักษณะโคโลนีสีชมพูอ่อนดังกล่าว

5.2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของ *R. palustris* AS85

เมื่อเลี้ยง *R. palustris* AS85 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 9 ชนิด คือ acetate , succinate, malate , fumarate , propionate , sucrose , glucose , corn steep liquor และ molasses และวัดการเจริญ พบว่า ในอาหารที่ใช้ succinate ส่งผลให้มีการเจริญของเชื้อมากที่สุด โดยมีค่า OD₆₆₀ และ cell dry-weight สูงที่สุดซึ่งเท่ากับ 7.47±0.23 และ 1.8±0.1 mg/mL รองลงมาคือ fumarate , malate และ acetate ตามลำดับ มีการเจริญสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ยกเว้น acetate ที่มีการเจริญสูงที่สุดในเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 108 ชั่วโมง ดังในรูปที่ 4.4 จึงสามารถสรุปได้ว่า แม้ acetate จะทำให้เชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง late log phase ได้เร็ว แต่เมื่อเทียบในด้านของปริมาณของ cell dry-weight แล้ว การเลือกใช้ succinate , fumarate และ malate จะเป็นทางเลือกที่ดีกว่าสำหรับการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของ *R. palustris* AS85 ในการทดลองของ Govindaraju และคณะ ในปี 2019 มีการใช้ *Rhodospseudomonas palustris* Nx (CGA4005) พบว่า succinate ทำให้มีการเจริญของเชื้อมากกว่า acetate เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่ใช้ propionate มีช่วงเวลาในช่วง late log phase ได้ช้ามากๆ ในการศึกษาของ Hädicke และคณะ ในปี 2011 พบว่า เมื่อใช้การ

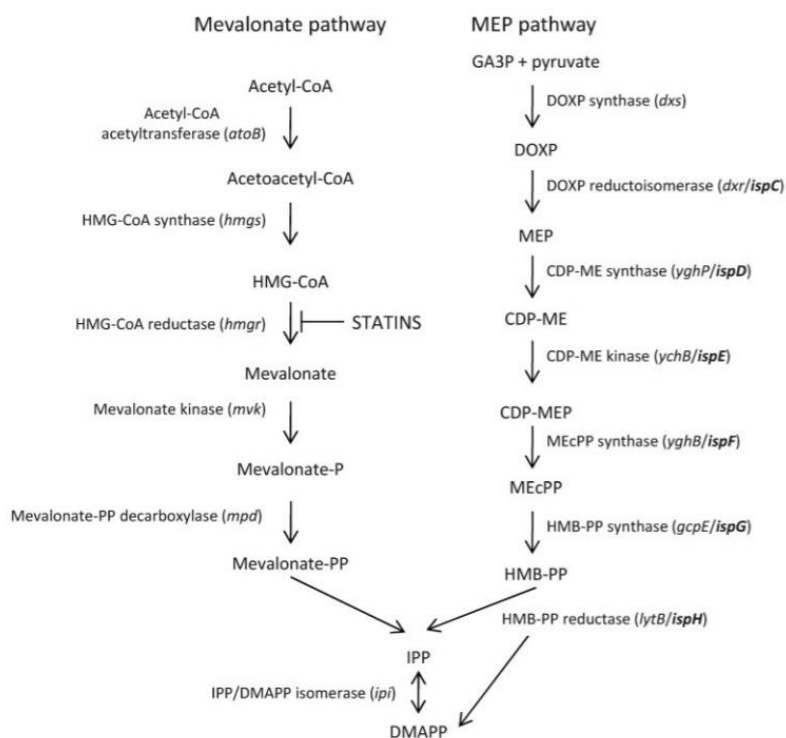
ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นอินดิเคเตอร์ในการวัดการเจริญ เปรียบเทียบระหว่างการใช้ malate และ propionate เป็นแหล่งคาร์บอน malate ทำให้มีการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่า propionate ซึ่งยังพบอีกว่าการใช้ propionate เป็นแหล่งคาร์บอนจำเป็นต้องมี bicarbonate อยู่ในอาหารด้วยเพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อ อาหารที่ใช้ glucose และ sucrose มีกราฟการเจริญที่ใกล้เคียงกันจึงสรุปว่า *R. palustris* AS85 มีความสามารถในการใช้ glucose และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้มากพอๆกัน sucrose เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วย glucose 1 โมเลกุล และ fructose 1 โมเลกุล ด้วยองค์ประกอบทางเคมีของ glucose และ sucrose ที่มีส่วนที่คล้ายคลึงกัน จึงส่งผลให้มีรูปแบบการเจริญที่ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับกับใน molasses เนื่องจาก molasses ที่ใช้มาจากสองแหล่ง จึงทำให้กราฟการเจริญของ *R. palustris* AS85 ที่แม้จะมีรูปแบบการเจริญที่ต่างกันแต่ก็มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังในรูปที่ 4.5 เนื่องมาจาก องค์ประกอบใน molasses ที่แตกต่างกัน ดังที่ทราบกันว่า molasses นั้นเป็นของเหลือจากกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทราย วัตถุดิบที่นำมาทำส่วนใหญ่เป็นอ้อยหรือหัวบีทน้ำตาลซึ่งเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติโดยตรง ทำให้มีคุณภาพรวมถึงองค์ประกอบของวัตถุดิบควบคุมไม่ได้โดยสมบูรณ์ จึงส่งผลถึงผลิตภัณฑ์ซึ่งในที่นี้คือ molasses นั้นมีคุณภาพและองค์ประกอบที่ไม่เหมือนกันในแต่ละครั้งของการผลิตด้วย

ในอาหารที่ใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งคาร์บอน เบื้องต้นพบว่ามีการเจริญของเชื้อที่น้อยมากเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของ corn steep liquor พบว่าองค์ประกอบกว่า 50% นั้นเป็นแหล่งของไนโตรเจนและมี lactic acid (ประมาณ 13%) เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณมากที่สุด จากข้อมูลของ Govindaraju และคณะ ในปี 2019 ที่กล่าวว่า PNSB ไม่สามารถใช้ lactate เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวเพื่อการเจริญ ประกอบกับในการศึกษาก่อนพบว่า เมื่อมีการให้ lactate เพียงอย่างเดียวเชื้อจะมีการเจริญของ *Rhodospseudomonas palustris* Nx (CGA4005) ในภาวะ photoheterotroph ที่น้อยมากเมื่อเทียบกับอาหารที่มีการใส่ lactate ร่วมกับ succinate และ lactate ร่วมกับ acetate

5.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตตรงควัตถุของ *R. palustris* AS85

เนื่องจากสถานการณ์การระบาดของ COVID-19 ทำให้สามารถทำการทดลองวิเคราะห์แคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอฟิลล์ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี acetate และ succinate เท่านั้น จากผลการทดลองการสกัดตรงควัตถุและนำมาคำนวณหาปริมาณของแคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอฟิลล์ของอาหารที่ใช้ acetate และ succinate พบว่า อาหารที่ใช้ acetate มีปริมาณแคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอฟิลล์สูงกว่าอาหารที่ใช้ succinate ในเบื้องต้นจึงสรุปได้ว่า acetate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอฟิลล์มากกว่าการใช้ succinate เป็นแหล่งของคาร์บอน แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้ mevalonate pathway (MEP) (ดังรูปที่ 5.1) เป็นกระบวนการในการสังเคราะห์ isoprenoid ที่เป็นโมโนเมอร์ของแคโรทีนอยด์ (Krishnaswamy และคณะ, 2020) ซึ่งสารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์ คือ Acetyl-CoA (Markus และ

คณะ, 2000) ดังนั้นจึงอาจเป็นเหตุผลที่ acetate ส่งเสริมการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีกว่า succinate แคโรทีนอยด์ที่มีหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยรักษาความเสถียรของระบบแสง (Shuang, 2015) อาจช่วยส่งเสริมการสะสมของแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์



รูปที่ 5.1 : MEP pathway

(https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/158/6/1389_mic051599.pdf?expires=1621262710&id=id&accname=guest&checksum=DF228951B812562017717425C4A94853)

เมื่อเทียบปริมาณของแคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ในเชื้อที่เลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน พบว่าแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์มีปริมาณน้อยกว่าแคโรทีนอยด์ อาจเป็นเพราะช่วงแสงที่ลอดไส้ที่ใช้ในการบ่มเชื้อ มีการปล่อยช่วงแสงที่มีความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร (Maclsaac และคณะ, 1999) ซึ่งมีช่วงคลื่นที่แคโรทีนอยด์ดูดซับได้มาก (400-550 นาโนเมตร) ในขณะที่แบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์จะดูดซับแสงได้ดีในช่วงคลื่น 715-1050 นาโนเมตร (Zhou และคณะ, 2015) จึงส่งผลให้มีการสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์มากกว่าแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์

การทดลองที่ผู้วิจัยจะทำต่อไป มีดังนี้

1. หาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆเพื่อนำมาเลี้ยงวัดการเจริญ การสร้างแคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ โดยเน้นที่น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม
2. แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เพื่อความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *R. palustris* AS85 โดยเลือกใช้แหล่งคาร์บอนชนิดที่ส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุด 3 ชนิด มาทำการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย PNSB *Rhodospseudomonas palustris* AS85 ในการเจริญแบบ photoheterotroph โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 9 ชนิด ได้แก่ succinate , acetate , malate , fumarate , propionate , sucrose , glucose , corn steep liquor และ molasses พบว่า อาหารที่ใช้ succinate เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเจริญของเชื้อที่ดีที่สุด โดยมีค่า OD₆₆₀ และ cell dry-weight สูงที่สุดเท่ากับ 7.47 ± 0.23 และ 1.8 ± 0.1 mg/mL ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเทียบปริมาณของแคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ของอาหารที่ใช้ succinate และ acetate พบว่าเชื้อที่ใช้อาหารที่มี acetate เป็นแหล่งของคาร์บอนมีปริมาณแคโรทีนอยด์และแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์มากกว่าโดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 1.904 ± 0.182 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า succinate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ และ acetate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของ *Rhodospseudomonas palustris* AS85

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ชื่นสุมน บุญเจริญ, 2559. แบทที่เรียว่วงแดงสังเคราะห์แสงที่ไม่สะสมก้ำมะถันจากแอกทีเวเทดสลัดจ์เพื่อการย่อยสลายดีเซล วิทยานิพนธ์. ภาคจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นงลักษณ์ สำราญราษฎร์, 2561. ผลของแคโรทีนอยด์สังเคราะห์ต่อการเพิ่มสีในปลาการ์ตูนแดง (*Premnas biaculeatus* Bloch, 1790) วิทยานิพนธ์.สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ภาษาอังกฤษ

- Addo, E.K., Gorusupudi, A., Allman, S., Bernstein, P.S. (2021). The lutein and zeaxanthin in pregnancy (L-ZIP) study-carotenoid supplementation during pregnancy: ocular and systemic effects-study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, 22;22(1):300.
- Amoozegar, M.A., Babavalian, H., Rezaeeyan, Z., Safarpour, A., Shakeri, F., Tebyanian, H. (2017). High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. Strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. **Experimental and Clinical Sciences**, 16, 840-851.
- Alloul, A., Wille, M., Lucenti, P., Bossier, P., Stappen, G.V., Vlaeminck, S.E. (2021). Purple bacteria as added-value protein ingredient in shrimp feed: *Penaeus vannamei* growth performance, and tolerance against *Vibrio* and ammonia stress. **Aquaculture**, 530.
- Bryant, D.A., Canniffe, D.P., Golbeck, J.H., Hunter, C.N., Ortega-Ramos, M., Radle, M.I. (2018) Engineered biosynthesis of bacteriochlorophyll g_F in *Rhodobacter sphaeroides*. **Biochimica et Biophysica acta**, 1859, 501-509.
- Brotosudarmob, T.H.P., Huia, C.J., Prihastyantib, M.N.U. (2015) Preliminary evaluation of the pigments content from *Rhodobacter sphaeroides* at stages during photosynthetic growth. **Procedia Chemistry**, 14, 101 – 107.
- Buzzini, P., Martini, A. (2000). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresource Technology**, 71(1), 41-44.
- Cao, K., Zhi, R., Zhang, G. (2020). Photosynthetic bacteria wastewater treatment with the production of valueadded products: A review. **Bioresource Technology**, 299, 122648.
- Carlozzi, P., Touloupakis, E. (2021). Bioplastic production by feeding the marine *Rhodovulum sulfidophilum* DSM-1374 with four different carbon sources under batch, fed-batch and semi-continuous growth regimes. **New Biotechnology**, 62, 10-17.
- Chumpol, S., Kantachote, D., Nitoda, T., Kanzaki, H. (2018). Administration of purple nonsulfur bacterial as single cell protein by mixing with shrimp feed to enhance growth, immune response and survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation. **Aquaculture**, 489, 85-95.
- Cohen-Bazire. G., Sistrom. W., Stanier, R. (1957). Kinetic studies of pigment synthesis by non-

- sulfur purple bacteria. **J Cell Comp Physiol**, 49: 25–68.
- Eggersdorfer, M., Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. **Arch Biochem Biophys**, 15;652:18-26.
- Govindaraju, A., McKinlay, J.B., LaSarre, B. (2019). Phototrophic lactate utilization by *Rhodopseudomonas palustris* is stimulated by cocultivation with additional substrates. **Appl Environ Microbiol**, 16;85(11):e00048-19.
- Han, H., Liu, B., Yang, H., Shen, J. (2012). Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. **International Journal of Hydrogen Energy**, 37(17), 12167-12174.
- Hädicke, O., Grammel, H., Klamt, S. (2011). Metabolic network modeling of redox balancing and biohydrogen production in purple nonsulfur bacteria. **BMC Systems Biology**, 5:150.
- Hermoni, K., Paran, E., Wolak, T. (2016). Chapter 34 - Carotenoid supplements and consumption: implications for healthy aging. **The Molecular Nutrition Series**, 473-489.
- Idi, A., Hanif, M., Firdaus, M., Wahab, A., Ibrahim, Z. (2015). Photosynthetic bacteria: an eco-friendly and cheap tool for bioremediation. **Environmental Science and Bio/Technology**, 14, 271–285.
- Jung, D.O., Madigan, M.T. (2008) An overview of purple bacteria: systematics, physiology, and habitats. **The Purple Phototrophic Bacteria**, 1-15.
- Kang, Z., Nie, X., Liu, X., Zhang, L., Zhao, Y., Wang, J., Tang, Y., Zhao, Z. (2016). Enhancement of Carotenoids production from *Rhodobacter sphaeroides* by nitrosoguanidine mutagenesis. **Food Science and Technology**, 12(8): 457-461.
- Krishnaswamy, V.K.D., Alugoju, P., Periyasamy, L. (2020). Chapter 10 - physiological effects of carotenoids on hyperglycemia and associated events. **Natural Products Chemistry**, 64, 303-320.
- KumarRana, H., KumarSingh, A., Pandey, A. (2020). Chapter 19 - analysis of chlorophylls. **Recent Advances in Natural Products Analysis**, 635-650.
- Lai, Y.C., Liang, C.M., Hsu, S.C., Hsieh, P.H., Hung, C.H. (2017). Polyphosphate metabolism by purple non-sulfur bacteria and its possible application on photo-microbial fuel cell. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 123(6), 722-730.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of

- two ancient and distinct pathways across genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97(24): 13172–13177.
- Liu, S., Zhang, G., Zhang, L., Li, X., Li, J. (2016). Performance, carotenoids yield and microbial population dynamics in a photobioreactor system treating acidic wastewater: Effect of hydraulic retention time (HRT) and organic loading rate (OLR). **Bioresource Technology**, 200:245–252.
- Lu, H., Zhang, G., Zheng, Z., Meng, F., Du, T., He, S. (2019). Bio-conversion of photosynthetic bacteria from non-toxic wastewater to realize wastewater treatment and bioresource recovery. **Bioresource Technology**, 278, 383–399.
- MacIsaac, D., Kanner, G., Anderson, G. (1999). Basic Physics of the Incandescent Lamp (Lightbulb). **The Physics Teacher**, 37.
- Madukasi, E.I., Chunhua, H., Zhang, G. (2011). Isolation and application of a wild strain photosynthetic bacterium to environmental waste management. **Int J Environ Sci Technol**, 8(3):513–522.
- Nagadomi, H., Kitamura, T., Watanabe, M., Sasaki, K. (2000). Simultaneous removal of chemical oxygen demand (COD), phosphate, nitrate and H₂S in the synthetic sewage wastewater using porous ceramic immobilised photosynthetic bacteria. **Biotechnol Lett**, 22(17):1369–1374.
- Pandey, A., Srivastava, N., Sinha, P. (2012). Optimization of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* NMBL-01. **Biomass and Bioenergy**, 37, 251-256.
- Policastro, G., Luongo, V., Fabbicino, M. (2020). Biohydrogen and poly- β -hydroxybutyrate production by winery wastewater photofermentation: Effect of substrate concentration and nitrogen source. **Journal of Environmental**, 271, 111006.
- Pollich, M., Klug, G. (1995). Identification and sequence analysis of genes involved in late steps of cobalamin (vitamin B12) synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, 177(15), 4481-4487.
- Qi, X., Ren, Y., Liang, p., Wang, X. (2018). New insights in photosynthetic microbial fuel cell using anoxygenic phototrophic bacteria. **Bioresource Technology**, 258, 310–317.
- Saejung, C., Ampornpat, W. (2019). Production and nutritional performance of carotenoid-producing photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas faecalis* PA2 Grown in

- domestic wastewater intended for animal feed production. **Waste Biomass Valor**, 10:299–310.
- Sakarika, M., Spanoghe, J., Sui, Y., Wambacq, E., Grunert, O., Haesaert, G., Spiller, M., Nlaemnick, S.E. (2020). Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. **Microbial Biotechnology**, 1-13.
- Saleem, H., Ul Ain Kokab, Q., Rehman, Y. (2019). Arsenic respiration and detoxification by purple non-sulphur bacteria under anaerobic conditions. **Comptes Rendus Biologies**, 342(3-4), 101-107.
- Talaiekhosani, A., Rezaia, S. (2017). Application of photosynthetic bacteria for removal of heavy metals, macropollutants and dye from wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, 19, 312-321.
- Tanno, S., Fukui, N., Utaka, Y., Ohkawa, S., Morita, S., Boonmar, S. (2016). Quantitative method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* using bio-Theta DOXTM system. *Thai journal Veterinary Medicine*, 46(2): 319-324.
- Tao, Y., He, Y., Wu, Y., Liu, F., Li, X., Zong, W. and Zhou, Z. (2008) Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**. 33: 963-973.
- Thiel, V., Tank, M., Bryant, D.A. (2018). Diversity of chlorophototrophic bacteria revealed in the omics era. **Annual Review of Plant Biology**, 69, 21-49.
- Thweatt, J.L., Canniffe, D.P., Bryant, D.A. (2019). Chapter two - biosynthesis of chlorophylls and bacteriochlorophylls in green bacteria. **Advances in Botanical Research**, 90, 35-89
- Wang, H., Yang, A., Zhang, G., Ma, B., Meng, F., Peng, M., Wang, H. (2017). Enhancement of carotenoid and bacteriochlorophyll by high salinity stress in photosynthetic bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 121, 91-96.
- Xu, Z. (2007). Chapter 21 - biological production of hydrogen from renewable resources. **New Technologies and Applications**, 527-557.
- Zhi, R., Yang, A., Zhang, G., Zhu, Y., Meng, F., Li, X. (2019). Effects of light-dark cycles on photosynthetic bacteria wastewater treatment and valuable substances production. **Bioresource Technology**, 274, 496-501.
- Zhou, Q., Zhang, P., Zhang, G. (2015). Biomass and carotenoid production in photosynthetic

bacteria wastewater treatment: effects of light source. **Bioresource Technology**, 179, 505-509

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลว RCVB (Tao และคณะ, 2008)

องค์ประกอบต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตร

- **ส่วนที่ 1 : สารอาหารหลัก**

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.20 กรัม
ไดโบตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.75 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.85 กรัม
กรดมาลิก	8.00 กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	1.00 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.00 กรัม
- **ส่วนที่ 2 : Trace element**

กรดบอริก (H_3BO_3)	2.80 มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	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
กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก (EDTA)	2.00 มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	11.8 มิลลิกรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.75 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 N ก่อนทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 12 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB)

น้ำตาลกลูโคส (D-glucose)	1.0	กรัม
เปปโทน (peptone)	15.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	6.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.5 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 N ก่อนทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 12 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็ง Nutrient agar (NA)

เปปโทน (peptone)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 N ก่อนทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 12 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 N

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2. สารไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 N

ตวงกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 12 N ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ทำในตู้ดูดควัน)

3. เอทานอลเข้มข้น 70 %

ละลายเอทานอลความเข้มข้น 99 % ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดปะจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร