สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจาก น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งน้ำธรรมชาติ

นางสาวธัญญรีย์ สมองดี
นางสาวอรธินี พยัคฆมะญาติ
นายสุรเชษฐ์ วิรุฬห์ทรัพย์

วพ.
ธ1689ก
2550

b.11974679
i.

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83988
วัน,เดือน,ปี.....23 ก.ย. 2551

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Selection of Photosynthetic Bacteria from Manufacturing Waste and Natural pond

Miss Thanyuree Samongdee

Miss Onthinee Payakkayart

Mr. Surachet Virunsap

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งน้ำธรรมชาติ		
นักศึกษา	นางสาวธัญญรีย์	สมองดี	รหัสนักศึกษา 47050130
	นางสาวอรธินี	พยัคฆะญาติ	รหัสนักศึกษา 47050174
	นายสุรเชษฐ์	วิรุฬห์ทรัพย์	รหัสนักศึกษา 47050697
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์		

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ	ผศ.ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์	
กรรมการ	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งน้ำธรรมชาติ		
นักศึกษา	นางสาวธัญญรีย์	สมองดี	รหัสนักศึกษา 47050130
	นางสาวอรธินี	พยัคฆะญาติ	รหัสนักศึกษา 47050174
	นายสุรเชษฐ์	วิรุฬห์ทรัพย์	รหัสนักศึกษา 47050697
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์		

บทคัดย่อ

ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และแหล่งน้ำธรรมชาติ นำมาใช้ในการคัดแยกจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ตัวอย่างที่ได้นำมาบ่มในสภาวะให้แสง และไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30-35°ซ เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำที่เปลี่ยนเป็นสีแดง หรือน้ำตาลแดง มาคัดแยกเชื้อในอาหาร Ormerod's โดยใช้กรดอะซิติก และเปปโตน ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ ผลการคัดแยกได้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง 7 ไอโซเลต จึงนำมาศึกษาลักษณะต่างๆ พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม-รูปไข่ ขนาด 1.0-2.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ โคโลนีสีแดงส้ม-สีแดงน้ำตาล ขอบโคโลนีเป็นวง หรือหยัก แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถเจริญในอาหารที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ทดแทนธาตุอาหารปริมาณน้อย กรดอะมิโน และโปรตีนต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร Ormerod's ไอโซเลตหมายเลข 2 ให้การเจริญในอาหาร Modified medium ได้ดีที่สุด (4.82 OD_{660} นาโนเมตร) จึงนำมาทดสอบการเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส หรือกรดอะซิติก และเปปโตน หรือโมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ การเจริญในกลูโคสความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างเซลล์สูงสุด เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่การเจริญในกรดอะซิติกความเข้มข้น 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่าความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลได้เซลล์มากกว่าการใช้กรดอะซิติก ในกรณีของการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าความเข้มข้นที่ลดลง (0.5 เปอร์เซ็นต์) มีผลให้การเจริญลดลงด้วยเช่นกัน การใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของสารประกอบพอลิเมอร์ ได้แก่ คาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้า พบว่าการเจริญในคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส มีค่าสูงกว่าแป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้า แต่ว่าการเจริญในแป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้า พบการสร้างฟองก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Seminar Report Title	**Selection of Photosynthetic Bacteria from Manufacturing Waste and Natural pond**		
Student	Miss Thanyuree	Samongdee	Student ID 47050130
	Miss Onthinee	Payakkayart	Student ID 47050174
	Mr. Surachet	Virunsap	Student ID 47050697
Program	Biotechnology		
Department	Applied Biology		
Academic Year	2007		
Seminar Advisor	Asst. Prof. Dr. Somchai Krairak		

ABSTRACT

The selection and isolation of photosynthetic bacteria from manufacturing waste and natural pond were accomplished. The water samples from both sorts were enriched by incubation under light and anaerobic condition at 30-35°C for 7-10 days. After that, the enriched sample, which then became red color, were selected and isolated with Ormerod's medium using 1.0% acetic acid and 1.0% peptone as carbon and nitrogen sources, respectively. The resulted showed that 7 isolates were found and studied for the characteristics. All 7 isolates were cocci to oval shape with 1.0-2.0 μm and Gram-negative. The colony color was bright red to brown-red, circular shape with entire to undulate rim. All 7 isolates could be cultivated by using 0.5% yeast extract instead of trace element, amino acids and proteins that composed in Ormerod's medium. The cultivation of 7 isolates was testified in Modified medium composed of acetic acid or glucose and peptone or monosodium glutamate (as carbon and nitrogen source, respectively) with 0.5% yeast extract. It was found that isolate No. 2 presented the maximum growth (4.82 OD_{660} nm). The assimilation of 1.0% glucose gave the highest cell concentration in comparison to 3.0% and 5.0% glucose, respectively. 1.0% and 3.0% acetic acid showed same cell concentration but higher than 5.0% acetic acid. However, cultivation using glucose as carbon source observed the higher cell yield than the acetic acid usage. In case of nitrogen source, the monosodium glutamate, the lower concentration (0.5%) presented the smaller cell yield of isolate No. 2. The assimilation of polysaccharides, CMC cassava starch and rice starch were examined. The CMC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gave the maximal cell yield than the cassava starch and rice starch, respectively. However, bubble of gaseous was observed by cultivation of isolated No. 2 in cassava starch and rice starch.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ เป็นอย่างสูง ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษา โครงงานพิเศษนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ ผศ.ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่คอยกรุณาให้ความรู้และคำแนะนำในการปฏิบัติงานโครงงานพิเศษนี้ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณอนิทัต ทองจันทร์ และคุณพงศักดิ์ ประสานศักดิ์ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านอุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับใช้ในโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง ตลอดจนเพื่อนๆทุกคนที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุนและเป็นกำลังใจในโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	4
2.2 ลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	5
2.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	6
2.4 การนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันไปใช้เพื่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม	9
2.5 การใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	20
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	20
3.2 สารเคมี	20
3.3 อุปกรณ์	20
3.4 วิธีการทดลอง	21
3.4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	21
3.4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	21
3.4.3 ศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบสารอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.4 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่คัดแยกได้	23
3.4.5 ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	23
3.4.6 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในอาหารเหลวที่มีพอลิแซคคาร์ไรด์ (Polysaccharide) เป็นแหล่งคาร์บอน	24
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	26
4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	26
4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	27
4.3 ศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบสารอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	31
4.4 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่คัดแยกได้	34
4.5 ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง	36
4.6 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในอาหารเหลวที่มีพอลิแซคคาร์ไรด์ (Polysaccharide) เป็นแหล่งคาร์บอน	42
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	45
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก ก	50
ภาคผนวก ข	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 Classification of photosynthetic bacteria in family genus and species	6
2.2 The compositions of essential amino acids and vitamin from photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas capsulatus*	10
2.3 The effect of photosynthetic bacteria as a nutrition supplement on the survival rate of small fancy carp	11
2.4 Rice production in agriculture field with and without photosynthetic bacteria	13
3.1 The medium composition for photosynthetic bacteria isolation and cultivation	23
3.2 The effect of carbon sources and concentration on the cultivation of photosynthetic bacteria	24
3.3 The effect of various sorts of polysaccharide on the cultivation of photosynthetic bacteria with polysaccharide as carbon source	25
4.1 The characteristics of selected isolate of photosynthetic bacteria	27
4.2 The typical colony of photosynthetic bacteria on various Modified medium formula	31
4.3 Summary of photosynthetic bacteria growth on various Modified medium formula	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	The role of photosynthetic bacteria in natural resource	4
2.2	*Chlorobium* sp.	5
2.3	The family Chlorobiaceae of photosynthetic bacteria	7
2.4	A. The family Chromatiaceae of photosynthetic bacteria B. The family Rhodospirillaceae of photosynthetic bacteria	8
2.5	Structure of ubiquinone (UQ10)	14
3.1	The enrichment of photosynthetic bacteria in water sample by incubation under light condition at 30-35°C	21
3.2	The isolation and selection of photosynthetic bacteria by incubation under light and anaerobic condition	22
4.1	The fresh sample water (A) was incubated under light condition at 30-35°C for 7-10 days (B)	26
4.2	The time-course of 7 selected isolates photosynthetic bacteria in Modified medium that incubated under light and anaerobic condition.	35
4.3	The fermentation time-course of Isolate-2 photosynthetic bacteria in Modified medium with monosodium glutamate 1% and various glucose concentration (1.0 3.0 and 5.0%), respectively	37
4.4	The fermentation time-course of Isolate-2 photosynthetic bacteria in Modified medium with monosodium glutamate 1% and various acetic acid concentration (1.0 3.0 and 5.0%), respectively	38
4.5	The fermentation time-course of Isolate-2 photosynthetic bacteria in Modified medium with monosodium glutamate 0.5% and various acetic acid concentration (1.0 3.0 and 5.0%), respectively	40
4.6	In Comparison to the maximum growth of Isolate-2 photosynthetic bacteria by cultivation in various Modified medium formula (carbon and nitrogen source) at 72 hr and 120 hr, respectively	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
4.7	The fermentation time-course of Isolate-2 photosynthetic bacteria in Modified medium with 1.0% monosodium glutamate and 1.0% of CMC, Cassava starch and Rice starch, respectively.	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ประเทศไทยมีอุตสาหกรรมการเกษตรหลายประเภท เช่น โรงงานน้ำตาล โรงงานแป้งมัน-สำปะหลัง โรงงานสับปะรด โรงงานปศุสัตว์ โรงงานเต้าหู้ เป็นต้น ซึ่งโรงงานเหล่านี้มีน้ำทิ้งปริมาณมากเกิดขึ้นในกระบวนการผลิต และเป็นสาเหตุของมลพิษทางน้ำหากไม่มีการบำบัดที่ถูกต้อง และเหมาะสมก่อนที่จะปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ

การบำบัดน้ำเสียโดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic bacteria; PSB) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถบำบัดน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ ได้ ด้วยความมหัศจรรย์ของแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ตรงกระบวนการที่อยู่ในเซลล์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแสงก็เกิดกระบวนการที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาพไร้อากาศ (phototrophic anaerobic condition) ถ้าสิ่งแวดล้อมไม่มีแสงก็เปลี่ยนมาใช้กระบวนการที่ใช้สารอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน ในสภาพมีอากาศ ไม่ใช้แสง (heterotrophic aerobic condition) สามารถย่อยสลายสารภายในสภาพที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจนได้ จึงสามารถนำไปบำบัดน้ำเสียจากการเกษตร น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร น้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน น้ำเสียจากอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น ผลิตเบียร์ ยาปฏิชีวนะ รวมถึงน้ำเสียจากอุตสาหกรรมทางเคมี และปิโตรเลียม เป็นต้น ดังนั้น การแก้ปัญหาทรัพยากรน้ำโดยเฉพาะปัญหาน้ำเสียจากบ้านเรือน ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ และโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ที่ถูกระบายลงสู่แม่น้ำลำคลองจะต้องพัฒนาวิธีการบำบัดน้ำเสียเหล่านั้นก่อนระบายสู่แม่น้ำลำคลอง ซึ่งระบบการบำบัดน้ำเสียด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นทางเลือกที่จะกำจัดความสกปรกของน้ำเหล่านั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากนี้ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศ แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ด้วย ซึ่งการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้สามารถลดมลพิษจากน้ำทิ้ง และได้พลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด (New clean energy) มาใช้ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ถ่านหิน น้ำมันดิบ และก๊าซธรรมชาติเป็นแหล่งเชื้อเพลิง ซึ่งปลดปล่อยก๊าซพิษชนิดต่างๆ ได้แก่ SO_2 NO_2 CO เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และโรงงานอุตสาหกรรม

2. เพื่อศึกษาการย่อยสลายกรดอะซิติก กลูโคส แป้ง และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส โดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่แยกได้

3. ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเบื้องต้น

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่มีอยู่ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมได้

2. ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

3. สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงได้

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.5.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และโรงงานอุตสาหกรรม โดยการเก็บต้องระวังไม่ให้มีก๊าซออกซิเจนอยู่ภายในขวด เพื่อป้องกันผลกระทบต่อเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจน แล้วปิดพาราฟินเหลวทับ

1.5.2 การเลี้ยงเชื้อและคัดแยกเชื้อ

1.5.2.1 นำตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งต่างๆมาคัดแยกเชื้อด้วยวิธีลากเชื้อ (streak plate) บนอาหารแข็ง Minimal medium of Ormerod's ที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคสหรือกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน

1.5.2.2 คว่ำจานเพาะเชื้อไว้ใน desiccators ภายใน desiccators ใส่กระดาษที่จุ่ม methylene blue แขวนไว้ด้านข้าง เพื่อตรวจสอบปริมาณก๊าซออกซิเจนใน desiccators ยังคงมีอยู่หรือไม่ จากนั้นทำการดูดก๊าซออกซิเจนออก แล้วเติมก๊าซไนโตรเจนเข้าไปแทนที่ โดยทำการเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก๊าซไนโตรเจนเข้าไปประมาณ 3 ครั้ง โดยตรวจดูที่กระดาษ methylene blue เปลี่ยนแปลงสีเป็นไม่มีสีหรือไม่

1.5.2.3 บ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วันในสภาพมีแสง ความเข้ม 1,000 ลักซ์ (lux) อุณหภูมิ 30-35 °ซ ตรวจดูโคโลนีที่ขึ้นเป็นสีแดง ชมพู หรือส้ม

1.5.2.4 นำโคโลนีที่ได้ไปทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

1.5.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของที่คัดแยกได้

1.5.3.1 สังเกตลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้นและสีของโคโลนี

1.5.3.2 นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่แยกได้ไปย้อมสีแกรม จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.5.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม

1.5.4.1 สภาวะการได้รับแสง 1,000 ลักซ์

1.5.4.2 อุณหภูมิ 30-35 °ซ

1.5.4.3 แหล่งคาร์บอน (สารอินทรีย์)

1.5.4.4 แหล่งไนโตรเจน (สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (The phototrophic bacteria) (สุรอรรถ, 2549)

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic bacteria; PSB) พบกระจายทั่วไปในธรรมชาติตามแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม ทะเลสาบน้ำเค็ม น้ำทะเลสาบที่มีความเป็นด่าง น้ำที่มีความเป็นกรด น้ำพุร้อน น้ำทะเลบริเวณขั้วโลกเหนือ นอกจากนี้ยังพบตามแหล่งน้ำเสีย บ่อบำบัดน้ำเสีย (Levett, 1990; Imhoff, 1992; Brock และคณะ, 1994) บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมีความสำคัญในกระบวนการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ (CO_2 - assimilation) และการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) และเป็นส่วนหนึ่งของห่วงโซ่อาหารในสัตว์ขนาดเล็ก ปลา กุ้ง หอย และปู ซึ่งสามารถนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมาใช้เป็นอาหารได้ นอกจากนี้ในน้ำเสียจากบ้านเรือน และน้ำเสียจากการทำปศุสัตว์สามารถบำบัดด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kobayashi, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

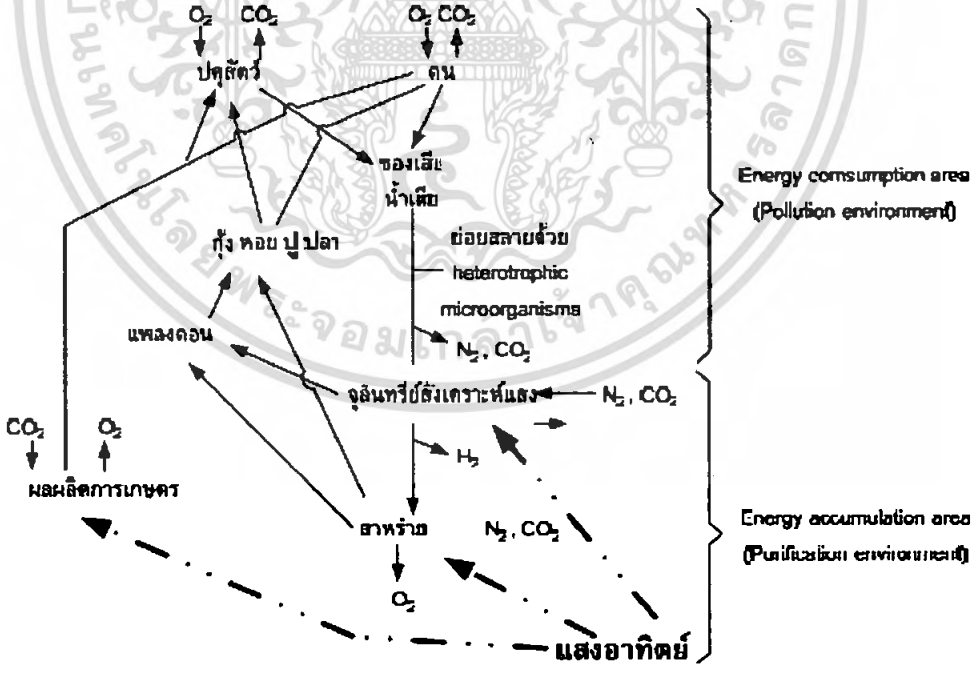


Figure 2.1 The role of photosynthetic bacteria in natural resource

ที่มา : Kobayachi (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (ดวงพร, 2530)

2.2.1 เซลล์มีรูปร่างทรงกลม แท่ง รูปไข่ หรือเป็นเกลียว เส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์อยู่ระหว่าง 0.3 – 6 ไมครอน ดังแสดงในรูป 2.2

2.2.2 การเพิ่มจำนวนส่วนใหญ่เป็นแบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง (binary fission) แต่มีบางชนิดใน Family Rhodospirillaceae แบ่งตัวโดยการแตกหน่อ

2.2.3 เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมลบ

2.2.4 เซลล์แขวนลอยมีสีม่วง แดงเข้ม แดง ส้มน้ำตาล หรือสีเขียว อาจมีการสะสมเม็ดซัลเฟอร์

2.2.5 มีรงควัตถุแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid)

2.2.6 การสังเคราะห์ด้วยแสงแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และพืชสีเขียว เพราะเกิดในสภาพไร้ออกซิเจน ไม่มีการสร้างออกซิเจนในการสังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจากไม่ได้ใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแต่ใช้ก๊าซไฮโดรเจน สารประกอบซัลเฟอร์ในสภาพรีดิวซ์ หรือสารอินทรีย์แทนการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) หรือ Reductive Pentose Phosphate cycle

2.2.7 มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ เนื่องจากมีไซโตโครม (cytochrome) ยูบิควิโนน (ubiquinone) และมีเฟอร์ริดอกซิน (ferredoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กแต่ไม่มีฮีม (non-heme internal membrane iron protein)

2.2.8 รงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสง (photopigment) อยู่ที่เยื่อภายในเซลล์ (internal membrane) อาจมีลักษณะเป็นถุง (vesicle) ในสกุล *Chlorobium*

2.2.9 G+G Content อยู่ระหว่าง 45-73 โมลเปอร์เซ็นต์

Figure 2.2 *Chlorobium* sp.

ที่มา : JGI (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง (Classification of anoxygenic photosynthetic bacteria)

โดยทั่วไปจะแบ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีเขียว (green photosynthetic bacteria) และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วง (purple photosynthetic bacteria) (Pfenning และ Truper, 1989; Kobayashi, 2000) ดังแสดงตามตารางที่ 2.1

Table 2.1 Classification of photosynthetic bacteria in family genus and species

Order	Family	Genus	Species
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	*Rhodospirillum*	*rubrum,tenue,fulvum,inolischianum*
			photonietricum
		Rhodopseudomonas	*palustris,viridls,acidophilia,*
			gelatinosa,capsulatus,sphaeroides
		Rhodomicrobium	*vannielii*
	Chromatiaceae	*Chromatium*	*okenii,weissel,warmingil, buderi,*
			minus,Violascens,vinosum,
			gracillsimum,minutissium
		Thiocystis	*violace , gelatrnosa*
		Thiosarcina	*rosea*
		Thiospirillum	*sanguineu , jenens, rosenbergil*
		Thiocapsa	*roseopersicin , pfennigil*
		Lamprocystis	*roseopersicina*
		Thiodictyon	*elegans, bacillosum*
		Thiopedia	*rosea*
		Amoebobacter	*roseus , pendens*
	Ectothiorhodospiraceae	*Ectothiorhofospira*	*mobilis, shaposhnikovil , halophila*
Chlorobiales	Chlorobiaceae	*Chlorbium*	*limicola,vlbrioforme,*
			phaeobacteroides , phaeovibrioides
		Prosthecochloris	*aestuaril*
		Choropseudomonas	*ethylica*
		Pelodictyon	*ciathratifornie , luteolum*
		Clathrochloris	*sulphurica*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Pfenning และ Truper (1989); Levett (1990); Imhoff (1992); Kobayashi (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีเขียว (green photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะอยู่ในวงศ์ Chlorobiaceae มีลักษณะเซลล์เป็นแบบเส้นสาย ไม่มีระบบอินตราไซโตพลาสมิกเมมเบรน (intracytoplasmic membrane system) มีโครงสร้างพิเศษได้แก่ คลอโรเบียม (chlorobium vesicle) หรือคลอโรโซมเวสซิเคิล (chlorosome) จะพบอยู่ภายในไซโตพลาสซึม หรือติดอยู่ที่ผิวของไซโตพลาสมิกเมมเบรน คลอโรโซมมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ซี ดี และ อี และมีโครงสร้างในการรับพลังงานแสง (light-harvesting) ศูนย์กลางของปฏิกิริยาของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบอยู่ในไซโตพลาสมิกเมมเบรนบริเวณที่อยู่ติดกับคลอโรโซม (Imhoff, 1992) และจะไม่สะสมกำมะถันไว้ภายในเซลล์ (รูปที่ 2.3)

A. Individual cell B. Filamentous form

Figure 2.3 The family Chlorobiaceae of photosynthetic bacteria

ที่มา : Imhoff (1992)

2.3.2 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วง (Purple Photosynthetic bacteria) ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.3.2.1 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มสะสมกำมะถัน(Purple Sulfur bacteria) ในวงศ์ Chromatiaceae (ชื่อเดิม Thiorhodaceae) (รูปที่ 2.4 A) พบว่า สามารถเจริญได้ดีในสภาพโฟโตออโตโทรป (photoautotroph) ซึ่งสามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์ ซัลไฟด์ และไทโอซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ (Van Niel, 1944 ; Imhoff, 1992) ดังแสดงในสมการ

$$CO_2 + 2H_2S \xrightarrow{\text{แสงสว่าง}} (CH_2O) + H_2O + 2S$$

$$S + CO_2 + 3H_2O \xrightarrow{\text{แสงสว่าง}} (CH_2O) + H_2SO_4 + H_2$$

$$2CO_2 + Na_2S_2O_3 + 3H_2O \xrightarrow{\text{แสงสว่าง}} 2(CH_2O) + Na_2SO_4 + H_2SO_4$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน(Purple Non-Sulfur bacteria) ในวงศ์ Rhodospirillaceae (รูปที่ 2.4 B) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่สามารถใช้ซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ และมีการสันดาป (metabolism) ดีกว่าแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงที่ใช้ซัลเฟอร์ เนื่องจากสามารถเจริญได้ทั้งแบบโฟโตเฮเทอโรโทรป และโฟโตออโตโทรป โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนต่อสภาพที่มีออกซิเจน จึงสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะแบบเฮเทอโรโทรปที่มีอากาศ ไม่มีแสง ระบบในการสังเคราะห์ด้วยแสงประกอบด้วยแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์หลายชนิด

A. B.

Figure 2.4 A. The family Chromatiaceae of photosynthetic bacteria
B. The family Rhodospirillaceae of photosynthetic bacteria
ที่มา : Van Niel (1944) ; Imhoff (1992)

การจัดกลุ่มแบคทีเรียด้วย Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เล่มที่ 9 ได้จำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันไว้ในกลุ่มที่ 10 (anoxygenic phototrophic bacteria) กลุ่มย่อย (subgroup) ที่ 3 ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย 6 สกุล ดังนี้ (Staley และคณะ, 1994)

1. *Rhodospirillum*
2. *Rhodopila*
3. *Rhodobacter*
4. *Rhodopseudomonas*
5. *Rhodomicrobium*
6. *Rhodocyclus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในบริเวณที่มีแสงสว่างส่องถึง มีสารอินทรีย์ และพบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มในแหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจน มีแสงเล็กน้อย ในแหล่งน้ำจืดที่มีซัลไฟด์อยู่จะพบน้อยมาก แต่บางชนิดก็อาศัยอยู่ได้ในที่ที่มีปริมาณซัลไฟด์อยู่สูง (Imhoff, 1992) นอกจากนี้ยังพบได้ในพื้นดิน แม่น้ำ คลอง หรือแหล่งน้ำที่สกปรก เช่น บ่อบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง จึงเป็นแหล่งที่แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มนี้เจริญได้ดี โดยทั่วไปมักพบการเจริญอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (Pfenning และ Truper, 1989; Olliver, 1994) เช่น การเจริญอย่างรวดเร็วที่พบในประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีเมตาบอลิซึมดีกว่าแบคทีเรียสีม่วงที่ใช้ซัลเฟอร์ สามารถเจริญได้ทั้งแบบโฟโตเฮเทอโรโทรป และโฟโตออโตโทรป โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนต่อสภาพที่มีออกซิเจน จึงสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะแบบเฮเทอโรโทรปที่มีอากาศ ไม่มีแสง มีแบคเทอริโอ-คลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์หลายชนิดในการสังเคราะห์แสง ทำให้ปัจจุบันแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันได้รับความสนใจในด้านการศึกษา และวิจัยอย่างกว้างขวาง มีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพกันอย่างแพร่หลาย (Sasikala และคณะ, 1993; Sasikala และ Ramana, 1995)

2.4 การนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันไปใช้เพื่อการเกษตร และสิ่งแวดล้อม

2.4.1 การใช้ในด้านการเกษตร

เซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง อาทิเช่น แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ *Rhodopseudomonas capsulatus* เป็นเซลล์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 60-65 ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วย กรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน และยังมีวิตามิน และแร่ธาตุ เช่น วิตามินบี 1 วิตามิน บี 2 วิตามินบี 6 กรดโฟลิค วิตามินบี 12 วิตามินซี วิตามินดี และวิตามินอี เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.2 นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุ สารโคแฟคเตอร์ เช่น ยูบิควิโนน (Ubiquinone) โคเอนไซม์คิว (Coenzyme-Q) ประกอบอยู่ด้วย จึงเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2.2 The compositions of essential amino acids and vitamin from photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas capsulatus*

Substance	Ingredients	Quantity
Amino acid	Lysine	2.86
(g/100 g-dry cell weight)	Histidine	1.25
	Arginine	3.34
	Aspartic	4.56
	Threonine	2.70
	Serine	1.68
	Glutamic acid	5.34
	Proline	2.80
	Glycine	2.41
	Alanine	4.65
	Valine	3.51
	Methionine	1.58
	Isoleucine	2.64
	Leucine	4.50
	Trypsine	1.71
	Phenylalanine	2.60
	Tryptophan	1.09
Vitamin	Vitamin B1	0.210
(mg/g-dry cell weight)	Vitamin B2	0.250
	Vitamin B6	0.025
	Vitamin B12	0.105
	Vitamin C	0.200
	Vitamin D	0.100
	Vitamin E	0.0312

ที่มา : Kobayashi และ Kurata (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kobayashi และ Kurata (1978) ได้ทดลองผสมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง ลงในอาหารเลี้ยงไก่ปริมาณ 0.01 – 0.04 เปอร์เซ็นต์ในรูปของเซลล์สด ซึ่งพบว่าไก่จะเริ่มไข่เร็วขึ้น ระยะเวลาในการให้ไข่มากขึ้น คุณภาพของไข่ดีขึ้น สีของไข่แดงขึ้น น้ำหนักไข่ และน้ำหนักตัวดีขึ้น และอัตราการใช้อาหารของไก่ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังได้มีการนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมาผสมในอาหารปลาสวยงาม เช่น ในอาหารเลี้ยงปลาทองเมื่อนำเอาแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ *Rhodobactor gelatinosa* ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ร้อยละ 57.93 และยังมีวิตามิน และกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น วิตามินบี 12 วิตามินอี เมไทโอนีน และไลซีน ซึ่งลักษณะการผสมจะผสมในรูปเซลล์สด โดยทดแทนปลาป่น 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าช่วยให้การเจริญของปลาดีขึ้น มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 96.3 และทำให้ไข่สุกเร็วขึ้น การนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง สายพันธุ์ *Rhodobacto sphaeroides* ไปผสมในอาหารเลี้ยงปลาแฟนซีคาร์ฟ พบว่า ปลามีสีเข้มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ส่วนการประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง พบว่า โรคเหงือกกุ้ง (gill disease) ซึ่งทำให้เกิดการเสียหายเป็นอย่างมาก แต่เมื่อใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น สายพันธุ์ *Rhodobacter capsulatus* จะช่วยลดโรคต่างๆ ที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้ ลูกกุ้ง ลูกปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาทอง ปลาคาร์ฟ ปู และหอยแครง สามารถกินแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงได้โดยตรงหลังจากฟักออกจากไข่ ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มน้ำหนัก และเพิ่มอัตราการรอดตายเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบในกรณีที่ไม่ได้กินแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงหลังจากฟักออกจากไข่ ตารางที่ 2.3 แสดงให้เห็นว่า เมื่อผสมเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในอาหารเลี้ยงลูกปลาคาร์ฟในสัดส่วน 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราการรอดตายสูงขึ้นมากกว่าไม่ได้เติมแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในอาหารเลี้ยงลูกปลา เนื่องจากไฮโดรเจนซัลไฟด์จากของเสียที่ลูกปลาผลิตออกมา เมื่อสะสมในปริมาณมากจะเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของลูกปลา แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์ ให้อยู่ในรูปสารประกอบซัลเฟอร์ที่ไม่เป็นพิษต่อลูกปลา

Table 2.3 The effect of photosynthetic bacteria as a nutrition supplement on the survival rate of small fancy carp

Treatment	Amount of survival after 1 month	Survival rate
control	2,772	69.3
Food compose with PTB 0.1%	3,860	96.5

ที่มา : Kobayashi และ Kurata (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มบริษัท Premium Aquatics Inc. ซึ่งผู้ผลิตอาหารและอุปกรณ์เสริมสำหรับเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในอินเดียนาโปลิส ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ผลิตเชื้อผสมของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง 4 สายพันธุ์ คือ *Rhodospseudomonas palustris, Rhodobacter sphaeroides, Rhodobacter capsulatus* และ *Rhodospirillium rubrum* เพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงปลากาฬใต้ชื่อทางการค้าว่า sr-PSBTM และ AZOO SUPER RED PHOTOSYNTHETIC BACTERIA ซึ่งอุดมไปด้วยโปรตีน ไขมัน แร่ธาตุต่างๆ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 6 วิตามินบี 12 nicotinic acid folic acid pantothenic acid และ biotin เป็นต้น โดยบริษัทรายงานว่า sr-PSBTM จะช่วยให้ปลาเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ช่วยเพิ่มสีสันให้กับปลา นอกจากนี้ยังช่วยย่อยสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียในน้ำของบ่อเลี้ยงปลา และยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้อีกด้วย

การผลิตฮอร์โมนพืชจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น ไซโตไคนิน (cytokinin) ผลิตจาก *Rhodospirillum rubrum* ไคเนติน (kinetin) และซีเอติน (zeatin) ผลิตโดย *Rhodobacter sphaeroides* นอกจากนี้ยังมีออกซิน (auxin) กรดอินโดล-3- อะซิติก (indole-3-acetic acid ; IAA) และกรดอินโดล-3-บิวทีริก (indole-3-butyric acid ; IBA) ผลิตจาก *Rhodobacter sphaeroides* สารกำจัดวัชพืช และยาฆ่าแมลงชีวภาพ เช่น 5-aminolevulinic acid (ALA) ซึ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันที่ผลิตสารนี้ เช่น *Rhodobacter palustris* (ได้ ALA 750 nmol) *Rhodobacter sphaeroides* (ได้ ALA 2,000-4,000 nmol) การนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไปใช้สำหรับการเพาะปลูกข้าว (Maki, 2004) รายงานว่า ดินในบริเวณรากข้าวในระยะข้าวตั้งท้องจะมีสภาวะไม่มีออกซิเจน ส่งผลให้แบคทีเรียในกลุ่มแอนแอโรปเจริญได้ดี สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ขึ้นมา ทำให้มีผลไปยับยั้งกระบวนการสร้างเมตาบอลิซึมของรากข้าวซึ่งเป็นพิษต่อราก แต่เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมาใส่ลงในดินในระยะเวลาดังกล่าว แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจะเปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้อยู่ในรูปสารประกอบซัลเฟอร์ที่ไม่เป็นพิษต่อราก จึงมีผลให้รากของต้นข้าวเจริญงอกงามมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และลักษณะของต้นข้าวก็มีความแข็งแรง ซึ่งมีผลให้ผลผลิตของข้าวมากขึ้นตามไปด้วย ดังแสดงตามตารางที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2.4 Rice production in agriculture field with and without photosynthetic bacteria

Treatment	Rice grain (kg/10 Acres)
control chemical fertilizer	425.1
treatment 1 compose fertilizer	877.4
treatment 2 compose fertilizer and photosynthetic bacteria[a]	1056.7

[a] *Rhodobactor capsulatus*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kobayashi (2000)

ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่มีรงควัตถุ (pigment) ประเภทแคโรทีนอยด์เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ เมื่อนำมาใช้จะช่วยเพิ่มปริมาณแคโรทีนในพืช เช่น ต้นส้มจีน (tangerine trees) ต้นพลัม (persimmon tree) ต้นมะเขือเทศ และต้นข้าวโพด ซึ่ง Kobayashi (2000) ศึกษาการใช้เซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมาผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพใส่ในต้นพลัม พบว่า ปริมาณผลพลัม ความหวานและความมันวาวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้เพียงปุ๋ยอนินทรีย์เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไลโคปีน (lycopene) ในลูกพลัมจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากรงควัตถุที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจะถูกย่อยกลายเป็นโมเลกุลเล็กๆ ทำให้รากพืชสามารถดูดไปใช้สร้างรงควัตถุให้กับผลได้

2.4.2 การใช้ในด้านการแพทย์

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถสังเคราะห์ยูบิควิโนน (ubiquinone ; UQ10) (รูปที่ 2.5) ขึ้นภายในเซลล์ได้ โดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่นิยมนำมาใช้ผลิต เช่น *Rhodocyclus gelatinosus* *Rhodobacter capsulatus* *Rhodospirillum rubrum* เป็นต้น ซึ่งยูบิควิโนนที่สกัดจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงนำมาเป็นอาหารเสริมในผู้ป่วยโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด นอกเหนือจากการนำ UQ10 มาเป็นอาหารเสริมแล้ว ยังมีผู้สนใจในฤทธิ์การเป็นสารต้านออกซิเดชั่น (antioxidant) และเป็นสารธรรมชาติที่ร่างกายมนุษย์สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เอง มีการนำ UQ10 มาใช้ในทางเครื่องสำอางสำหรับลดการเกิดริ้วรอย ชะลอการเสื่อมของเซลล์ผิวหนังจากแสงแดด (photo aging)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

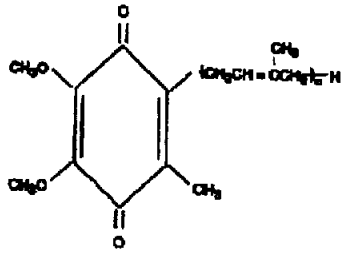


Figure 2.5 Structure of ubiquinone (UQ10)

ที่มา : Maki (2004)

2.4.3 การใช้ในด้านสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน สามารถย่อยสลายสารประกอบภายในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนจึงสามารถนำไปบำบัดน้ำเสีย และนำของเสียกลับมาใช้ได้อีก ฉะนั้นแหล่งน้ำเสียที่สามารถใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มนี้บำบัดได้จึงมีมากมาย โดยทั่วๆ ไปจะเป็นน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ น้ำเสียทางการเกษตร น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร น้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน น้ำเสียจากอุตสาหกรรมการใช้จุลินทรีย์ (ได้แก่ ผลิตเบียร์ ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น) น้ำเสียจากอุตสาหกรรมทางเคมี และปิโตรเลียม และอุตสาหกรรมของเสียในรูปก๊าซต่างๆ เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันที่นิยมนำมาใช้ในการบำบัดของเสียต่างๆ จะอยู่ในสกุล *Rhodopseudumonas* *Rhodobacter* *Rhodospirillum* และ *Rhodocyclus* โดยที่แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันดังกล่าว จะทำให้น้ำเสียมีคุณภาพดีขึ้นได้โดย

2.4.3.1 ช่วยลดค่า BOD, COD และ TOC (total organic carbon) สามารถลดได้ถึง 20-99 เปอร์เซ็นต์

2.4.3.2 ย่อยสลายสารประกอบที่เป็นพิษชนิดต่าง ๆ

2.4.3.3 ย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติค (aromatic)

2.4.3.4 เคลื่อนย้ายพวกคาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO)

2.4.3.5 เกิดกระบวนการกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) และดีแอมโมนิฟิเคชัน (Deammonification) ทำให้ช่วยลดแอมโมเนีย และไนเตรทที่เป็นปัญหาในการบำบัดน้ำเสียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จารุวรรณ (2532) ได้นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไปใช้บำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานมันสำปะหลัง พบว่า สามารถลดค่าซีโอดี (ค่าความสกปรกของน้ำเสีย) ได้มากถึง 94.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แบคทีเรียเป็นหัวเชื้อในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์และเมื่อเพิ่มเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความสามารถในการกำจัดความสกปรกในน้ำเสียเพิ่มสูงขึ้นเป็น 96.45 เปอร์เซ็นต์

Kobayashi (1971) ได้นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงในกลุ่มไม่สะสมกำมะถันมากำจัดน้ำทิ้งที่มีค่าบีโอดี (BOD) มากกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ต้องเจือจางน้ำเสียเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบไร้อากาศ และมีแสง ซึ่งพบว่าสามารถลดค่า BOD ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Sawada และ Rogers (1977) ได้ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *R. Capsulatus* บำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าสัตว์ พบว่า สามารถลดค่าบีโอดีจาก 3,030 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือ 140 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพไร้อากาศ และมีแสง เปรียบเทียบกับการบำบัดโดยไม่ใส่เชื้อ *R. Capsulatus* ค่าบีโอดีลดจาก 3,480 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเพียง 370 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.5 การใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Melis และ Melnicki (2006) ได้ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodospirillum rubrum* ร่วมกันภายใต้สภาวะไร้อากาศ และใช้แสง พบว่า *R. rubrum* จะใช้กรดอินทรีย์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ *C. reinhardtii* กรดอินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นสับสเตรทมีหลายชนิด เช่น กลูโคส แป้ง ไกลโคเลต อะซิเตต แลคเตต และมาเรต ในบางครั้งสับสเตรทเหล่านี้จะสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรด ซึ่งเป็นสาเหตุของการยับยั้งอัตราเมตาบอลิซึมและการเจริญของเชื้อในกระบวนการหมัก การสะสมนี้จะทำให้หยุดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนกรดอินทรีย์ที่สะสมสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *R. rubrum* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ COCULT medium ที่ใช้เลี้ยง *R. rubrum* และ *C. reinhardti* ร่วมกัน มีองค์ประกอบดังนี้

Tris-HCl, pH 7.0	20	mM
K_2HPO_4	10	mM
$MgSO_4$	2	mM
NH_4Cl	7	mM
Na-Acetate	16	mM
Na-Saccinate	16	mM
Na-Glutamate	3	mM
$CaCl_2$	680	µM
Na-EDTA	135	µM
Fe-Citrate	138	µM
$ZnSO_4$	76	µM
H_3BO_3	234	µM
$MnCl_2$	36	µM
$CuCl_2$	2	µM
Na_2MoO_4	12	µM
$CoCl_2$	7	µM
Biotin	0.06	µM

พุทธชาติ (2550) ได้ทำการทดลองเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ *Rhopseudomonas sphaeroides* 3701 โดยใช้แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลกติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ภายใต้สภาวะไร้อากาศ และใช้แสงที่ อุณหภูมิ 30 °ซ วางแผนการทดลองโดยใช้กรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 10 20 และ 48 มิลลิโมล เกิดก๊าซไฮโดรเจน 125 123 และ 68 มิลลิลิตรต่อมิลลิโมล ตามลำดับ การใช้แหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันดังกล่าว ทำให้ผลที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างถึง 30-55 เปอร์เซ็นต์ หากใช้แหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลของกรดแลกติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก จะเกิดก๊าซไฮโดรเจน 85 78 68 และ 60 มิลลิลิตรต่อโมล ตามลำดับ และเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมของกรดแลกติก และกรดอะซิติก พบว่าก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากกว่าใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดแลกติกหรือกรดอะซิติกเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สับสเตรทเพียงชนิดเดียว โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน

Yongzhen และ Yaanling (2008) ได้ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน และนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย พบว่าสภาวะที่ทำให้เกิดไอโซเลตใหม่ คือ pH ประมาณ 7.0 ไอโซเลตใหม่ที่เกิดขึ้นใช้แหล่งคาร์บอน 22 แหล่งในการเจริญ และใช้แหล่งคาร์บอน 15 แหล่งในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เช่น ซักซิเนต แลคเทต บิวทิเรต มาเรต อะซิเตต กรดไพรูวิก กรดโพรพิโอนิก แมนนิทอล และกลูโคส เกิดก๊าซไฮโดรเจน 89.7 81.5 71.5 78.8 69.0 72.6 61.9 64.5 และ 52.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Buranakarl และคณะ (1985) รายงานถึงการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงชนิด purple non-sulfur คือ *Rhodopseudomonas gelatinosa* T-20 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยการใช้แป้งดิบของข้าวโพด มันฝรั่ง และมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการผลิตเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด ที่ใช้ในการย่อยแป้งดิบจากแบคทีเรียดังกล่าว

Hillmer และ Gest (1977) ได้รายงานถึงการใช้แลคเทต มาเรต ไพรูเวต ซักซิเนต กรดโพรพิโอนิก และบิวทิเรต เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำตาลบางชนิดเช่น กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และบางรายงานยังได้รายงานถึงการใช้น้ำทิ้งจากโรงงานเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เช่น การใช้น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำตาล (Yetis และคณะ, 2000)

Kim และคณะ (1981) รายงานถึงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงชนิด purple non-sulfur สายพันธุ์ TN3 และ *Rhodopseudomonas palustris* A ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ormerod's ที่มีกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ 30 มิลลิโมล เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน และ sodium L-glutamate 5 มิลลิโมล เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 6.8 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ และใช้แสง ความเข้ม 10 กิโลลักซ์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ากรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ TN3 สามารถใช้ได้ ได้แก่ มาเรต ซักซิเนต ฟูมาเรต แลคเทต บิวทาเรต ไพรูเวต และอะซิเตต ในขณะที่ *Rhodopseudomonas palustris* A ก็สามารถใช้กรดอินทรีย์ดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งให้อิเล็กตรอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เช่นกัน

Eroglu และคณะ (1999) ได้รายงานถึงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodobacter spaeroides* O.U. 001(DSM 5648) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดมาริก 15 มิลลิโมล เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน และโซเดียมกลูตาเมต 2 มิลลิโมล เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 7.0 ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน glass column photobioreactor (PBR) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศและใช้แสง ความเข้มแสง 200 วัตต์ต่อตารางเมตร อุณหภูมิ 32 องศา-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83988

เซลเซียส และรายงานความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 374 มิลลิลิตร ในเวลา 137 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 0.01 ลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อชั่วโมงต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังสรุปว่าโซเดียมกลูตาเมตช่วยส่งเสริมการเจริญของ *R. spaeroides* O.U. 001 และเมื่อใช้กรดมาริกความเข้มข้นสูง และโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้นต่ำ จะช่วยให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนดีขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดมาริกความเข้มข้นสูงถึง 30 มิลลิโมล และใช้โซเดียมกลูตาเมตในระดับความเข้มข้นต่ำ คือ 5 มิลลิโมล จึงเหมาะสมสำหรับ *R. spaeroides* SB46/1 ที่จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงในอาหารที่มีกรดอินทรีย์ดังกล่าว โดยสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงถึง 0.02 ลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อชั่วโมงต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าในรายงานของ Eroglu และคณะ (1999) ถึง 2 เท่า

Barbosa และคณะ (2001) ได้รายงานถึงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. และ *Rhodopseudomonas palustris* ในอาหารเหลวที่มีอะซิเตต 22 มิลลิโมล เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน และกลูตามิก 0.8 มิลลิโมล เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 7.0 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มีจุกยางปิดสนิทขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้อากาศ และใช้แสง ความเข้ม 40 ไมโครโมลโปรตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดของแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas* sp. เท่ากับ 25.2 มิลลิลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อชั่วโมงต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ 2.2 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง สำหรับ *Rhodopseudomonas palustris* ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้ *Rhodobacter spaeroides* SB46/1 ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในอาหารเหลว Ormerod's ที่มีมาริก 30 มิลลิโมล เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งให้อิเล็กตรอน และกลูตามิก 5 มิลลิโมล เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไร้อากาศ และใช้แสง ความเข้ม 10 กิโลลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 20.48 มิลลิลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อชั่วโมงต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าประมาณ 9 เท่า

Nakada และคณะ (1999) ได้ศึกษาถึงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodobacter spaeroides* RV ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดแลคติก 50 มิลลิลิตร เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และโซเดียมกลูตาเมต 10 มิลลิลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.15 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสง 107 วัตต์ต่อตารางเมตร เป็นเวลา 100 ชั่วโมง (รายงานการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นลิตรต่อตารางเมตร) ได้ 140 ลิตรต่อตารางเมตร เมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบของก๊าซที่แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rhodobacter spaeroides RV ผลิตได้ พบว่า ประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจนถึง 88.1 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.9 เปอร์เซ็นต์

Kondo และคณะ (2002) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodobacter spaeroides* RV ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแลกเตด 50 มิลลิลิตร เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และโซเดียมกลูตาเมต 10 มิลลิลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 6.8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รายงานการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อตารางเมตรต่อ 24 ชั่วโมง พบว่าให้แสงเด็มที่โดยไม่ใช้แถบบังแสง (light shade bands) มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 17 ลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อตารางเมตรต่อ 24 ชั่วโมง แต่เมื่อมีการใช้แถบบังแสงในแนวตั้งและแนวนอน พบว่ามีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงขึ้นเป็น 21 และ 24 ลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อตารางเมตรต่อ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้น ความเข้มแสงสำคัญสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยนอกเหนือจากความยาวคลื่น

Koku และคณะ (2002) ได้รายงานการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodobacter spaeroides* O.U. 001 (DSM 5864) เป็นมิลลิเมตรของปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีมาริก 15 มิลลิโมล เป็นแหล่งอิเล็กตรอน และโซเดียมกลูตาเมต 2 มิลลิโมล เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150-250 วัตต์ต่อตารางเมตร *Rhodobacter spaeroides* O.U. 001 (DSM 5864) สามารถผลิตได้ทั้งสิ้น 380±50 มิลลิลิตร โดยประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจน 95 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

3.1.2 ตัวอย่างน้ำจากอำเภอบางแสน และศรีราชา จ.ชลบุรี

3.2 สารเคมี

3.2.1 ρ-aminobenzoic acid

3.2.2 Thiamine HCl

3.2.3 Biotin

3.2.4 Nicotinic acid

3.2.5 Carboxymethyl cellulose

3.2.6 Glucose

3.2.7 Acetic acid

3.2.8 Peptone

3.2.9 Monosodium glutamate

3.2.10 Paraffin

3.2.11 แป้งมันสำปะหลัง

3.2.12 แป้งข้าวเจ้า

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Hirayama รุ่น HV-50)

3.3.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo (Thailand) Ltd. รุ่น AG204)

3.3.3 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) (cyberscan 2000)

3.3.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) (ISSCO รุ่น BVT 123)

3.3.5 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon ECLIPSE 80i)

3.3.6 vacuum system (BUCHI, Switzerland)

3.3.7 desiccators

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

เก็บตัวอย่างเชื้อจากแหล่งน้ำที่กรุงเทพมหานคร 3 แหล่ง ได้แก่ บ่อเลี้ยงปลานิล 2 บ่อ และนาข้าวบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และตัวอย่างน้ำจาก จ.ชลบุรี 2 แหล่ง ได้แก่ บ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานเครือสหพัฒนพิบูล จำกัด อำเภอศรีราชา และแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอบางแสน ใส่ลงในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121°ซ เวลา 15 นาที (โดยการเก็บต้องระวังไม่ให้มีก๊าซออกซิเจนอยู่ภายในขวด เนื่องจากเชื้อเป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ) เทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับด้านหน้า นำขวดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ สังเกตการเปลี่ยนแปลง และการเกิดฟองก๊าซหลังจากบ่มได้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงนำมาทำการคัดแยกเชื้อบนอาหารแข็ง Minimal medium of Ormerod's ต่อไป

Figure 3.1 The enrichment of photosynthetic bacteria in water sample by incubation under light condition at 30-35°C

3.4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

นำตัวอย่างน้ำจากที่นาข้าวหลังสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เกิดการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำเป็นสีแดง และแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพาที่เกิดการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำเป็นสีน้ำตาลแดง มาทำการคัดแยกเชื้อลงบนอาหารแข็ง Minimal medium of Ormerod's (ภาคผนวก ก) ที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคสหรือกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้วิธีการลากเชื้อ (streak plate) นำไปบ่มใน desiccators แล้วใส่กระดาษ methylene blue แปะไว้ด้านข้าง จากนั้นใช้เครื่อง vacuum system ดูดอากาศภายใน desiccators ออก แล้วเติมก๊าซไนโตรเจนเข้าไปแทนที่ โดยทำ 3 ซ้ำ จนกระทั่งกระดาษ methylene blue เปลี่ยนเป็นไม่มีสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ ตรวจดูโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นสีแดง ชมพู หรือส้ม นำโคโลนีที่แยกได้ไปทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จากนั้นสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

Figure 3.2 The isolation and selection of photosynthetic bacteria by incubation under light and anaerobic condition

3.4.3 ศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบสารอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

ศึกษาการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้สารสกัดจากยีสต์แทนเกลือแร่ (mineral) ของสูตรอาหาร Minimal medium of Ormerod's ทำการทดลองโดยเปลี่ยนมาใช้อาหารที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Modified medium) แทน mineral ($CaCl_2 . 2H_2O$ $FeSO_4 . 7 H_2O$ EDTA. 2Na ρ-aminobenzoic acid Thiamine HCl Biotin Nicotinic acid Trace element 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ดังตาราง 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3.1 The medium composition for photosynthetic bacteria isolation and cultivation

Medium formula	Carbon source	Nitrogen source	Other
1	glucose 1.0%	peptone 1.0%	mineral
2	glucose 1.0%	peptone 1.0%	yeast extract 0.5%
3	glucose 1.0%	monosodium glutamate 1.0%	mineral
4	glucose 1.0%	monosodium glutamate 1.0%	yeast extract 0.5%
5	acetic acid 1.0%	peptone 1.0%	mineral
6	acetic acid 1.0%	peptone 1.0%	yeast extract 0.5%
7	acetic acid 1.0%	monosodium glutamate 1.0%	mineral
8	acetic acid 1.0%	monosodium glutamate 1.0%	yeast extract 0.5%

ปรับพีเอชเป็น 6.8 แล้วนำไปบ่มกายใน desiccators ที่สภาวะไร้อากาศ โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ บ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน แล้วตรวจดูลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.4.4 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจำนวน 7 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอาหารแข็งมาเพิ่มปริมาณลงในอาหารเหลวที่มีกรดอะซิติก (1.0 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน (1.0 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นดูดตัวอย่างเชื้อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน เทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับด้านหน้า นำหลอดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ จากนั้นนำมาวัดการเจริญของเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.4.5 ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มาทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารเหลว Modified medium ที่มีองค์ประกอบต่างๆ จำนวน 9 สูตร โดยเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว (Modified medium) ปริมาตร 20 มล. ซึ่งบรรจุในหลอดทดลอง แล้วนำหลอดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำเชื้อปริมาตร 1.0 มล. มาใส่ในอาหารดังตาราง 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3.2 The effect of carbon sources and concentration on the cultivation of photosynthetic bacteria

Medium formula	Nitrogen source	Carbon source	Other
1	monosodium glutamate 1.0%	glucose 1.0%	yeast extract 0.5%
2	monosodium glutamate 1.0%	glucose 3.0%	yeast extract 0.5%
3	monosodium glutamate 1.0%	glucose 5.0%	yeast extract 0.5%
4	monosodium glutamate 1.0%	acetic acid 1.0%	yeast extract 0.5%
5	monosodium glutamate 1.0%	acetic acid 3.0%	yeast extract 0.5%
6	monosodium glutamate 1.0%	acetic acid 5.0%	yeast extract 0.5%
7	monosodium glutamate 0.5%	acetic acid 1.0%	yeast extract 0.5%
8	monosodium glutamate 0.5%	acetic acid 3.0%	yeast extract 0.5%
9	monosodium glutamate 0.5%	acetic acid 5.0%	yeast extract 0.5%

แล้วเทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับด้านหน้า นำหลอดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ จากนั้นนำมาวัดการเจริญของเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.4.6 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในอาหารเหลวที่มีพอลิแซคคาร์ไรด์ (Polysaccharide) เป็นแหล่งคาร์บอน

นำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มาเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว (Modified medium) ปริมาตร 20 มล. ซึ่งบรรจุในหลอดทดลอง แล้วนำหลอดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นดูดตัวอย่างเชื้อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการใช้พอลิแซคคาร์ไรด์เป็นแหล่งคาร์บอน ดังตาราง 3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3.3 The effect of various sorts of polysaccharide on the cultivation of photosynthetic bacteria with polysaccharide as carbon source

Medium formula	Carbon source	Nitrogen source	Other
1	carboxymethyl cellulose (CMC) 0.5%	monosodium glutamate 1.0%	yeast extract 0.5%
2	cassava starch 1.0%	monosodium glutamate 1.0%	yeast extract 0.5%
3	rice starch 1.0%	monosodium glutamate 1.0%	yeast extract 0.5%

เทฟาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับด้านหน้า นำหลอดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ จากนั้นนำมาวัดการเจริญของเชื้อทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 240 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำที่กรุงเทพมหานคร 3 แหล่ง ได้แก่ บ่อเลี้ยงปลานิล 2 บ่อ และนาข้าวบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และตัวอย่างน้ำจาก จ.ชลบุรี 2 แหล่ง ได้แก่ บ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานเครือสหพัฒนพิบูล จำกัด อำเภอศรีราชา และแหล่งน้ำกายในมหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอบางแสน จากนั้นเทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับด้านหน้า นำขวดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ เมื่อทำการบ่มเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ พบว่า ตัวอย่างน้ำจากนาข้าวบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเกิดการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำเป็นสีแดง และแหล่งน้ำกายในมหาวิทยาลัยบูรพาเกิดการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำเป็นสีน้ำตาลแดง จึงนำมาทำการคัดแยกเชื้อบนอาหารแข็งต่อไป

A. B.

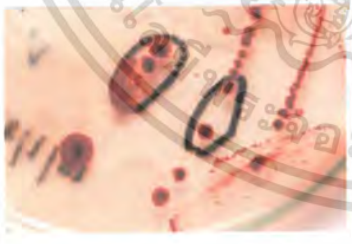
Figure 4.1 The fresh sample water (A) was incubated under light condition at 30-35°C for 7-10 days (B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

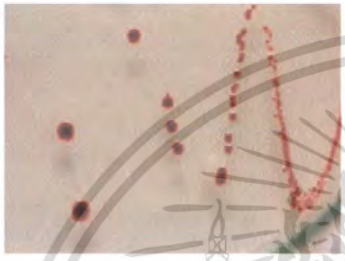
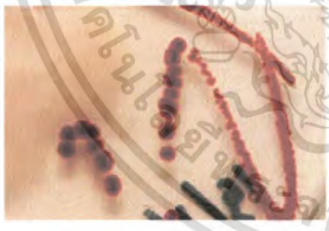
จากการนำตัวอย่างน้ำจากนาข้าวบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เกิดการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำเป็นสีแดง และแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพาที่เกิดการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำเป็นสีน้ำตาลแดงมาทำการคัดแยกเชื้อ โดยหยดน้ำตัวอย่างลงบนอาหารแข็ง Minimal medium of Ormerod's พีเอช 6.8 ที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคสหรือกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้วิธีการลากเชื้อ (streak plate) แล้วนำไปบ่มภายใน desiccators ที่สภาวะไร้อากาศ โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่า เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถเจริญได้ทั้งในอาหารที่มีการใช้กลูโคสหรือกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน และสามารถแยกเชื้อออกมาได้ 7 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังตารางที่ 4.1

Table 4.1 The characteristics of selected isolate of photosynthetic bacteria

Isolate	Colony forming on agar medium	Cell observation under microscope (1000x)	Colony description
1			Size: 1-2 mm diameter Shape: Circular Margin: Undulate Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Red, non-diffusible pigment

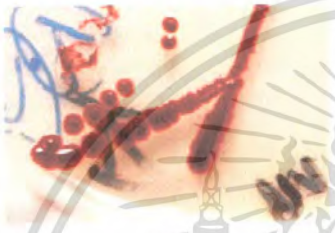
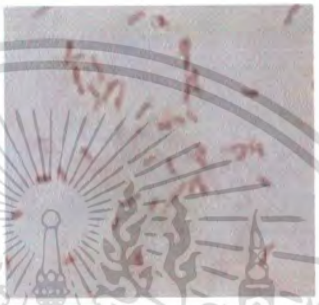
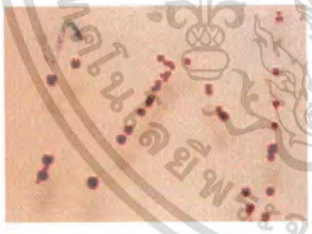
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 4.1 The characteristics of selected isolate of photosynthetic bacteria (continue)

Isolate	Colony forming on agar medium	Cell observation under microscope (1000x)	Colony description
2			Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Dark red, non-diffusible pigment
3			Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Dark red, non-diffusible pigment

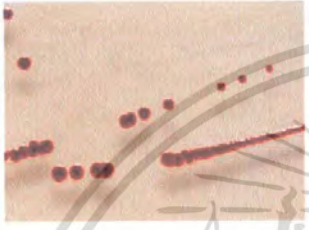
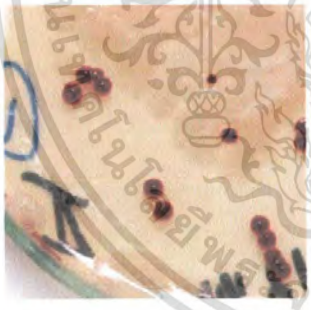
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 4.1 The characteristics of selected isolate of photosynthetic bacteria (continue)

Isolate	Colony forming on agar medium	Cell observation under microscope (1000x)	Colony description
4			Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Undulate Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Dark red, non-diffusible pigment
5			Size: 1 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Dark red, non-diffusible pigment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 4.1 The characteristics of selected isolate of photosynthetic bacteria (continue)

Isolate	Colony forming on agar medium	Cell observation under microscope (1000x)	Colony description
6			Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Bright red, non-diffusible pigment
7			Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Dark red, non-diffusible pigment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาปัจจัยขององค์ประกอบสารอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

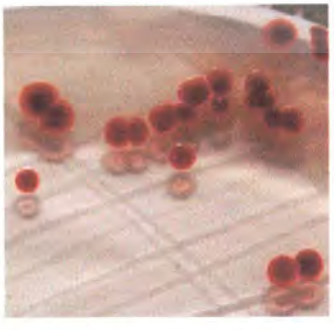
จากการศึกษาการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้สารสกัดจากยีสต์แทน mineral ของสูตรอาหาร Minimal medium of Ormerod's ทำการทดลองโดยเปลี่ยนมาใช้อาหารที่ใช้สารสกัดจากยีสต์แทน mineral ที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พีเอช 6.8 แล้วนำไปบ่มภายใน desiccators ที่สภาวะไร้อากาศ โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มีการใช้สารสกัดจากยีสต์ไม่แตกต่างจากอาหารที่มีการใช้ mineral จึงเลือกใช้สูตรอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์แทนสูตรอาหารที่ใช้ mineral ดังตาราง 4.2

Table 4.2 The typical colony of photosynthetic bacteria on various Modified medium formula

Modified medium	Component	Colony forming on agar medium	Colony description
1	glucose 1.0% + peptone 1.0% + mineral		Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Brown- red, non-diffusible pigment
2	glucose 1.0% + peptone 1.0% + yeast extract 0.5%		Size: 1 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Brown-red, non-diffusible pigment

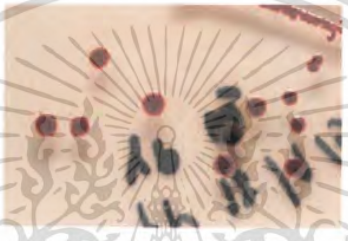
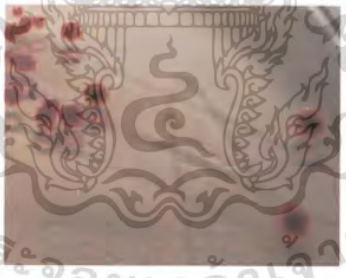
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 4.2 The typical colony of photosynthetic bacteria on various Modified medium formula (continue)

Modified medium	Component	Colony forming on agar medium	Colony description
3	glucose 1.0% + monosodium glutamate 1.0% + mineral		Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Bright red, non-diffusible pigment
4	glucose 1.0% + monosodium glutamate 1.0% + yeast extract 0.5%		Size: 1 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Bright red, non-diffusible pigment
5	acetic acid 1.0% + peptone 1.0% + mineral		Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Brown- red, non-diffusible pigment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 4.2 The typical colony of photosynthetic bacteria on various Modified medium formula (continue)

Modified medium	Component	Colony forming on agar medium	Colony description
6	acetic acid 1.0% + peptone 1.0% + yeast extract 0.5%		Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Brown- red, non-diffusible pigment
7	acetic acid 1.0% + monosodium glutamate 1.0% + mineral		Size: 2 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Brown- red, non-diffusible pigment
8	acetic acid 1.0% + monosodium glutamate 1.0% + yeast extract 0.5%		Size: 1 mm diameter Shape: Circular Margin: Entire Elevation: Convex Surface: Smooth Density: Opaque Pigment: Brown- red, non-diffusible pigment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 4.3 Summary of photosynthetic bacteria growth on various Modified medium formula

Medium formula	Size of colony	Color of colony
1. glucose 1.0% + peptone 1.0% + mineral	++	Brown-red colony
2. glucose1.0% +peptone 1.0% +yeast extract 0.5%	+	Bright red colony
3. glucose 1.0% +monosodium glutamate 1.0% + mineral	++	Brown-red colony
4. glucose 1.0% + monosodium glutamate 1.0% + yeast extract 0.5%	+	Bright red colony with pale white rim
5. acetic acid 1.0% + peptone1.0%+ mineral	++	Brown-red colony
6. acetic acid 1.0% + peptone 1.0%+ yeast extract 0.5%	++	Bright red colony
7. acetic acid 1.0%+ monosodium glutamate 1.0% + mineral	++	Brown-red colony
8. acetic acid 1.0% + monosodium glutamate 1.0% + yeast extract 0.5%	+	Brown-red colony

+ ; small colony size

++ ; large colony size

4.4 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่คัดแยกได้

จากการนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจำนวน 7 ไอโซเลต มาเพิ่มปริมาณลงในอาหารเหลว Modified medium แล้วนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงทั้ง 7 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกรดอะซิติก 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 6.8 เทพาราฟีนเหลวปลอดเชื้อปิดทับด้านหน้า นำหลอดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ จากนั้นนำมาวัดการเจริญของเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และเวลาเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงทั้ง 7 ไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 4.2

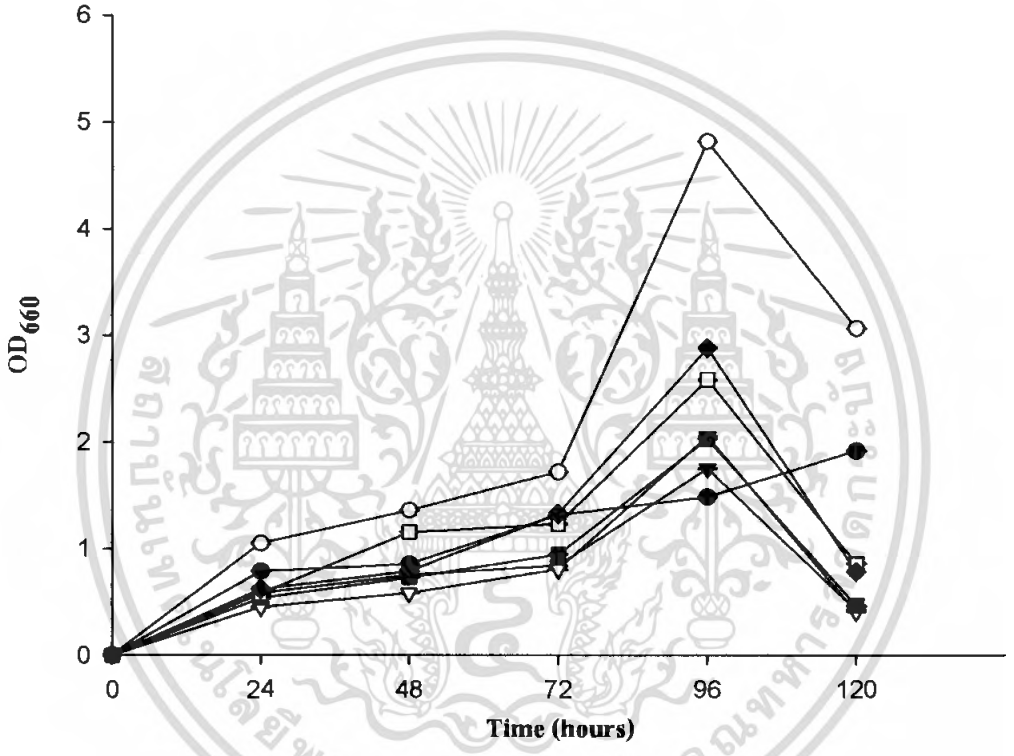


Figure 4.2 The time-course of 7 selected isolates photosynthetic bacteria in Modified medium that incubated under light and anaerobic condition.

The growth of isolate 1
The growth of isolate 2
The growth of isolate 3
The growth of isolate 4
The growth of isolate 5
The growth of isolate 6
The growth of isolate 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงทั้ง 7 ไอโซเลต มาเลี้ยงใน Modified medium ที่มีกรดอะซิติก 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงทั้ง 6 ไอโซเลต มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในการบ่มตั้งแต่ 24 ชั่วโมงถึง 72 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งจะพบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะสามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุดในการบ่ม 96 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 4.82 ไอโซเลตที่ 3 4 และ 5 การเจริญในการบ่ม 96 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกัน แต่การเจริญของไอโซเลตทั้ง 3 จะเจริญได้ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 6 และ 7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ระหว่าง 1.75 ถึง 2.05 ไอโซเลตที่ 6 และ 7 การเจริญในการบ่ม 96 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ระหว่าง 2.58 ถึง 2.89 ส่วนไอโซเลตที่ 1 มีแนวโน้มในการเจริญแตกต่างจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงทั้ง 6 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่ 1 มีแนวโน้มในการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการบ่ม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 1.93 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของไอโซเลตที่ 1 กับไอโซเลตทั้ง 6 ไอโซเลต ที่ระยะเวลาการบ่ม 96 ชั่วโมง พบว่า การเจริญของไอโซเลตที่ 1 จะเจริญได้ต่ำที่สุด แต่เมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ไอโซเลตที่ 1 จะเจริญได้เป็นอันดับ 2 ดังนั้น จึงเลือกไอโซเลตที่ 2 ที่มีการเจริญสูงสุดเพื่อการทดลองต่อไป โดยเก็บแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ลงในหลอดทดลอง

4.5 ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง

จากการนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดมาเลี้ยงใน Modified medium ที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน 9 ชนิด พีเอช 6.8 โดยหลอดที่ 1 2 และ 3 ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ต่อกลูโคส 1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลอดที่ 4 5 และ 6 ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ต่อกรดอะซิติก 1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลอดที่ 7 8 และ 9 ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.5 เปอร์เซ็นต์ต่อกรดอะซิติก 1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับด้านหน้า นำหลอดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ จากนั้นนำมาวัดการเจริญของเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และเวลา เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนอาหารทั้ง 9 สูตร ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ถึง 4.5

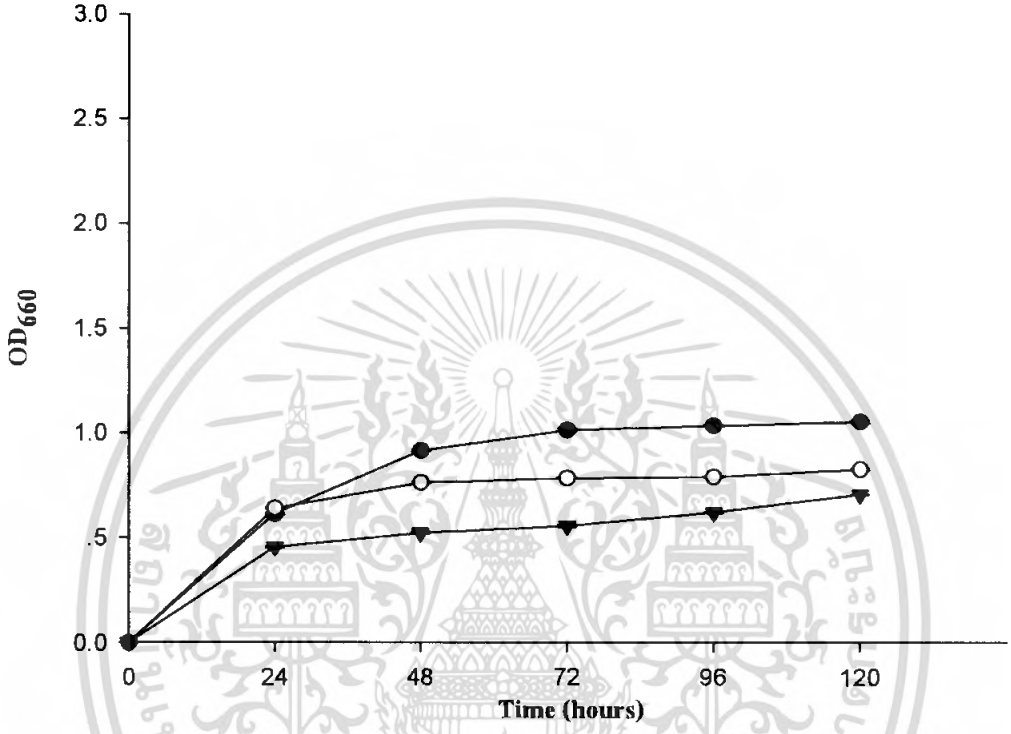


Figure 4.3 The fermentation time-course of Isolate-2 photosynthetic bacteria in Modified medium with monosodium glutamate 1.0% and various glucose concentration (1.0 3.0 and 5.0%), respectively

เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มาเลี้ยงใน Modified medium ที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคส 1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งทำการบ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังการบ่ม 72 ชั่วโมง พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะมีการเจริญสูงสุดในอาหารที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่ 72 ได้ 1.02 รองมาคือ อาหารที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคส 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ

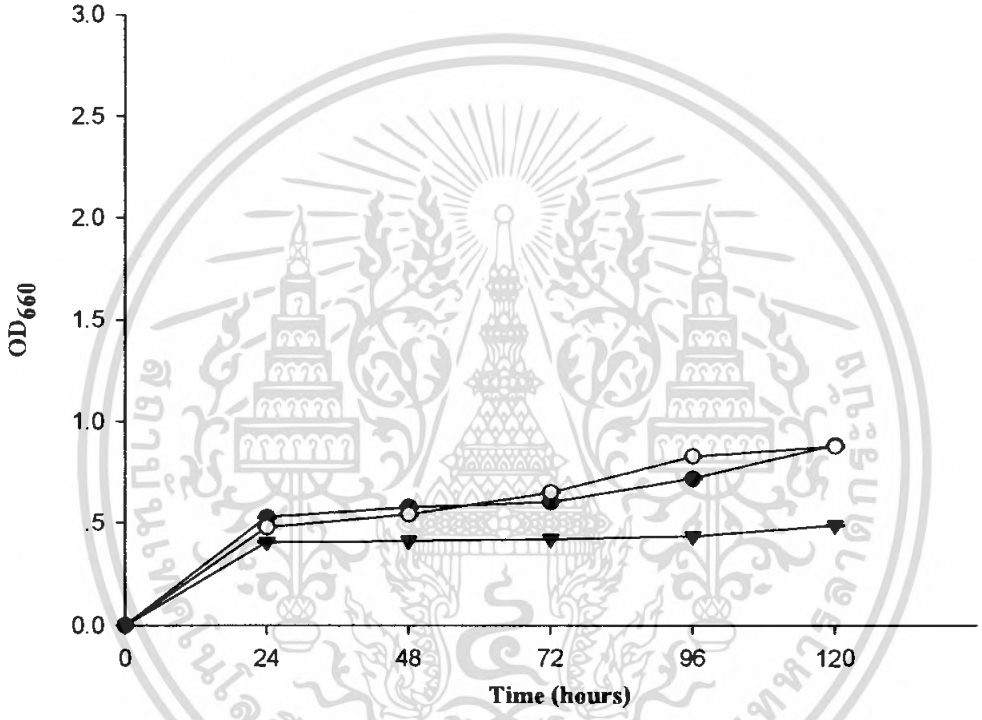


Figure 4.4 The fermentation time-course of Isolate-2 photosynthetic bacteria in Modified medium with monosodium glutamate 1.0% and various acetic acid concentration (1.0 3.0 and 5.0%), respectively

Monosodium glutamate 1.0% Acetic acid 1.0%

Monosodium glutamate 1.0% Acetic acid 3.0%

Monosodium glutamate 1.0% Acetic acid 5.0%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการเจริญใน Modified medium ที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และกรดอะซิติก 1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ในอาหารเหลวที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และกรดอะซิติก 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน มีแนวโน้มที่จะเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่เริ่มทำการบ่มจนกระทั่งสิ้นสุดการบ่ม โดยจะมีการเจริญสูงสุดอยู่ที่ระยะการบ่ม 120 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 0.89 และ 0.88 ตามลำดับ ส่วนใน Modified medium ที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และกรดอะซิติก 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเพิ่มขึ้นเมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นจนกระทั่งสิ้นสุดการบ่ม แสดงว่า ในการใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ในอาหารที่มีกรดอะซิติก 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีแนวโน้มในการเจริญที่ใกล้เคียงกัน และมีการเจริญดีกว่าในอาหารที่มีการใช้กรดอะซิติก 5.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ในอาหารที่มีการใช้กลูโคสหรือกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน จะพบว่า ในอาหารที่มีกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ หรือกรดอะซิติก 1.0 เปอร์เซ็นต์ นั้นแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ากรดอะซิติก 1.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ในอาหารที่มีกลูโคส 3.0 เปอร์เซ็นต์ หรือกรดอะซิติก 3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 เมื่อสิ้นสุดการบ่มจะมีค่าใกล้เคียงกันมาก ส่วนในอาหารที่มีกลูโคส 5.0 เปอร์เซ็นต์ หรือกรดอะซิติก 5.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคส 5.0 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ากรดอะซิติก 5.0 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ใน Modified medium ที่ใช้กลูโคสหรือกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน ดังรูป จะพบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ที่ใช้กลูโคสมีแนวโน้มที่จะเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในการบ่มจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 หลังจากชั่วโมงที่ 72 การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ในอาหารที่ใช้กรดอะซิติก 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่เริ่มทำการบ่มจนกระทั่งสิ้นสุดการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

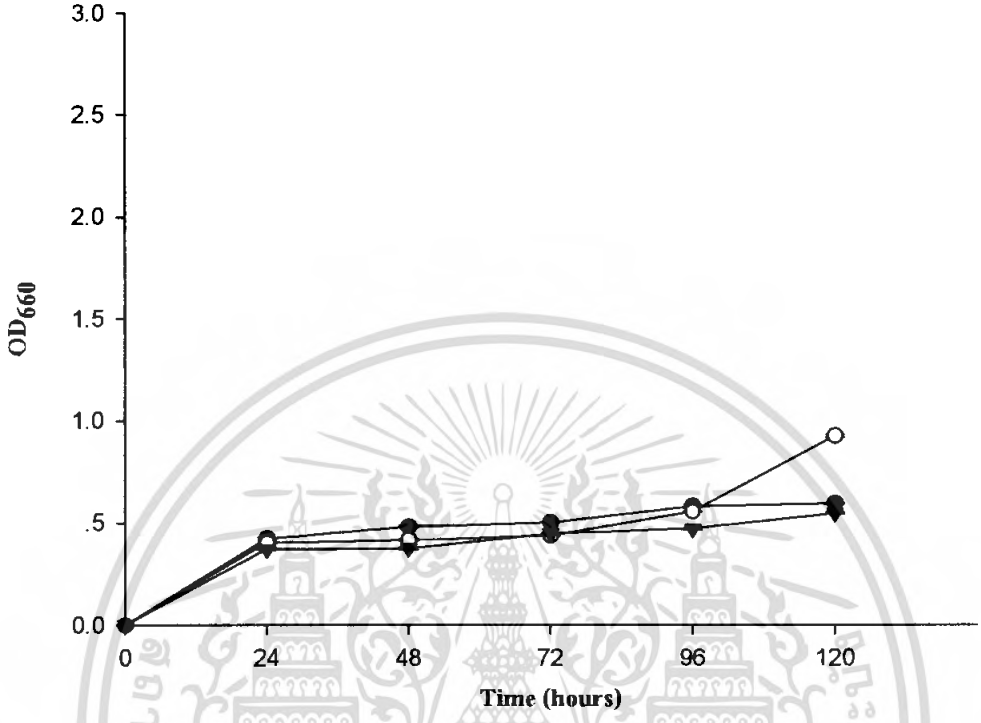


Figure 4.5 The fermentation time-course of Isolate-2 photosynthetic bacteria in Modified medium with monosodium glutamate 0.5% and various acetic acid concentration (1.0 3.0 and 5.0%), respectively

ส่วนการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ใน Modified medium ที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และกรดอะซิติก 1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ จะพบว่าการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ในอาหารที่มีกรดอะซิติก 1.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ในอาหารที่มีกรดอะซิติก 3.0 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีการเจริญสูงสุดเมื่อทำการบ่ม 120 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 0.93 แสดงว่าแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดอะซิติก 3.0 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจน ในอาหารที่มีการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าในอาหารที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเทียบกับอาหารที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 3.0 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะค่อนข้างใกล้เคียงกันกับในอาหารที่มีโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์

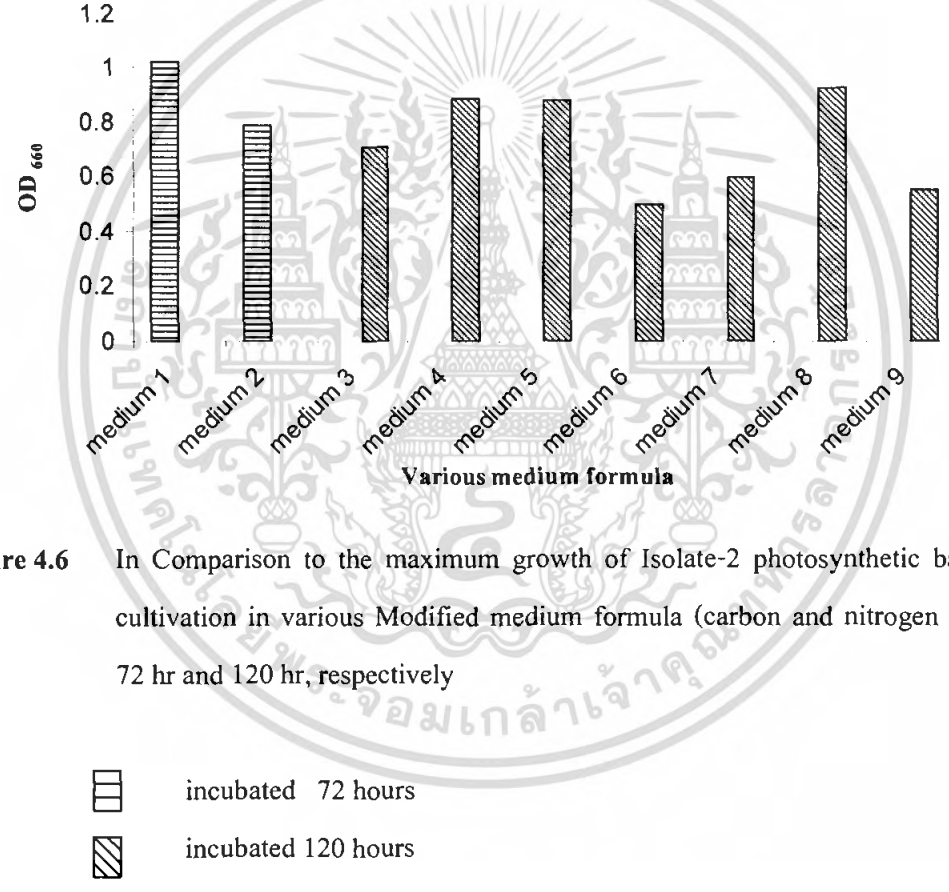


Figure 4.6 In Comparison to the maximum growth of Isolate-2 photosynthetic bacteria by cultivation in various Modified medium formula (carbon and nitrogen source) at 72 hr and 120 hr, respectively

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงในอาหารเหลวที่มีพอลิแซคคาร์ไรด์ (Polysaccharide) เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มาเลี้ยงใน Modified medium ที่มีการใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวเจ้า 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส โดยหลอดที่ 1 ใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส หลอดที่ 2 ใช้แป้งมันสำปะหลัง และหลอดที่ 3 ใช้แป้งข้าวเจ้า เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับด้านหน้า นำหลอดตั้งทิ้งไว้โดยให้แสงไฟความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 °ซ จากนั้นนำมาวัดการเจริญของเชื้อทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 240 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และเวลาเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ในอาหารเหลวที่มีการใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

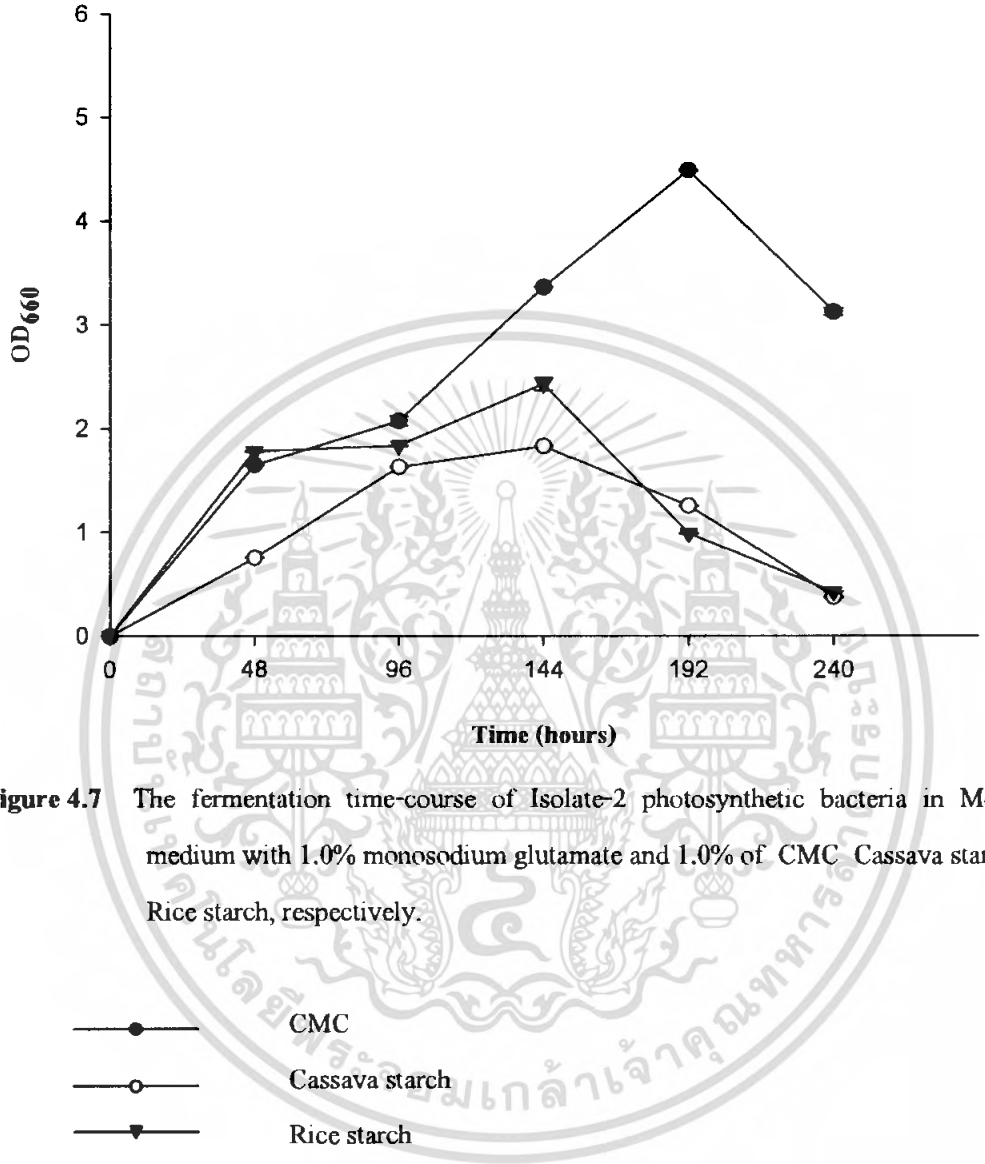


Figure 4.7 The fermentation time-course of Isolate-2 photosynthetic bacteria in Modified medium with 1.0% monosodium glutamate and 1.0% of CMC Cassava starch and Rice starch, respectively.

เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มาเลี้ยงใน Modified medium ที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ แป้งมันสำปะหลัง 1.0 เปอร์เซ็นต์ และแป้งข้าวเจ้า 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 สามารถเจริญได้ดีที่สุดใน Modified medium ที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส โดยการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งทำการบ่มเป็นระยะเวลา 192 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 4.49 หลังจากการบ่มในชั่วโมงที่ 192 พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะลดลง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 3.19 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญในแป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้า พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน การเจริญจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการเจริญสูงสุดเมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 1.83 และ 2.43 ตามลำดับ หลังการบ่มในชั่วโมงที่ 144 พบว่า การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการบ่ม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 0.38 และ 0.43 ตามลำดับ และในอาหารที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะมีฟองก๊าซเกิดขึ้น โดยจะเกิดฟองก๊าซในแป้งข้าวเจ้ามากกว่าในแป้งมันสำปะหลัง และพบว่าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นในอาหารเหลวที่มีการใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถแยกได้จากตัวอย่างน้ำจากกรุงเทพมหานครและจากจังหวัดชลบุรี โดยพบที่แหล่งนาข้าวหลังสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และที่แหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพา โดยจากแหล่งนาข้าวเมื่อนำมาบ่มจะเกิดการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำเป็นสีแดง และที่แหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพาจะเกิดการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำเป็นสีน้ำตาลแดง

เมื่อนำตัวอย่างน้ำไปหยดลงบนอาหารแข็ง Minimal medium of Ormerod's ที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคสหรือกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้วิธีการลากเชื้อ (streak plate) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถเจริญได้ทั้งบนอาหารแข็งที่มีกลูโคสหรือกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถทำการแยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงออกมาได้ 7 ไอโซเลต เมื่อทำการตรวจดูโคโลนีของเชื้อพบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง มีลักษณะกลมโค้งนูน ขอบเรียบ ส่วนใหญ่จะมีสีแดงเข้ม และมีสีแดงอมส้มเพียงเล็กน้อย จากนั้นนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมาย้อมสีแกรม พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงติดสีแกรมลบ และมีรูปร่างกลม-รูปไข่ต่อกันเป็นสายสั้นๆ ประมาณ 3-4 เซลล์

เมื่อทำการศึกษาปัจจัยของสารอาหารต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง โดยการใช้สารสกัดจากยีสต์แทน mineral ของสูตรอาหาร Minimal medium of Ormerod's ที่ทำการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในอาหาร พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มีการใช้สารสกัดจากยีสต์ไม่แตกต่างจากอาหารที่มีการใช้ mineral จึงเลือกใช้สูตรอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์แทนสูตรอาหารที่ใช้ mineral

เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่แยกได้ 7 ไอโซเลต มาศึกษาการเจริญใน Modified medium ที่มีกรดอะซิติก 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยเจริญได้ดีที่สุดเมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ 4.82

เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มาศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยนำมาบ่มใน Modified medium ที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน 9 ชนิด โดยหลอดที่ 1 2 และ 3 ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ต่อกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลอดที่ 4 5 และ 6 ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ต่อกรดอะซิติก 1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลอดที่ 7 8 และ 9 ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.5 เปอร์เซ็นต์ต่อกรดอะซิติก 1.0 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดใน Modified medium หลอดที่ 1 คือ ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ต่อกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 1.02

เมื่อทำการศึกษาการใช้พอลิแซคคาร์ไรด์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 มาเลี้ยงใน Modified medium ที่มีการใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้า 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลวที่มีการใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอน รองมา คือ อาหารเหลวที่มีการใช้แป้งข้าวเจ้า และแป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ โดยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเจริญได้ดีที่สุดในคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เมื่อทำการบ่ม 192 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ 4.49 ส่วนในแป้งข้าวเจ้า และแป้งมันสำปะหลัง พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไอโซเลตที่ 2 จะเจริญได้สูงสุดเมื่อทำการบ่ม 144 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในแป้งข้าวเจ้าได้ 2.43 และวัดค่าการดูดกลืนแสงในแป้งมันสำปะหลังได้ 1.83 และยังพบว่าในอาหารเหลวที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนจะเกิดฟองก๊าซขึ้น โดยจะเกิดฟองก๊าซมากในอาหารเหลวที่ใช้แป้งข้าวเจ้า รองมาคือ แป้งมันสำปะหลัง แต่ในอาหารเหลวที่มีการใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จะไม่เกิดฟองก๊าซขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จารุวรรณ หวะสุวรรณ. 2532. การกำจัดและการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งโรงงานมันสำปะหลังโดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงร่วมกับ heterotrophic bacteria. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

พุทธชาติ แผนสมบุญ. 2550. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง. สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ.

สุรอรรถ ศุภจัตุรัส. 2549. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง. [Online].Available : http://www.nia.or.th/download/activity/20060120_presentation.pdf

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2549. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

Barbosa, M.J., Rocha, J.M.S., Tramper, J. and Wijffels, R.H. 2001. Acetate as a carbon for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Journal of Biotechnology.* 85: 25-33 p.

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko J. M. and Parker, J. 1994. *Biology of Microorganisms. 7th ed.*, Prentice- Hall International, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. 909 p.

Buranakarl, L., Fan, C.Y., Ito, K. and Takahashi, H. 1985. Production of Molecular Hydrogen by Photosynthetic Bacteria with Raw Starch. *Agric. Biol. Chem.* 49: 3339-3341 p.

Eroglu, I., Aslan, K., Gunduz, U., Yucel, M. and Turker, L. 1999. Substrate consumption rate for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *J. Biotechnol.* 70:103-113 p.

Hillmer, P. and Gest, H. 1997. H_2 metabolism in photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulatus* : H_2 production by growing cultures. *J. Bacteriol.* 129:724-731 p.

Imhoff, J. F. 1992. Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic baeteria In N. H. Mann, and N. G. Carr (ed.). *Photosynthetic Prokaryotes. Vol.6.* Plnum Press, Now York and Londan. pp. 53-92

JGI, Penn State Univ. 2007. [Online].Available : http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/chlag/chlag.home.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

John, 2006. Enrichment and isolation of purple non-sulfur photosynthetic bacteria, *John L's Bacteriology*.

Kim, J.S., Ito, K. and Takahashi, T. 1981. Hydrogen production by photosynthetic Bacteria. *Microbial Utilization of Renewable Resource*. 2: 225-263 p.

Kobayashi, N. 1971. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *The seto Marine Biological Laboratory* 18: 379-406 p.

Kobayashi, M. and Kurata, S.I. 1978. The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. *Process Biochem*. 13(9) : 27-30 p.

Kobayashi. M. 2000. Waste Remediation and Treatment Using Anoxygenic Phototropic Bacteria. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Pp. 1269 – 1282.p.

Koku , H., Eroglu, I., Gunduz, U., Yucel, M. and Turker, L. 2002. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhudobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 27: 1315-1329 p.

Kondo, T.M., Arakawa., Wakayama, T. and Miyake, J. 2002. Hydrogen production by combining two types of photosynthetic bacteria with Different characteristics. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 27: 1303-1308 p.

Levett, P.N. 1990. *Anaerobic Bacteria a Functional Biology*. St Edmunds bury Press Ltd. Philadelphia. 116 p.

Maki, T. 2004. Aurace PSB and G2 for Nursery. *Matsumoto Institute of Microorganism Co.. Ltd*.

Melis, A. and Melnicki, M.R. 2006. Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31:1563-1573 p.

Nakada, E., Nishikata, S., Asada, Y. And Miyake, J. 1999. Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 24: 1053-1057 p.

Noparatnaraporn, N. and Nagai, S. 1986. Selection of *Rhudobacter sphaeroides* P47 as a useful Soruce of singer cell protein. J. Appl Gen. Microbiol 32: 351-359 p.

Olliver, B. 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol*. Rev. 58(1) : 27-38 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ormerod, J.C., Ormerod, K.S. and Gest, H. 1961. Light dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: relationship with nitrogen metabolism. *Arc. Biochem. Biophys*. 94: 449-463 p.

Pfenning, N. and Truper, H.G. 1989. Anoxygenic phototrophic bacteria, pp. 1635-1682. In J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and T.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology. Vol.3.* The William and Wilkins, Co., Baltimore.

Sasikala, K., Ramana, CH.V., Raghuveer, P. and Lovacs, K.L. 1993. Anoxygenic phototrophic bacteria : physiology and advances in hydrogen product technology, pp. 211-295. In S. Neidleman and A.I. Leskin (eds.). *Advances in Applied Microbiology. Vol. 38.* Academic Press, San Diego.

Sasikala, C. and Ramana, C.V. 1995. Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria I and II, pp. 173-227. In S.L. Neidleman and A.J. Laskin (eds.). *Advances Applied Microbiology. Vol. 41.* Academic Press, San Diego.

Sawada, H. and Rogers, P.L. 1977. Photosynthetic Bacteria in Waste Treatment: Mixed culture studies. *J. Ferment. Technol.* 55: 311-325 p.

Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfenning, N. and Holt, J.G. (eds.). 1994. *Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed.* The Williams and Wilkins, Co., Baltimore. 754 p

Van Niel, C. B. 1944. The culture, general physiology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol Rev* 8, 1-118.

Weaver, P. F., Wall, J. D., and Gest. 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulatus. Arch. Microbiol.* 207–216 p.

Yetis, M., Gunduz, U., Eroglu, I., Yucel, M. and Turker, L. 2000. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int. J. Hydrogen.Energy.* 25: 1035-1041 p.

Yongzhen T. and Yaanling H. 2008. Characteristics of a new Photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *International journal of hydrogen* 33 : 963-973 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium of Ormerod</u> (Ormerod และคณะ, 1961) ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เติมวิตามิน 4 ชนิดคือ ไธอามิน ไบโอติน กรดนิโคตินิค และกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

K_2HPO_4	0.9	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.6	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 .7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2 . 2H_2O$	75.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$FeSO_4 . 7 H_2O$	11.8	มิลลิกรัมต่อลิตร
EDTA. 2Na	20.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
p-aminobenzoic acid	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Thiamine HCl	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Biotin	15.0	ไมโครกรัมต่อลิตร
Nicotinic acid	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Trace element	1.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

Trace element ที่ใช้คือ

H_3BO_3	280.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4 . 4H_2O$	210.0	มิลลิกรัม
$Na_2MoO_2 . 2H_2O$	75.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4 .7H_2O$	24.0	มิลลิกรัม
$Cu(NO_3)_2.3H_2O$	4.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน จะเปลี่ยนแปลงตามวัตถุประสงค์ของการทดลองแต่ละครั้ง พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral Salts-Succinate Broth and Agar Media (John, 2006) มีองค์ประกอบดังนี้

$MgSO_4.7H_2O$	0.33	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.33	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.05	กรัมต่อลิตร
Sodium succinate	1.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	1.0	กรัมต่อลิตร
0.02% $FeSO_4.7H_2O$ solution	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

Trace salts solution ที่ใช้คือ

$ZnSO_4.7H_2O$	19	มิลลิกรัมต่อลิตร
$MnCl_2.4H_2O$	3	มิลลิกรัมต่อลิตร
H_3BO_3	30	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CoCl_2.6H_2O$	20	กรัมต่อลิตร
$CuCl_2.2H_2O$	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
$NiCl_2.6H_2O$	2	มิลลิกรัมต่อลิตร
Na_2MoO_4	3	มิลลิกรัมต่อลิตร

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium (Noparatnaraporn และ Nagai, 1986)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงทั่วไป มีองค์ประกอบดังนี้

KH_2PO_4	0.33	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.33	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.05	กรัมต่อลิตร
Sodium succinate	1.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	0.02	กรัมต่อลิตร

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8-7.2

อาหารเลี้ยงเชื้อ RCV medium (Weaver และคณะ, 1975)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง มีองค์ประกอบดังนี้

$(NH_4)_2SO_4$	7.5	mM
D,L malate	30	mM
$FeSO_4$	43	µM
$MgSO_4$	0.8	mM
$CaCl_2$	0.5	mM
Thiamine-HCl	3	µM
EDTA	61	µM
Potassium phosphate	10	mM

Trace element (Mn, Borate, Cu, Zn and Mo)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวัดการเจริญของแบคทีเรีย (เสาวนีย์, 2549)

1. Turbidity method (การวัดความขุ่น)

เป็นการสังเกตความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียใน suspension โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า spectrophotometer โดยใช้หลักการฉายแสงผ่านสารละลายเซลล์ของแบคทีเรีย แสงส่วนหนึ่งจะถูกเซลล์แบคทีเรียดูดซับไว้ ซึ่งปริมาณแสงที่ถูกดูดซับไว้นี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับขนาดของเซลล์หรือจำนวนแบคทีเรีย กล่าวคือเซลล์แบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่จะดูดซับแสงไว้ได้มากกว่าเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า หรือสารละลายเซลล์ที่มีแบคทีเรียจำนวนมากจะสามารถดูดซับแสงไว้ได้มากกว่าสารละลายเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์น้อยกว่า การวัดปริมาณการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธีนี้อาจกล่าวได้ว่าดูจากความขุ่นของสารละลายเซลล์นั่นเอง ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้สะดวกและรวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือเป็นการนับเซลล์แบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าแบคทีเรียนั้นมีชีวิตหรือไม่

2. วิธีวัดหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

วิธีนี้เป็นการวัดการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำหนักของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยนำสารละลายเซลล์ของแบคทีเรียไปทำให้แห้ง และต้องไม่ให้มีสารอื่นๆ เจือปนมาด้วย ตามปกติแล้วสารละลายเซลล์ที่จะนำมาหาน้ำหนักแห้งของเซลล์นั้นจะต้องมีเซลล์แบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก วิธีนี้นิยมใช้มากในงานวิจัยทางจุลชีววิทยา

3. การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (cell count)

การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทำได้หลายวิธี เช่น การนับจำนวนเซลล์โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ (direct microscopic count) อาจใช้วิธีของ Breed (Breeds method) ซึ่งใช้นับจำนวนแบคทีเรียในน้ำนม โดยกระจายสารละลายเซลล์ของเซลล์ที่ทราบปริมาตรแน่นอนบนพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ทิ้งให้แห้งและย้อมสีเมทิลีนบลู ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ และคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ถ้าทราบเส้นผ่าศูนย์กลางของ microscopic field คำนวณพื้นที่ของ microscopic field = πr^2 อีกวิธีหนึ่งใช้สไลด์แบบ Petroff-Hausser counting chamber เป็นสไลด์พิเศษที่ทราบพื้นที่ ข้อดีของวิธีนี้คือ สะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือมากและยังศึกษารูปร่าง ลักษณะของแบคทีเรียได้ด้วย ส่วนข้อเสียคือ เซลล์แบคทีเรียที่นับได้มีทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต และถ้าจำนวนแบคทีเรียมีน้อยเกินไป การนับโดยวิธีนี้อาจไม่ได้ผลดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (plate count)

การนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อทำได้โดยใส่สารละลายเซลล์ของแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ และเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวและอุ่นแล้วลงในจาน ทำให้เชื้อ และอาหารกระจายทั่วกัน โดยหมุนจานเพาะเชื้อไปมา เมื่อทิ้งให้อาหารแข็ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับเชื้อนั้นๆ ประมาณ 48 ชั่วโมง เมื่อแบคทีเรียแต่ละเซลล์เจริญเติบโตมากขึ้นจนกลายเป็นโคโลนีที่มองเห็นได้ นับจำนวนโคโลนี โดยถือว่าแต่ละโคโลนีเจริญมาจากเซลล์เซลล์เดียว การนับโคโลนีจึงเป็นการนับเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น บางครั้งจะทำให้สารละลายเซลล์เจือจางก่อน การทำให้เจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่นับอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี ซึ่งเป็นค่าที่เชื่อถือได้ การตรวจนับอาจนับด้วยตาเปล่าหรือใช้เครื่องช่วยนับโคโลนี(colony counter) ซึ่งมีเลนส์ช่วยขยายภาพทำให้เห็นชัด หรือเครื่องช่วยนับอิเล็กทรอนิคส์ ซึ่งเพียงวางจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนี จะมีเครื่องนับอัตโนมัติรายงานผลออกมาเป็นตัวเลข

5. การนับจำนวนแบคทีเรียบนเยื่อกรอง (membrane-filter count)

การนับจำนวนแบคทีเรียบนเยื่อกรอง สามารถทำได้โดยใช้เยื่อกรองที่ทราบขนาดของรูและรูนั้นเล็กพอที่จะกรองและดักจุลินทรีย์ไว้ได้ วิธีนี้มีประโยชน์มากในการนับจำนวนแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างปริมาณมาก เมื่อกรองตัวอย่างนั้นแล้ว จึงนำแผ่นเยื่อกรองที่มีแบคทีเรียติดอยู่วางบนกระดาษซับที่ชุบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม อาจใช้อาหารพิเศษและสี เพื่อช่วยให้เห็นความแตกต่างระหว่างโคโลนีของเชื้อที่เจริญ หลังจากบ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสมจุลินทรีย์จะเจริญเป็นโคโลนีบนผิวของเยื่อกรอง เลือกนับโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการ

6. การวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดจากปริมาณไนโตรเจน

องค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์คือโปรตีน ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบดังนั้นจึงสามารถวัดประชากรของแบคทีเรียได้จากปริมาณไนโตรเจน โดยทั่วไปแบคทีเรียที่มีไนโตรเจนประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง การวัดการเจริญโดยวิธีนี้ต้องล้างเซลล์สะอาดปราศจากอาหารที่อาจติดมากับเซลล์ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีทางเคมีซึ่งวิธีนี้ใช้แรงงานมากและต้องใช้เซลล์แบคทีเรียจึงไม่เหมาะสมสำหรับการวัดการเจริญของจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการทั่วๆ ไป แต่เหมาะสำหรับการวิจัยทางจุลชีววิทยาเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การวัดกิจกรรมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในด้านต่างๆ

เมื่อนำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหาร มันจะมีการใช้สารอาหารไปและสร้างสารใหม่เกิดขึ้น ปริมาณการใช้สารและการสร้างผลผลิตใหม่ จะเป็นสัดส่วนกับปริมาณของเซลล์ คือถ้ามีการใช้สารมากไป และสร้างผลผลิตใหม่มาก แสดงว่ามีปริมาณของเซลล์มาก เช่น การสร้างกรดหรือก๊าซจากกระบวนการหมัก วิธีนี้แม้จะไม่ได้นับจำนวนเซลล์โดยตรง แต่ก็เป็นวิธีวัดการเจริญทางอ้อมว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์มากน้อยเพียงใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้