

แบบที่เรียงเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถันจากเอกทิวเทตสลัดจ์เพื่อการย่อยสลายดีเซล



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHOTOSYNTHETIC PURPLE NON-SULFUR BACTERIA
FROM ACTIVATED SLUDGE FOR DIESEL DEGRADATION

Miss Chunsumon Booncharoen



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	แบบคดีเรียงสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน
	จากแอกทิเวเทดสลัดจ์เพื่อการย่อยสลายดีเซล
โดย	นางสาวชื่นสมน บุญเจริญ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุทัย ภิญญาคง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิววรรณ พูลพันธ์)

5572223323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: PURPLE NON-SULFUR BACTERIA,PHOTOSYNTHETIC BACTERIA, ACTIVATED SLUDGE,DIESEL DEGRADATI

CHUNSUMON BOONCHAROEN: PHOTOSYNTHETIC PURPLE NON-SULFUR BACTERIA FROM ACTIVATED SLUDGE FOR DIESEL DEGRADATION. ADVISOR: ASST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Ph.D., 86 pp.

Ninety-eight isolates of purple non-sulfur bacteria (PNSB) have been isolated from activated sludge from wastewater treatment by enrichment method under light microaerophilic photoheterotrophic condition. PNBS strain AS85 could degrade 1% diesel under chemoheterotrophic condition $88.28 \pm 1.53\%$ within 14 days whereas control diesel was reduced only $21.87 \pm 4.04\%$. Bacterial cell number started from 8 log CFU/ml and remained 9 log CFU/ml until the end of experiment. AS85 could not utilize diesel under photoheterotrophic condition but could degrade 2, 3 and 5% diesel for $51.96 \pm 1.05\%$, $43.59 \pm 2.41\%$ and $30.28 \pm 4.17\%$, respectively. AS85 together with indigenous microorganisms could reduce 1% diesel in freshwater from Rungsit canal for $79.68 \pm 1.58\%$ as well as BOD COD to 44.23% and 87.78%, respectively within 14 days. AS85 grown under chemoheterotroph or photoheterotroph contained *pufM* gene and could be detected by PCR. 16S rDNA sequence analysis revealed that AS85 showed the highest similarity (99%) to *Rhodopseudomonas palustris* ATCC 17003.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Industrial Microbiology

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ โอกาส คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ ส่งเสริมให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ด้วยดี นอกจากนี้ยังให้คำสอนและทัศนคติที่มีคุณค่าซึ่งสามารถนำไปปรับใช้ในการดำเนินชีวิตต่อไปได้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชริตา อัครจรัสญา รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณทัย ภิญญาคง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิววรรณ พูลพันธ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และตรวจรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ดร.จิรภัทร จันทมาลี พี่น้องๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือในหลายๆด้านแก่ข้าพเจ้า

ท้ายสุดนี้ขอขอบคุณบิดา-มารดา และสมาชิกในครอบครัว ที่คอยสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกด้าน และเป็นแรงใจที่ดีเสมอมา จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ฎ
สารบัญตาราง.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม	5
2.1 ปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน.....	5
2.2 ดีเซล (Diesel).....	5
2.3 การปนเปื้อนของปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและดีเซล.....	8
2.4 การบำบัดปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและดีเซลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม	9
2.5 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic Bacteria).....	11
2.5.1 Oxygenic photosynthetic bacteria.....	12
2.5.2 Anoxygenic photosynthetic bacteria.....	12
2.6 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur bacteria, PNSB).....	14
2.7 ยีน <i>pufM</i>	15
2.8 ประโยชน์ของแบคทีเรียในกลุ่ม PNSB.....	15
2.9 รายงานการใช้ PNSB ในการบำบัดน้ำเสีย.....	18

2.10 แอททิเวเทดสลัดจ์ (Activated sludge, AS).....	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย	21
3.1 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (PNSB) จากแอททิเวเทดสลัดจ์	25
3.1.1 การเก็บตัวอย่าง	25
3.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (PNSB)	26
3.2 การเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษาแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (PNSB).....	26
3.2.1 การเพาะเลี้ยงด้วยภาวะ photoheterotroph.....	26
3.2.2 การเพาะเลี้ยงด้วยภาวะ chemoheterotroph	27
3.3 การคัดกรอง PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลได้.....	27
3.3.1 การคัดกรอง PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลเบื้องต้น	27
3.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของ PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลสายพันธุ์เดียว	27
3.4 ประสิทธิภาพของ PNSB สายพันธุ์เดียวในการย่อยสลายดีเซล	28
3.4.1 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ chemoheterotroph.....	28
3.4.2 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ photoheterotroph	28
3.4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์	29
3.4.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	30
3.4.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนทรินและไพรีนของ PNSB สายพันธุ์เดียว	30
3.4.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs (ไพรีนและพีแนนทริน)	30
3.4.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs (ไพรีนและพีแนนทริน) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี	31
3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง.....	31
3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	31

3.5.2	พิสูจน์ยืนยันการเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยการเพิ่มจำนวนยีน <i>pufM</i>	32
3.5.2.1	สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNAzol®Direct	32
3.5.2.2	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>pufM</i> ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	32
3.5.2.3	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	33
3.5.3	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ PNSB สายพันธุ์เดียวโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA	33
3.6	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ PNSB ในน้ำจืด	34
3.7	การวิเคราะห์ปริมาณดีเซลและน้ำมันชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี.....	34
3.7.1	การสกัดดีเซลและน้ำมันชนิดต่างๆจากอาหารเหลว ดัดแปลงจาก Luepromchai และคณะ (2007).....	34
3.7.2	การวิเคราะห์ปริมาณดีเซลและน้ำมันชนิดต่างๆ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี.....	35
3.8	การคำนวณปริมาณดีเซล ไบโอดีเซล (B100) แก๊สโซฮอล์ E20 E85 G91 G95 และเบนซิน ULG95	35
บทที่ 4	ผลการทดลอง.....	36
4.1	การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (PNSB) จากแอณฑิเวเขตสลัดจ์.....	36
4.1.1	การเก็บตัวอย่าง	36
4.1.2	การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (PNSB)	36
4.2	การคัดกรอง PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลได้.....	39
4.2.1	การคัดกรอง PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลเบื้องต้น.....	39
4.2.2	การคัดแยก PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลสายพันธุ์เดียว.....	39
4.3	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ AS85 ในการย่อยสลายดีเซล.....	42
4.3.1	ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ chemoheterotroph.....	42

4.3.2 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ photoheterotroph	43
4.3.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์	44
4.3.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1%	46
4.3.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีนของ PNSB สายพันธุ์ AS85.....	46
4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ AS85	48
4.4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	48
4.4.2 พิสูจน์ยืนยันการเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยการเพิ่มจำนวนยีน <i>pufM</i>	50
4.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 โดยการใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA.....	51
4.5 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลของแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 ในน้ำจืด	53
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	55
รายการอ้างอิง	62
ภาคผนวก ก.....	71
ภาคผนวก ข.....	74
ภาคผนวก ค.....	76
ภาคผนวก ง	77
ภาคผนวก จ.....	78
ภาคผนวก ฉ.....	79
ภาคผนวก ช.....	81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	86

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดง (a) <i>Thermochromatium tepidum</i> (b) <i>Rhodobaca bogoriensis</i>	14
รูปที่ 4.1 แสดงการเพาะเลี้ยง PNSB ในสภาวะ photoheterotroph	37
รูปที่ 4.2 สีของ PNSB ในอาหารเหลว RCVB ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะ photoheterotroph.....	37
รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของ PNSB (สีแดง) เมื่อคัดแยกด้วยวิธี Spread plate.....	38
รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของ PNSB เมื่อคัดแยกด้วยวิธี Streak plate	38
รูปที่ 4.5 ลักษณะน้ำเลี้ยงเชื้อของ PNSB ในสภาวะ chemoheterotroph ในอาหารเหลว LB ระยะเวลา 7 วัน.....	40
รูปที่ 4.6 ลักษณะน้ำเลี้ยงเชื้อของ PNSB ในสภาวะ chemoheterotroph ในอาหาร minimum RCVB ที่เติม LB 10 เปอร์เซ็นต์ และ 0.5% ดีเซล ระยะเวลา 2-7 วัน ในขั้นปรับภาวะของเชื้อ PNSB จำนวน 3 ครั้ง	40
รูปที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 และความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล	42
รูปที่ 4.8 ปริมาณดีเซลที่เหลือในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในสภาวะ photoheterotroph.....	43
รูปที่ 4.9 การย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลว minimum RCVB โดย PNSB สายพันธุ์ AS85 ในสภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน.....	45
รูปที่ 4.10 การเจริญที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลว minimum RCVB โดย PNSB	45
รูปที่ 4.11 ปริมาณ PAHs ที่เหลือในการทดสอบการย่อยสลายพีแนนทรีนและไพรีน โดยสายพันธุ์ AS85 ในสภาวะ chemoheterotroph.....	47
รูปที่ 4.12 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง RCVB	49
รูปที่ 4.13 ลักษณะเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์ AS85 ในอาหารเหลว RCVB ภายใต้อาหาร photoheterotroph.....	49
รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ chemoheterotroph (ก) และแบบ photoheterotroph (ข).....	49

รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 ในอาหาร semisolid medium.....	50
รูปที่ 4.16 ผลิตรหัส PCR จากการเพิ่มจำนวนยีน <i>pufM</i> ของสายพันธุ์ AS85 ที่เลี้ยงในภาวะ photoheterotroph (AS85P) และภาวะ chemoheterotroph (AS85A)....	51
รูปที่ 4.17 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน บริเวณ 16S rDNA ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 กับแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง.....	52
รูปที่ ง.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 (Growth Curve) ในอาหาร RCVB ภาวะ photoheterotroph.....	77
รูปที่ ง.2 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 (Growth Curve) ในอาหาร TSB ภาวะ chemoheterotroph.....	77
รูปที่ ข.1 GC โครมาโตแกรม 1% ดีเซล ย่อยสลายโดยสายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph วันที่ 0 (ก) และวันที่ 1 (ข).....	81
รูปที่ ข.2 GC โครมาโตแกรม 1% ดีเซล ย่อยสลายโดยสายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph วันที่ 14.....	82
รูปที่ ข.3 GC โครมาโตแกรมไบโอดีเซล B100.....	82
รูปที่ ข.4 GC โครมาโตแกรมเบนซิน E20.....	83
รูปที่ ข.5 GC โครมาโตแกรมเบนซิน E85.....	83
รูปที่ ข.6 GC โครมาโตแกรมเบนซิน G91.....	84
รูปที่ ข.7 GC โครมาโตแกรมเบนซิน G95.....	84
รูปที่ ข.8 GC โครมาโตแกรมของเบนซิน ULG95.....	85

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 แสดงลักษณะและคุณภาพของดีเซลตามประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่อง กำหนดลักษณะและคุณภาพของดีเซล พ.ศ.2556	7
ตารางที่ 3.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ <i>pufM</i> (229bp) ...	25
ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลตัวอย่างตะกอนและไอโซเลตที่คัดแยกได้	38
ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของกลุ่ม PNSB ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน.....	41
ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของแต่ละไอโซเลตในกลุ่ม G4AS ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน.....	41
ตารางที่ 4.4 การย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1% ในอาหารเหลว minimum RCVB เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85	46
ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 กับฐานข้อมูลใน NCBI โดยใช้โปรแกรม MEGA7	52
ตารางที่ 4.6 % การลดลงของพารามิเตอร์ต่างๆ และ 1% ดีเซล ในการทดสอบการย่อย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ ในภาวะ chemoheterotroph.....	54
ตารางที่ ฉ.1 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 และความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในภาวะ chemoheterotroph.....	79
ตารางที่ ฉ.2 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในภาวะ photoheterotroph	79
ตารางที่ ฉ.3 การย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ และการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเหลว minimum RCVB ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน.....	80
ตารางที่ ฉ.4 การลดลงของพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบการย่อย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำ จากคลองรังสิตประยูรศักดิ์.....	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ดีเซลเป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นการพัฒนาอุตสาหกรรมและการคมนาคมขนส่ง จึงส่งผลให้ดีเซลกลายเป็นหนึ่งในมลพิษอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในสภาพแวดล้อม (Baldawi และคณะ, 2013) โดยทั่วไปดีเซลมีความเป็นพิษสูงกว่าน้ำมันดิบ เนื่องด้วยความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักสูงกว่าน้ำมันดิบ ไฮโดรคาร์บอนในดีเซลประกอบด้วยอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbons) และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbons) (Lohi และคณะ, 2008) ด้วยองค์ประกอบดังกล่าวทำให้การปนเปื้อนดีเซลในสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของดีเซลเองก่อให้เกิดความเป็นพิษต่ออากาศ ดิน และแหล่งน้ำ ส่งผลกระทบต่อห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต และสุขภาพของมนุษย์ เช่น เป็นพิษต่อระบบทางเดินหายใจ ปอด และเมื่อสัมผัสเป็นเวลานานอาจเพิ่มความเสี่ยงของโรคมะเร็ง (Chilcott และ Hq, 2011)

ปัจจุบันปัญหามลพิษทางแหล่งน้ำเนื่องจากการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (petroleum hydrocarbon) จัดเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมากในหลายพื้นที่ทั่วโลก เนื่องจากสมบัติความไม่ชอบน้ำของดีเซลก่อให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อมทั้งบนบกและในน้ำ (Mahalingam และ Sampath, 2014, Nwinyi และคณะ, 2014) ทำให้เกิดผลกระทบต่อความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติ ระบบนิเวศทั้งในน้ำและบนบก ตลอดจนเศรษฐกิจของประเทศตามมา ดังนั้นการปนเปื้อนมลพิษในแหล่งน้ำจึงกลายเป็นปัญหาที่รุนแรงในหลายๆ ประเทศ (Moreira และคณะ, 2011) การปนเปื้อนของดีเซลสู่สิ่งแวดล้อมมักเกิดขึ้นในระหว่างการขนส่ง อุบัติเหตุจากการคมนาคมขนส่งรวมทั้งการปนเปื้อนจากอุตสาหกรรม (Moreira และคณะ, 2011, Nwinyi และคณะ, 2014) ประเทศไทยเป็นอีกหนึ่งประเทศที่ประสบกับปัญหาการปนเปื้อนดีเซลในแหล่งน้ำเนื่องจากอัตราการขยายตัวอย่างรวดเร็วของอุตสาหกรรมและการคมนาคม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การคมนาคมขนส่งทางน้ำ อาทิ การเดินเรือ การขนถ่ายสินค้า การถ่ายเทน้ำมันไปยังโรงกลั่น หรือแม้แต่การทิ้งน้ำมัน ส่งผลให้บริเวณปากแม่น้ำของประเทศไทยมีการปนเปื้อนของน้ำมันในบริเวณกว้าง เช่น บริเวณปากน้ำเจ้าพระยา เกาะสีชังอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ท่าเรือแหลมฉบัง และมาบตาพุด จังหวัดระยอง (Wattayakorn, 2012)

ในปัจจุบันกระบวนการบำบัดดีเซลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพดี คือ กระบวนการทางกายภาพ กระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ โดยกระบวนการ

ย่อยสลายทางชีวภาพ (Bioremediation) เป็นกระบวนการที่นิยมใช้ที่สุด Bioremediation ใช้ประโยชน์จากกิจกรรมของจุลินทรีย์หรือพืชเพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม โดยที่สารพิษนั้นๆ ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Mahalingam และ Sampath, 2014, Prathiba และคณะ, 2014) การบำบัดทางชีวภาพจัดเป็นกระบวนการที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ต้นทุนต่ำ และไม่ก่อให้เกิดของเสียภายหลังกระบวนการบำบัด (secondary waste) จึงเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในการบำบัดมลพิษจากดีเซล (Peixoto และคณะ, 2011, Yu และคณะ, 2011, Sharma และคณะ, 2014)

ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการบำบัดมลพิษจากดีเซลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพอยู่จำนวนไม่น้อย ดังเช่น Chan (2011) ได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ร่วมกับไส้เดือนดิน (nematodes) พบว่า ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (Total Petroleum Hydrocarbons, TPH) ลดลงจาก 15,900 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเพียง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังจากผ่านกระบวนการบำบัดทางชีวภาพที่มีการเติมอากาศเป็นเวลา 64 วัน Dussán และ Numpaque (2012) คัดแยกแบคทีเรียจากบริเวณเหมืองถ่านหินที่มีการใช้ Ammonium Nitrate Fuel Oil (ANFO) ได้สองสายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas* sp. และ *Pseudomonas stutzeri* ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ 10-95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงในรูปแบบเชื้อเดี่ยว และย่อยสลายดีเซลได้ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองในรูปแบบเชื้อรวม และ Prathiba และคณะ (2014) รายงานว่า *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ KEB24 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่จอตรมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลสูงที่สุดถึง 95 เปอร์เซ็นต์

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (Purple non-sulfur bacteria, PNSB) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic Bacteria, PSB) มีลักษณะโคโลนีสี ส้ม แดง จนถึงน้ำตาล (Madigan และ Jung, 2009) PNSB สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีแสงไม่มีอากาศหรือโฟโตออโตโทรฟ (Photoautotroph) หรือสภาวะที่ไม่มีแสงแต่มีอากาศแบบคีโมเฮเทโรโทรฟ (Chemoheterotroph) จากสมบัติดังกล่าวทำให้สามารถพบแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถันได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งแหล่งน้ำธรรมชาติต่างๆ แหล่งน้ำจืด แหล่งน้ำเค็ม ตะกอนดินที่ขึ้น พุงนา หรือแม้แต่แหล่งน้ำสกปรก รวมทั้งตะกอนเร่งจากระบบบำบัดน้ำเสีย (Bianchi และคณะ, 2010, Madukasi และคณะ, 2010, Madukasi และคณะ, 2011) ภายใต้อากาศ PNSB สามารถใช้สารอินทรีย์ต่างๆ หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตได้ (Kornochalert และคณะ, 2014) ดังนั้น PNSB จึงเป็นแบคทีเรียหลักกลุ่มหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ตั้งแต่ ปี 1960 ได้มีการรายงาน

ความสามารถในการบำบัดน้ำเสียของ PNSB เช่น การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันมะกอก น้ำมัน ถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม แคลเซียม และ ฟาร์มกุ้ง ผลการศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการกำจัด COD (Chemical Oxygen Demand) ฟอสเฟต ไนเตรต และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Wu และคณะ, 2012, Lu และคณะ, 2013, Hulsen และคณะ, 2014) และมีรายงานการใช้ PNSB เพื่อบำบัดน้ำเสียอย่างต่อเนื่องเช่น Madukasi และคณะ (2010) ได้คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ Z08 จากดินซึ่งสามารถลดค่า COD ของน้ำเสียจากบริษัทฯ ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ จากค่า COD เริ่มต้น 9,450 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 วัน Lu และคณะ (2013) รายงานความสามารถของ *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ 1.2174 ถึงความสามารถในการลดค่า COD ของน้ำเสียได้ถึง 99.3 เปอร์เซ็นต์ จากค่า COD เริ่มต้น 8,000-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยระบบบำบัดแบบ membrane bioreactor Hulsen และคณะ (2014) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB ในการบำบัดน้ำเสียจากชุมชนในภาวะไร้อากาศ พบว่าสามารถลดค่า COD ได้ประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนโตรเจน ($\text{NH}_4\text{-N}$) 99.6 เปอร์เซ็นต์ และฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส ($\text{PO}_4\text{-P}$) 88.8 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากค่าตั้งต้นเดิม 526 มิลลิกรัมต่อลิตร 46 ± 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6.2 ± 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงยังถูกนำมาใช้ประโยชน์ด้านอื่นอีกมากมาย เนื่องจากไม่เป็นพิษและไม่ก่อให้เกิดอันตราย เช่น ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโปรตีน (single cell protein) ไบโพลิเมอร์ (biopolymers) ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial agents) สารประกอบในการบำบัดโรค ใช้เป็นอาหารสำหรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Wu และคณะ, 2012) และช่วยส่งเสริมความสามารถในการเผาผลาญอาหารของจุลินทรีย์ในดินส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย (Wu และคณะ, 2013)

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (Activated Sludge Process) เป็นระบบบำบัดน้ำเสียที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นระบบบำบัดที่ไม่ซับซ้อน การจัดการระบบเป็นไปได้ง่ายกว่าระบบอื่น และสามารถบำบัดน้ำเสียได้หลากหลายชนิด หลักการทำงานของระบบโดยทั่วไปประกอบด้วยสองส่วนคือ บ่อเติมอากาศ (Aeration Tank) และบ่อตกตะกอน (Sedimentation Tank) มีหลักการสำคัญคือการนำตะกอนบางส่วนจากบ่อตกตะกอนกลับไปเป็นหัวเชื้อในการบำบัดครั้งต่อไปโดยผ่านจุดที่เรียกว่า จุดรีเทิร์นสลัดจ์ ส่วนตะกอนอีกส่วนหนึ่งไหลออกจากระบบเพื่อการกำจัดต่อไป (Seviour และ Nielsen, 2010) ตะกอนของระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งหรือ แอ็กทีเวทสลัดจ์ (Activated sludge, AS) เป็นตะกอนดินที่ประกอบไปด้วยกลุ่มของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย รา อาร์เคีย อาจรวมไปถึงไวรัสด้วย (Seviour และ Nielsen, 2010)

โดยแบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากที่สุด (Zhang และคณะ, 2012) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจัดเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่พบบ่อยในแอกทิเวเทดสลัดจ์และตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียชนิดอื่น มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง จาก Liang และคณะ (2010) ที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถันจากแอกทิเวเทดสลัดจ์ได้ถึง 4 สายพันธุ์ คือ *Rhodopseudomonas palustris* CC1 CC7 G11 และ GE1 ต่อมา Schott และคณะ (2010) สามารถคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 2 สายพันธุ์ คือ *Thiocapsa* sp. สายพันธุ์ KS1 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ LQ17 จากตะกอนของโรงบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศจากเมืองคอนสแตนซ์ประเทศเยอรมนี และ Laocharoen และ Reungsang (2014) คัดแยก *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ KKU-PS5 ได้จากตะกอนสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสียชนิด Upflow anaerobic sludge blanket (UASB)

จากความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษสูงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Lu และคณะ, 2013) ส่งผลให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถันได้รับความสนใจในการศึกษาถึงความสามารถในการบำบัดน้ำเสียมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงนั้นยังไม่มี งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงที่ไม่สะสมก้ำมะถันจากแอกทิเวเทดสลัดจ์และนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถันที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในน้ำจากแอกทิเวเทดสลัดจ์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถันจากแอกทิเวเทดสลัดจ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

น้ำมันดิบ (crude oil) มีลักษณะเป็นของเหลวสีดำ เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากการทับถมกันของอินทรีย์สารในชั้นหินทั้งบนบกและในทะเล มีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดนั้นๆ ประกอบไปด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทั้งแบบอะลิฟาติก และ อะโรมาติก และสารประกอบอื่นๆ เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน และกำมะถัน ร่วมด้วย (Tyagi และคณะ, 2011) เมื่อเข้าสู่กระบวนการกลั่นให้บริสุทธิ์จะได้ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมชนิดต่างๆ แบ่งตามจุดเดือดของสารนั้นๆ เช่น ที่จุดเดือดต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียสได้ก๊าซหุงต้มเป็นผลิตภัณฑ์ ที่จุดเดือด 30-36 องศาเซลเซียสได้น้ำมันเบนซิน 170-250 องศาเซลเซียสได้น้ำมันก๊าด 250-340 องศาเซลเซียสได้น้ำมันดีเซล และได้น้ำมันเตาเป็นผลิตภัณฑ์เมื่อจุดเดือดสูงกว่า 500 องศาเซลเซียส ฯลฯ โดยกระบวนการกลั่นน้ำมันอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับคุณภาพของน้ำมันดิบและคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (ปิยนุช นาคพงศ์, 2555, การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ฝ่ายจัดการเชื้อเพลิง, 2559)

2.2 ดีเซล (Diesel)

ดีเซล คือ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมที่ได้จากการกลั่นลำดับส่วนของน้ำมันดิบ ประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ซับซ้อนตั้งแต่ C_8 - C_{26} (Ameen และคณะ, 2016) ในรูปแบบอะลิฟาติกประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ และ อะโรมาติกประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ มีจุดเดือดอยู่ที่ 160-360 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวไวไฟ จุดวาบไฟอยู่ระหว่าง 23-61 องศาเซลเซียส มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง (Chilcott และ Hq, 2011) ดีเซลแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ดีเซลหมุนเร็ว (Automotive diesel oil) หรือน้ำมันโซล่า หรือในกิจการเดินเรือเรียกว่า มารีนแก๊สออยล์ (Marine Gas Oil, MGO) เป็นน้ำมันที่ทางรัฐบาลไทยกำหนดให้มีค่าซีเทนอย่างต่ำ 50 ดีเซลหมุนเร็วถูกนำไปใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลหมุนเร็วที่มีความเร็วตั้งแต่ 1,000 รอบต่อนาทีขึ้นไป ได้แก่ รถยนต์เครื่องยนต์ดีเซล รถบรรทุก รถแทรกเตอร์ เครื่องกำเนิดไฟฟ้าในเรือเดินสมุทร เป็นต้น (กรมธุรกิจพลังงาน, 2556) และดีเซลหมุนช้า (Industrial diesel oil) หรือน้ำมันซีไล์ หรือในกิจการเดินเรือเรียกว่า มารีนดีเซลออยล์ (Marine Diesel Oil, MDO) เป็นน้ำมันที่รัฐบาลไทยกำหนดให้มีค่าซีเทนอย่างต่ำ 45 ใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลหมุนปานกลางและ

หมุนซ้ำ โดยทั่วไปต่ำกว่า 1,000 รอบต่อนาที เช่น เครื่องยนต์ดีเซลขนาดใหญ่ที่ใช้กับเรือประมง เรือโดยสาร และเครื่องกำเนิดไฟฟ้าขนาดใหญ่ เป็นต้น (กรมธุรกิจพลังงาน, 2556) ดีเซลที่ใช้ในประเทศไทยจะต้องมีคุณลักษณะตามข้อกำหนดของกรมธุรกิจพลังงาน แสดงดังตาราง ที่ 2.1 จากข้อมูลข้างต้นทำให้ดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวันของมนุษย์และอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ดีเซลจะเป็นเชื้อเพลิงที่ใช้กันอย่างแพร่หลายตั้งแต่การคมนาคมขนส่งจนถึงเครื่องจักรขนาดใหญ่ แต่ก็ปฏิเสธไม่ได้ว่าดีเซลเป็นหนึ่งในมลพิษอินทรีย์ที่พบมากที่สุดใสภาพแวดล้อมด้วยเช่นกัน (Baldawi และคณะ, 2013, Jagtap และคณะ, 2014)

โดยทั่วไปดีเซลมีความเป็นพิษสูงกว่าน้ำมันดิบเนื่องจากมีความเข้มข้นของสารไฮโดรคาร์บอนสูงกว่าน้ำมันดิบ สารประกอบเหล่านี้มีความสามารถในการละลายน้ำสูงเมื่อเทียบกับไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ สามารถปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ดินได้ (Chan, 2011) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ดีเซลสามารถปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารระดับต่างๆ ส่งผลกระทบต่อกระบวนการชีวเคมีหรือสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือมะเร็งได้ (Prathiba และคณะ, 2014) เมื่อดีเซลเข้าสู่ร่างกายมนุษย์โดยการสัมผัส สูดดม หรือบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนดีเซลจะทำให้เกิดอาการเวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ระบบทางเดินหายใจระคายเคือง และรุนแรงถึงขั้นปอดอักเสบหากมีการสูดดมในปริมาณมาก และหากสัมผัสเป็นเวลานานอาจเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งผิวหนังได้ (Chilcott และ Hq, 2011) นอกจากนี้ไอระเหยของดีเซลยังมีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจทำให้ความสามารถในการละลายลิ้มเลือดหยุดชะงักเลือดจับตัวเป็นก้อนไม่สามารถไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจได้ ยิ่งไปกว่านั้นการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของซัลเฟอร์ (กำมะถัน) ในดีเซลยังก่อให้เกิดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) ออกสู่ชั้นบรรยากาศ (Bhatia และ Sharma, 2010) ทำปฏิกิริยากับไอน้ำหรือความชื้นกลายเป็นกรดกำมะถัน ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศและน้ำ เช่น ฝนกรด ปัจจุบันในประเทศไทยได้กำหนดให้ดีเซลมีส่วนประกอบของซัลเฟอร์น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 0.005 โดยน้ำหนักสำหรับดีเซลหมุนเร็ว และน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักสำหรับดีเซลหมุนช้า (กรมธุรกิจพลังงาน, 2556)

ตารางที่ 2.1 แสดงลักษณะและคุณภาพของดีเซลตามประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่อง กำหนดลักษณะและคุณภาพของดีเซล พ.ศ.2556

ข้อกำหนด	ชนิดน้ำมันดีเซล	
	ดีเซลหมุนเร็ว	ดีเซลหมุนช้า
ค่าความถ่วงจำเพาะ (ที่ 15.6 องศาเซลเซียส)	0.81-0.87	≤ 0.920
ค่าซีเทน หรือดัชนีซีเทน	≤50	≥ 45
ค่าความหนืด (cSt)		
- ที่ อุณหภูมิ 40 °C	1.8-4.1	≤ 8.0
- ที่ อุณหภูมิ 50 °C	-	≤ 6.0
จุดไหลเท (องศาเซลเซียส)	≥10	≤ 16
กำมะถัน (โดยน้ำหนัก%)	≥0.005	≤ 1.5
การกัดกร่อนแผ่นทองแดง	หมายเลข ≥ 1	-
Oxidation Stability (g/m3)	≤ 25	-
กากถ่าน (โดยน้ำหนัก%)	≥0.05	-
น้ำและตะกอน (โดยปริมาตร%)	≥0.05	≤ 0.3
เถ้า (โดยน้ำหนัก%)	≥0.01	≤ 0.02
จุดวาบไฟ (องศาเซลเซียส)	≤52	≥ 52
การกลั่น (องศาเซลเซียส)		
-อุณหภูมิของส่วนที่กลั่นได้โดยปริมาตรในอัตราร้อยละเก้าสิบ	≥357	-
สารประกอบ PAHs (%โดยน้ำหนัก)	≥11	-
สี*		
-ชนิดของสี	เหลือง	น้ำตาล
-ความเข้มของสี	≤4.0	4.5-7.5
ปริมาณไบโอดีเซลชนิดเมทิลเอสเทอร์ ของกรดไขมัน (%โดยปริมาตร)	4.5-5	-

* ดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ในประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่องกำหนดลักษณะและคุณภาพของดีเซล พ.ศ.2556

- ไม่ระบุข้อกำหนด

2.3 การปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและดีเซล

หากกล่าวถึงเชื้อเพลิงคงหลีกเลี่ยงไม่ได้ว่าเชื้อเพลิงที่สำคัญที่สุดก็คือ ปิโตรเลียมหรือน้ำมัน นั่นเอง ปัจจุบันปิโตรเลียมถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงหลักไม่ว่าจะในภาคอุตสาหกรรมหรือแม้แต่การดำเนินชีวิตของมนุษย์ (Alrumman และคณะ, 2015) เมื่อถูกนำไปใช้ในวงกว้างทำให้ปัญหาการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหามลพิษที่สำคัญมากในหลายพื้นที่ทั่วโลก ก่อให้เกิดผลกระทบทางด้านสิ่งแวดล้อมทั้งทางบกและในน้ำส่งผลกระทบต่อความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติ และกระทบต่อเศรษฐกิจ (Moreira และคณะ, 2011) ในทุกปีทั่วโลกจะเกิดการปนเปื้อนดีเซลลงสู่ดินและน้ำประมาณ 1.7 และ 8.8 ล้านตัน ตามลำดับ ซึ่ง 90 เปอร์เซ็นต์เกี่ยวข้องโดยตรงกับอุบัติเหตุและกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การระเบิดของท่อชุดเจาะน้ำมัน หรือการรั่วไหลจากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ โรงกลั่นน้ำมัน อุต่อเรือ รวมไปถึงการกำจัดของเสียโดยเจตนา และในการปนเปื้อนดังกล่าวเป็นการปนเปื้อนในแหล่งน้ำจืด 30 เปอร์เซ็นต์ การปนเปื้อนมลพิษในแหล่งน้ำกลายเป็นปัญหาที่รุนแรงในหลายๆ พื้นที่ทั่วโลก (Chan, 2011, Dadrasnia และ Agamuthu, 2013) ดังเช่น วันที่ 20 เมษายน ถึง 15 กรกฎาคม ค.ศ. 2010 เกิดการระเบิดของแท่นชุดเจาะดีฟวอเทอร์ฮอไรซัน ของบริษัท British Petroleum (BP) กลางทะเลห่างจากชายฝั่งเมืองพอร์ตออฟเวนิช รัฐหลุยเซียนาก่อให้เกิดน้ำมันดิบรั่วไหลลงอ่าวแม็กซิโกถึง 4.9 ล้านบาร์เรล (Goldstein และคณะ, 2011) เหตุการณ์ในครั้งนี้นับว่าเป็นหายนะต่อสิ่งแวดล้อมครั้งใหญ่ครั้งหนึ่งของโลก ในปี ค.ศ. 2011 Liu และคณะ รายงานการปนเปื้อนของดีเซลทั้งในน้ำและดินตะกอนจากห้วงฟู แม่น้ำแยงซีเกียง ซึ่งเป็นแหล่งศูนย์กลางการขนส่งและคมนาคมที่สำคัญของประเทศจีนซึ่งมีสาเหตุการปนเปื้อนจากน้ำที่ปล่อยออกมาจากเครื่องยนต์ (Liu และคณะ, 2011) ต่อมา เมื่อวันที่ 31 ตุลาคม 2011 Hupp Post San Francisco รายงานข่าวเรือจมในอ่าวที่โรดไอแลนด์ สาเหตุเกิดจากพายุหิมะเป็นผลทำให้ดีเซลปริมาณ 2,400 แกลลอน ไหลออกกระจายบนผิวน้ำ และในวันที่ 12 ธันวาคม 2011 พบการรั่วไหลของดีเซลบนผิวน้ำบริเวณอ่าวในซานฟรานซิสโกเนื่องจากถังเก็บน้ำมันเชื้อเพลิงรั่ว เป็นผลทำให้ดีเซลรั่วไหลถึง 1,700 แกลลอน สำหรับประเทศไทยซึ่งมีอัตราการเพิ่มขึ้นของอุตสาหกรรมบริเวณชายฝั่งและการขนส่งทางน้ำเป็นจำนวนมาก เช่น การขนถ่ายสินค้า การถ่ายเทน้ำมันไปยังโรงกลั่น และการคมนาคม (Wattayakorn, 2012) มีการรายงานจากกรมเจ้าท่าถึงภาวะการณั้ประสบปัญหาการรั่วไหลของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ระหว่างปี พ.ศ. 2516-2558 ประมาณ 239 ครั้ง เป็นการปนเปื้อนในน้ำจืดมากกว่า 100 ครั้ง ซึ่งในจำนวนการรั่วไหลทั้งหมด พบ 10 เหตุการณ์ที่มีปริมาณการรั่วไหลมากกว่า 20,000 ลิตร สาเหตุหลักของการปนเปื้อนเกิดจากอุบัติเหตุทางเรือ และกิจกรรมระหว่างการขนส่ง รวมไปถึงการลักลอบปล่อยทิ้งของมนุษย์เอง หรือแม้แต่การทิ้งน้ำมันจากเรือเดินสมุทร

ก่อให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมันต่อเนื่องยาวนาน (Wattayakorn, 2012) ดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันเตา และน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วเป็นชนิดของน้ำมันที่พบมากที่สุด และจากรายงานดังกล่าวพบว่าพื้นที่ชายฝั่งทะเลด้านตะวันออกบริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งของประเทศไทยมีการปนเปื้อนของน้ำมันในบริเวณกว้าง อาทิ บริเวณปากน้ำเจ้าพระยา เกาะสีชัง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ท่าเรือแหลมฉบัง และมาบตาพุด จังหวัดระยอง รวมไปถึงแม่น้ำเจ้าพระยาบริเวณท่าเทียบเรือต่างๆ เป็นพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนมากที่สุด

2.4 การบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและดีเซลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากดีเซลมีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการตกค้างของดีเซลในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นปัญหาที่ต้องได้รับการแก้ไขเพื่อรักษาไว้ซึ่งสภาวะแวดล้อมที่ปลอดภัย วิธีการบำบัดมลพิษจากการปนเปื้อนดีเซลหรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นในสิ่งแวดล้อมแบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ การบำบัดด้วยกระบวนการทางกายภาพ (physical process) อาจใช้กระบวนการทางธรรมชาติ เช่น การสลายตัวด้วยแสงอาทิตย์ (photooxidation) หรืออาศัยคุณสมบัติของสารที่ปนเปื้อน เช่น การใช้วัสดุดูดซับ (adsorption) การแยกของแข็งออกด้วยตะแกรง (screening) การเผาด้วยอุณหภูมิสูงเพื่อกำจัดสารระเหย และการชะล้างเป็นต้น วิธีต่างๆ สามารถกำจัดสารปนเปื้อนได้บางส่วนเท่านั้นและในบางวิธีอาจก่อให้เกิดสารมลพิษอื่น เช่น การเผาที่อาจก่อให้เกิดไดออกซินซึ่งเป็นมลพิษในอากาศ (Das และ Chandran, 2010, อลิสา วังไฉ, 2554) การบำบัดด้วยกระบวนการทางเคมี (chemical process) เป็นการบำบัดโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีของสารเคมีในการกำจัดหรือแยกสิ่งปนเปื้อน เป็นวิธีที่เห็นผลเร็วแต่อาจก่อให้เกิดสารมลพิษอื่นแทนและใช้ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง วิธีที่สามคือการบำบัดด้วยกระบวนการทางชีวภาพ คือการใช้ประโยชน์จากกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่นิยมใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้เป็นน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนมลพิษ Tyagi และคณะ (2011) กล่าวถึงความสามารถของจุลินทรีย์ว่า สามารถย่อยสลายองค์ประกอบของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ตามลำดับ ดังนี้ อัลเคนสายตรง (n-alkanes) > อัลเคนโซ่กิ่ง (branched alkenes) > สารประกอบอะโรมาติกชนิดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular-weight n-alkyl aromatics) > อัลเคนแบบวง (cyclic alkanes) > พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) > แอสฟัลทีนส์ (asphaltenes) อย่างไรก็ตาม วิธีการบำบัดด้วยกระบวนการทางชีวภาพมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ใช้ระยะเวลาในการบำบัดนานเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางในการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ และด้วยขีดจำกัดทางความสามารถของจุลินทรีย์บางชนิดทำให้บางครั้งจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการบำบัดอาจทำงานได้

ไม่ดีในบางพื้นที่ปนเปื้อน วิธีการทางชีวภาพจึงเป็นวิธีที่ต้องมีการพัฒนาอยู่เสมอ (Das และ Chandran, 2010) จะเห็นว่าทั้งสามวิธีต่างมีข้อดีและข้อจำกัดด้วยกันทั้งสิ้น ดังนั้นในบางกระบวนการอาจใช้มากกว่าหนึ่งวิธีเพื่อการบำบัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เช่น ใช้วิธีทางชีวภาพควบคู่ไปกับวิธีทางเคมี เป็นต้น (Megharaj และคณะ, 2011)

ในปัจจุบันกระบวนการบำบัดมลพิษที่เกิดจากปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนหรือน้ำมันด้วยวิธีทางชีวภาพเป็นที่ยอมรับมากขึ้นเนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในขณะที่มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานไม่มากนัก และไม่ก่อให้เกิดของเสียภายหลังกระบวนการบำบัด จึงเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม (Chan, 2011, Yu และคณะ, 2011) วิธีการบำบัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีทางชีวภาพแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ การบำบัดโดยการกระตุ้นทางชีวภาพ เป็นการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเติมสารอาหารหรือสารตั้งต้นหรือปรับสภาวะที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น การเติมออกซิเจน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส หรือสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ลงในพื้นที่ที่ต้องการบำบัดเพื่อส่งเสริมการเจริญและเพิ่มความสามารถในการใช้น้ำมันที่ปนเปื้อนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ในพื้นที่นั้นๆ (Tyagi และคณะ, 2011, Yu และคณะ, 2011) อีกวิธีหนึ่ง คือการบำบัดโดยการเติมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันลงไปในพื้นที่ปนเปื้อน (bioaugmentation) จุลินทรีย์ดังกล่าวได้ผ่านการคัดเลือกจากห้องปฏิบัติการแล้วว่ามีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ดี หรือมีสมบัติพิเศษอื่นๆ เช่น สามารถเจริญได้ในพื้นที่ที่มีความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนสูง โดยในการเติมจุลินทรีย์นั้น อาจใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยวหรือกลุ่มจุลินทรีย์ก็ได้ วิธีดังกล่าวนิยมใช้กับพื้นที่ที่ไม่มีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษ หรือมีในปริมาณน้อย (Tyagi และคณะ, 2011)

ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการบำบัดมลพิษจากปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนและดีเซลที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพอยู่จำนวนไม่น้อย อาทิ

Chan (2011) ได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ร่วมกับ nematodes พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการบำบัดทางชีวภาพที่มีการเติมอากาศ ในเวลา 64 วัน สามารถลดปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (Total Petroleum Hydrocarbons, TPH) TPH 15,900 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือเพียง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร การลดลงของ TPH เป็นสัดส่วนผกผันกับการเพิ่มขึ้นของจำนวน *Bacillus* sp. และ nematodes จึงกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์ส่งเสริมการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

Yu และคณะ (2011) พบว่ากระบวนการ biostimulation โดยการเติมไนโตรเจน คาร์บอน และฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ลงในดินบริเวณ Yellow River Delta ประเทศจีน ส่งผลให้กลุ่มจุลินทรีย์บริเวณนั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษของน้ำมันดิบในพื้นที่ดังกล่าว

Dussán และ Numpaquet (2012) พบแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas* sp. และ *Pseudomonas stutzeri* ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซล ซึ่งคัดแยกจากบริเวณเหมืองถ่านหินที่ใช้ Ammonium Nitrate Fuel Oil (ANFO) ซึ่งมีส่วนประกอบของดีเซลที่ใช้ในกระบวนการระเบิด ในประเทศโคลัมเบีย โดยเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดในรูปแบบเชื้อเดี่ยวจะสามารถย่อยสลาย 10% ดีเซล ได้ถึง 10-95 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดร่วมกันจะมีอัตราการย่อยสลายดีเซลถึง 96 เปอร์เซ็นต์

Mortazavi และคณะ (2013) พบว่า *Hydrocarboniphaga Pseudomonas* และ *Pseudoxanthomonas* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่พบมากที่สุดในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันในอ่าวเม็กซิโก

Palanisamy และคณะ (2014) คัดแยกแบคทีเรียในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนดีเซล ซึ่งค้นพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter baumannii* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซล

Maddela และคณะ (2015) คัดแยกแบคทีเรียจำนวน 2 สายพันธุ์ จากบริเวณพื้นที่ที่ปนเปื้อน crude oil บริเวณป่าดิบชื้นของอะเมซอน ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Bacillus thuringiensis* และราจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Geomyces pannorum* และ *Geomyces* sp. จุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์นั้นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย crude oil ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดการปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียมในพื้นที่ดังกล่าวได้

อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการค้นพบแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ย่อยสลายดีเซล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic Bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria; PSB หรือ Phototrophs หรือ Phototrophic bacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอต (Prokaryotes) มีความสามารถในการสังเคราะห์แสงหรือใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานได้ หากใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นแหล่งคาร์บอน เรียกว่า โฟโตออโตโทรฟ (photoautotrophy) แต่ถ้าใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน เรียกว่า โฟโตเฮเทโรโทรฟ (photoheterotrophy) (Madigan และคณะ, 2012) พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม บริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำอย่างทะเลสาบบริเวณขั้วโลก และบริเวณน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิสูง หรือแม้แต่ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เช่น ทะเลสาบน้ำเค็ม หรือแม้แต่ในระบบบำบัดน้ำเสีย (Madukasi และคณะ, 2010, Madukasi และคณะ, 2011)

โดยทั่วไปแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการผลิตออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์เมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังนี้

2.5.1 Oxygenic photosynthetic bacteria

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีกระบวนการสังเคราะห์แสงคล้ายพืชชั้นสูง คือเมื่อสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ โดยมีน้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอน และใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน มีรงควัตถุทำหน้าที่สังเคราะห์แสงคือ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) คาโรทีนอยด์ (carotenoid) และ ไฟโคบิลินส์ (phycobilins) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) (White และคณะ, 2011)

2.5.2 Anoxygenic photosynthetic bacteria

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้แต่ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ ใช้สารประกอบซัลเฟอร์อนินทรีย์ (H_2S , S , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$) และสารอินทรีย์ เช่น อะซีเทต และ มาเลต เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) เป็นรงควัตถุทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสงเพื่อสังเคราะห์แสง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดง (photosynthetic purple bacteria) และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (photosynthetic green bacteria) (White และคณะ, 2011)

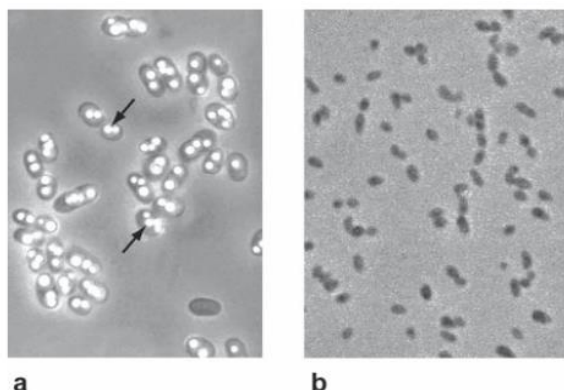
ก. แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสีม่วงแดง (photosynthetic purple bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดง (photosynthetic purple bacteria, PPB) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ a b และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment) กระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดที่ Intracytoplasmic membrane (ICM) จัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสำคัญมากกลุ่มหนึ่งสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป มีความสามารถในการใช้สารพิษเป็นแหล่งคาร์บอน (Madigan และ Jung, 2009) จัดจำแนกเป็น 3 แฟมิลี คือ แฟมิลี Rhodospirillaceae ซึ่งเป็นแฟมิลีชนิดไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur bacteria, PNSB) และ แฟมิลี Chromatiaceae และ แฟมิลี Ectothiorhodospiraceae เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดสะสมกำมะถัน (purple sulfur bacteria, PSB) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน คือ เป็นแบคทีเรีย แกรมลบ รูปแท่ง มีลักษณะโคโลนีสี ส้ม แดง จนถึงน้ำตาล

Madigan และ Jung (2009) ได้รายงานถึงการเกิดสีของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงว่าขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนในภาวะการเจริญเติบโตเนื่องจากโมเลกุลของออกซิเจนมีผลในการยับยั้งระบบการสร้างสีของแบคทีเรียดังกล่าว แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดสะสมก้ำมะถันมีความทนต่อซัลไฟด์ได้ในระดับมิลลิโมลาร์และสามารถออกซิไดซ์ซัลไฟด์ได้ซัลเฟอร์เก็บสะสมไว้ในเซลล์ (sulfur globules) ในขณะที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน มีความทนต่อความเข้มข้นของซัลไฟด์ได้ในปริมาณน้อยมากและไม่มีการเก็บสะสมซัลเฟอร์ไว้ในเซลล์แต่จะปล่อยออกนอกเซลล์แทน (Madigan และ Jung, 2009) แสดงดังรูปที่ 2.1

ข. แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (photosynthetic green bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (photosynthetic green bacteria) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวชนิดสะสมก้ำมะถัน (green sulfur bacteria) ส่วนใหญ่เจริญแบบ obligate anoxic photolithoautotroph กล่าวคือ ต้องมีแสง ไม่มีอากาศ และใช้ H_2S , S , $S_2O_3^{2-}$ หรือ H_2 เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเท่านั้น และใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถพบได้ในบริเวณที่มีซัลไฟด์สูง แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Chlorobium* แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่สองคือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (green non-sulfur bacteria) เป็นกลุ่มที่สามารถเจริญได้ทั้งแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photoheterotroph) และแบบโฟโตออโตโทรฟ (Photoautotroph) ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ มีแสง โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานมีตัวให้อิเล็กตรอนคือก๊าซไฮโดรเจน หรือสารประกอบซัลเฟอร์อนินทรีย์ แบบคีโมเฮเทอโรโทรฟ (Chemoheterotroph) โดยใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะมีอากาศไม่มีแสง แต่จะเจริญได้ดีที่สุดในสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photoheterotroph) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Chloroflexus* (White และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดง (a) *Thermochromatium tepidum* เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดสะสมกำมะถัน (purple sulfur bacterium) คัดแยกจากน้ำพุร้อนใน New Mexico (Silva และคณะ, 2015) จุดที่ลูกศรชี้คือ intracellular sulfur globules (b) *Rhodobaca bogoriensis* เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur bacterium) คัดแยกจาก Lake Bogoria (Kenya) (Madigan และ Jung, 2009)

2.6 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur bacteria, PNSB)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (Purple non-sulfur bacteria, PNSB) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีมีสีส้ม แดง จนถึงน้ำตาล โคโลนีกลมมนขอบเรียบ สัณฐานวิทยาของเซลล์มีลักษณะเป็นรูปท่อน ดิดสี่แกรมลบ จัดอยู่ในกลุ่ม Alphaproteobacteria (Madigan และ Jung, 2009) เจริญเติบโตได้ดีในภาวะมีแสงไม่มีอากาศแบบโฟโตลิโธออโตโทรฟ (Photolithoautotroph) โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) หรือ ซัลไฟด์ความเข้มข้นต่ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอน และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน และแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photoheterotroph) โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน มีตัวให้อิเล็กตรอนและแหล่งคาร์บอนคือสารประกอบอินทรีย์ เช่น มาเลต ไพรูเวต ซักซิเนต ฟูมาเรต เอทานอล แลคเตต และโพรไพโอเนต (Madigan และ Jung, 2009) นอกจากนี้ PNSB ยังเจริญได้ดีในภาวะที่ไม่มีแสงแต่มีอากาศหรือ คีโมเฮเทโรโทรฟ (Chemoheterotroph) แหล่งคาร์บอนคือสารอินทรีย์ต่างๆ เช่นเดียวกับ การเจริญแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photoheterotroph) (Wu และคณะ, 2012, Kornochalert และคณะ, 2014) นอกจากนี้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB บางสายพันธุ์ เช่น *Rhodospirillum fulvum* และ *Rhodopseudomonas palustris* ยังสามารถใช้สารพิษในกลุ่มสารประกอบ

อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนบางประเภทเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น เบนโซเอต (benzoate) อนุพันธ์ของเบนโซเอต และไซโครเฮกเซน (cyclohexane carboxylate) เป็นต้น และบางสายพันธุ์ เช่น *Blastochloris sulfovirdis* สามารถใช้อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เช่น โทลูอิน (toluene) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตได้อีกด้วย (Madigan และ Jung, 2009)

จากความสามารถในการเจริญเติบโตได้หลากหลายภาวะทำให้พบ PNSB ได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมต่างๆ ทั้งแหล่งน้ำธรรมชาติ ชั้นน้ำที่มีแสงสว่างส่องถึงและมีสารอินทรีย์ หรืออาจพบรวมตัวกันเป็นกลุ่มในแหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจน มีแสงเล็กน้อย ในแหล่งน้ำเค็ม ในพื้นดิน หรือแหล่งน้ำสกปรก เช่น บ่อบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง (Hulsen และคณะ, 2014) ปัจจุบันพบแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB ประมาณ 20 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่มีการค้นพบและทดสอบในห้องปฏิบัติการมากที่สุดคือ *Rhodobacter* และ *Rhodopseudomonas* (Madigan และ Jung, 2009)

2.7 ยีน *pufM*

ยีน *pufM* เป็นยีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อย M (M subunit) ของ photosynthetic reaction center ที่พบทั่วไปในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดง (Achenbach และคณะ, 2001) ดังนั้น Achenbach และคณะ (2001) ได้ออกแบบไพรเมอร์ *pufM* ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนยีน *pufM* และทำให้สามารถบ่งชี้ได้อย่างจำเพาะได้ในเบื้องต้นว่าแบคทีเรีนั้นเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงหรือไม่ ยิ่งไปกว่านั้น งานวิจัยของ Achenbach และคณะ (2001) ยังได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงลงในดิน และสกัดดีเอ็นเอจากดิน และใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *pufM* จะให้ผลเป็นบวก โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 229bp ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์ *pufM* ร่วมกับไพรเมอร์สำหรับยีน 16S rDNA เพื่อศึกษาแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงทางนิเวศวิทยาได้

2.8 ประโยชน์ของแบคทีเรียในกลุ่ม PNSB

ด้านการแพทย์

แบคทีเรียในกลุ่ม PNSB มีความสามารถในการสังเคราะห์ยูบิควิโนน (ubiquinone) หรือ โคเอนไซม์คิวเทน (coenzyme Q10, CoQ10) ซึ่งสามารถใช้เป็นอาหารเสริมให้กับผู้ป่วยโรคหัวใจ และหลอดเลือด ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และเมื่อไม่นานมานี้ CoQ10 ได้รับความใช้อย่างแพร่หลายในเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์อาหารเสริม (Sasaki และคณะ, 2005) Kien และคณะ (2010) พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter*

sphaeroides มีความสามารถในการผลิต CoQ10 ได้ 6.34 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้งหนึ่งกรัม ในอัตราการใช้อากาศ 2 vvm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ด้านอุตสาหกรรมและพลังงาน

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB ได้รับความสนใจในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน เนื่องจาก PNSB สามารถใช้สารอินทรีย์ที่หลากหลายเป็นแหล่งคาร์บอน อาทิ กรดอินทรีย์ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น มาเลต แลคเตท อะซิเตท โพรพิโอเนต บิวทาเลต หรือแม้แต่กรดไขมันระเหยที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย (Assawamongkholisiri และคณะ, 2016) รวมถึงวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตไฮโดรเจน ทำให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีต้นทุนต่ำ (Bianchi และคณะ, 2010) Jamil และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถของ *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ PBUM001 ซึ่งคัดแยกจากน้ำเสียของกระบวนการผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในภาวะ photoheterotroph พบว่าสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 1.05 มิลลิลิตร H_2/ml และค่า COD ของน้ำเสียลดลง 31.71 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Bianchi และคณะ (2010) พบว่า *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ AV33 คัดแยกจากน้ำและตะกอนดินบริเวณทะเลสาบในประเทศอิตาลี สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 50.7 ± 2.6 มิลลิลิตร $(H_2)L^{-1}h^{-1}$ เมื่อใช้แลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอน และยังพบการสะสมของ polyhydroxybutyrate (PHB) ภายในเซลล์ซึ่งเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB Wu และคณะ (2012) พบว่า *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ WP3-5 สามารถผลิต PHB และก๊าซไฮโดรเจน ได้โดยใช้อะซิเตต (acetate) และ โพรพิโอเนต (propionate) เป็นสารตั้งต้น โดยแบคทีเรียจะผลิต PHB ก่อนแล้วจึงผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อค่าความเป็นกรดต่างในระบบเหมาะสมต่อการผลิต นอกจากนี้ยังมีการผลิตไฮโดรเจนของสายพันธุ์ *Rhodobacter capsulatus* (Silva และคณะ, 2015) และการผลิตกรดไขมันไตรกลีเซอไรด์ (triacylglycerol, TAG) ของ *Rhodobacter* sp. สายพันธุ์ KCU-PS1 โดยมีกรดมาลิกเป็นสารตั้งต้น โดยกรดไขมันที่ได้อยู่ในรูปกรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งมีศักยภาพเพื่อใช้เป็นไบโอดีเซลได้ (Assawamongkholisiri และคณะ, 2016)

ด้านการเกษตร

เซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง อาทิเช่น *Rhodopseudomonas capsulatus* มีปริมาณโปรตีนสะสมสูงถึงร้อยละ 60-65 โปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งยังมีวิตามิน และแร่ธาตุ เช่น วิตามินบี 1 2 6 และ 12 กรดโฟลิก วิตามินซี วิตามินดี และวิตามินอี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุ เช่น โคแฟกเตอร์ ได้แก่ ยูบิควิโนน (Ubiquinone)

โคเอนไซม์คิว (Coenzyme-Q) เป็นส่วนประกอบ จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์ และ ปุ๋ยสำหรับพืช เพราะสามารถช่วยหมุนเวียนและเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในดินและเสริมสร้าง กิจกรรมการเผาผลาญอาหารของจุลินทรีย์ในดินอีกด้วย (Wu และคณะ, 2013) การใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการบำบัดน้ำเสียยังสามารถนำกากตะกอนซึ่งเป็นของเสียจากระบบบำบัดมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรได้อีกด้วย (Tao และคณะ, 2008, Lu และคณะ, 2013)

ด้านสิ่งแวดล้อม

จากความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่ถูกใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 ได้เริ่มมีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ เช่น น้ำเสียชุมชน น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม บำบัดโลหะหนักในน้ำเสียที่ปนเปื้อนสีย้อมผ้า น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม ฟาร์มสุกร ฟาร์มกุ้ง (Lu และคณะ, 2010) น้ำเสียที่มีนํ้ายงปนเปื้อน และน้ำเสียจากโรงงานผลิตยา (Madukasi และคณะ, 2010) เทคโนโลยีการบำบัดน้ำเสียด้วย PNSB ถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Lu และคณะ, 2010) พบว่า PNSB สายพันธุ์ Z08 สามารถลด COD ในน้ำเสียจากถั่วเหลืองได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (จากเดิม 13,516 มิลลิกรัมต่อลิตร) ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะเหมือนธรรมชาติ การทดลองดังกล่าวยังพบว่า สามารถลดสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ ($MW > 10,000$ Da) ได้ถึง 75.4 เปอร์เซ็นต์ (จากเดิม 86 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่สารอินทรีย์โมเลกุลเล็ก ($MW < 650$ Da) เพิ่มขึ้น 79.8 เปอร์เซ็นต์ (จากเดิม 12 เปอร์เซ็นต์) ข้อดีของเทคโนโลยีบำบัดน้ำเสียด้วย PNSB คือ ความสามารถทนต่อความเข้มข้นของสารพิษความเข้มข้นสูงในน้ำเสียได้ และใช้สารมลพิษอินทรีย์เหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนและสร้างพลังงาน ATP แบบ Oxidative phosphorylation (Lu และคณะ, 2016) หรือสร้าง polyhydroxybutyrate (PHB) ช่วยให้คุณภาพของ COD ในน้ำเสียดีขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณของ ฟอสเฟต ไนเตรต และไฮโดรเจนซัลไฟด์ในน้ำเสียได้อีกด้วย เพราะสามารถใช้ไนเตรตเป็นแหล่งของไนโตรเจน และใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือซัลไฟด์อื่นๆ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Lu และคณะ, 2013, Hulsen และคณะ, 2014) นอกจากนี้ชีวมวลของ PNSB ที่ได้จากการบำบัดน้ำเสียสามารถใช้ประโยชน์ต่อไปและไม่สร้างผลผลิตที่เป็นมลพิษในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย เช่น เป็นแหล่งอาหารสัตว์ เป็นปุ๋ย และใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารอื่น เช่น ใช้ผลิตโปรตีน (single cell protein) และ ไบโอฟอลิเมอร์ (biopolymers) เป็นต้น (Wu และคณะ, 2012, Lu และคณะ, 2016)

2.9 รายงานการใช้ PNSB ในการบำบัดน้ำเสีย

Tao และคณะ (2008) ได้คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนร้อนสายพันธุ์ *Rhodobacter sphaeroides* และทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียเทียมที่มี glucose peptone และน้ำมันปรุงอาหารเป็นองค์ประกอบ โดยตรึงเซลล์ *Rhodobacter sphaeroides* ในเม็ดอัลจิเนต (alginate-immobilized cell) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถบำบัดน้ำมันปนเปื้อนได้ 76 เปอร์เซ็นต์ และ Chemical Oxygen Demand, COD ลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากบำบัดเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Kantachote และคณะ (2010) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ *Rhodospseudomonas palustris* (P1) ในการบำบัดน้ำเสียจากการผลิตยางแผ่นภายใต้สภาวะ microaerobic-light ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดค่า COD ลงได้ 80 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเดิม 1457 มิลลิกรัมต่อลิตร) และลดปริมาณสารแขวนลอยในน้ำเสียลงได้ 82 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเดิม 48 มิลลิกรัมต่อลิตร)

Madukasi และคณะ (2010) พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB สายพันธุ์ *Rhodobacter sphaeroides* (Z08) ที่คัดแยกจากดิน สามารถลดค่า COD ของน้ำเสียทางเภสัชกรรมได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (ค่า COD เดิมเท่ากับ 9450 มิลลิกรัมต่อลิตร) ภายในระยะเวลา 5 วัน อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส

Lu และคณะ (2013) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียด้วย membrane bioreactor โดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ 1.2174 พบว่าสามารถลดค่า COD ได้ 99.3 เปอร์เซ็นต์ จาก COD เริ่มต้น 8,000-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียถึง 99.5 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Hulsen และคณะ (2014) ศึกษาความสามารถของ PNSB ในการบำบัดน้ำเสียจากชุมชนในภาวะไร้อากาศพบว่า สามารถลดค่า COD ได้ประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเดิม 526 ± 99 มิลลิกรัมต่อลิตร) แอมโมเนียมไนโตรเจน ($\text{NH}_4\text{-N}$) 99.6 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเดิม 46 ± 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส ($\text{PO}_4\text{-P}$) 88.8 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเดิม 6.2 ± 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Wang และคณะ (2016) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB สายพันธุ์ *Rhodospseudomonas* sp. ต่อการบำบัด white spirit wastewater พบว่า สามารถลดค่า COD ที่สูงถึง 9100-25,600 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ถึง 76.02 เปอร์เซ็นต์ และสามารถสร้างชีวมวลได้ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าในน้ำเสียดังกล่าวจะมีความเข้มข้นของเอทานอล 0.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จากการศึกษาดังกล่าว Wang และคณะยังให้ความสนใจกับการนำ

ชีวมวลของ PNSB ไปใช้ประโยชน์เนื่องจากช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดตะกอนส่วนเกินเหมือนระบบบำบัดอื่นๆ

2.10 แอกทิเวเตดสลัดจ์ (Activated sludge, AS)

มีลักษณะคล้ายดินตะกอน ประกอบไปด้วยกลุ่มของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น โปรโตซัว รา อาร์เคีย และไวรัส (Seviour และ Nielsen, 2010) แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากที่สุด (Zhang และคณะ, 2012) แอกทิเวเตดสลัดจ์เป็นตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (Activated Sludge Process) หรือเรียกอีกอย่างว่า หัวเชื้อสำหรับบำบัดน้ำเสียของระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งเป็นอีกหนึ่งกระบวนการทางชีวภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถบำบัดน้ำเสียได้หลากหลายประเภททั้งน้ำเสียจากชุมชนและจากโรงงานอุตสาหกรรม หลักการทำงานของระบบโดยทั่วไปประกอบด้วย 2 ส่วนคือ บ่อเติมอากาศ (Aeration Tank) เป็นขั้นตอนแรกที่รับน้ำเสียเข้าสู่ระบบ ในบ่อนี้จะมีการเติมอากาศและมีตะกอนสลัดจ์ช่วยในการบำบัด จากนั้นน้ำจะไหลไปยังส่วนที่สอง คือ บ่อตกตะกอน (Sedimentation Tank) ในส่วนนี้จะทำหน้าที่ตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสออก โดยน้ำส่วนใสจะไหลออกสู่ระบบอื่น หรืออาจออกสู่ธรรมชาติต่อไป ส่วนตะกอนสลัดจ์จะถูกแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งไหลกลับไปยังบ่อเติมอากาศโดยผ่านจตุรีเทิร์นสลัดจ์ อีกส่วนหนึ่งไหลออกจากระบบเพื่อรอการกำจัดต่อไป (Seviour และ Nielsen, 2010)

ด้วยความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลายรวมถึงสารพิษต่าง ๆ เพื่อการเจริญเติบโต ทำให้ PNSB พบได้ในน้ำเสีย ในปี 1978 Siefert และคณะ ได้คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงจากตะกอนบำบัดน้ำเสียของระบบบำบัดน้ำเสีย Göttingen ประเทศเยอรมนี พบจำนวนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงอยู่ระหว่าง 10^5 - 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และพบ PNSB ประมาณ 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาด้วยเทคนิคการนับเซลล์ที่มีชีวิตในงานเพาะเชื้อ PNSB หลากหลายสายพันธุ์ที่พบจากระบบบำบัดน้ำเสียส่วนใหญ่อยู่ร่วมกับแบคทีเรียเฮโทรโทรฟชนิดอื่นๆ ในสภาวะมีอากาศไม่มีแสง เช่น *Rhodobacter sphaeroides* *Rhodobacter capsulatus* *Rhodopseudomonas palustris* *Blastochloris viridis* *Rubrivivax gelatinosus* *Rhodocyclus tenuis* และ *Rhodospirillum photometricum* เป็นต้น (Madigan และ Jung, 2009)

มีรายงานการคัดแยก PNSB จากแอกทิเวเตดสลัดจ์ เช่น Liang และคณะ (2010) สามารถคัดแยก PNSB จากแอกทิเวเตดสลัดจ์ได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Rhodopseudomonas palustris* CC1, CC7, G11, และ GE1

Schott และคณะ (2010) สามารถคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในภาวะไร้อากาศจาก
แอกทิเวเทดสลัดจ์ของโรงบำบัดน้ำเสียจากเมืองคอนสแตนซ์ ประเทศเยอรมนี พบ 2 สายพันธุ์
คือ *Thiocapsa* sp. สายพันธุ์ KS1 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ LQ17

Laocharoen และ Reungsang (2014) คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง
Rhodobacter sphaeroides สายพันธุ์ KKU-PS5 ได้จากตะกอนสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสีย
ชนิด Upflow anaerobic sludge blanket (UASB)

จากรายงานข้างต้นพบว่า PNSB ได้รับความสนใจในการศึกษาถึงความสามารถในการ
บำบัดน้ำเสียเป็นอย่างมาก เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษอินทรีย์ในน้ำเสียที่มี
ความเป็นพิษสูงจัดเป็นข้อดีของกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Lu และ
คณะ, 2013) แต่ยังไม่พบการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดย PNSB งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่
จะคัดแยก PNSB จากแอกทิเวเทดสลัดจ์และนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. กล่องสุญญากาศ (AnaeroPack Rectangular Jar) ขนาด 7 ลิตร ของบริษัท Mitsubishi Gas Chemical Company Inc., Japan.
2. กล้องจุลทรรศน์ชนิดสองตา (Binocular compound microscope) รุ่น Olympus ของบริษัท รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan.
3. เข็มฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
4. ขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 8 12 และ 22 มิลลิลิตร (Screw cap with Teflon liner) ของบริษัท Lap System, Thailand.
5. เครื่องชั่งหยาบรุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท METTLER - TOLEDO, Switzerland.
6. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG285 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
7. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 ของบริษัท Decan Ultrasonics, England.
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
10. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Superspeed table-top centrifuge) รุ่น KUBOTA3700 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan.
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti J-301 ของบริษัท Beckman Coulter, USA
14. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nano drop) รุ่น Nanodrop 2000 ของบริษัท Thermo Scientific, USA.
15. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.

16. เครื่องบันทึกภาพจากเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000TM ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA. และรุ่น MJ MiniTM Personal Thermal Cycler ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
18. เครื่องวัดความเข้มแสง รุ่น BK Precision 615 ของบริษัท BK Precision Electronic Test Instruments, USA.
19. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA.
20. ตู้เพิ่มความดันไอน้ำเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-35 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan. รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan. และ รุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan.
21. ตู้อบแห้ง (Oven) ของบริษัท Contherm Scientific, New Zealand.
22. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Mammert, Germany.
23. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
24. ตู้แช่เยือกแข็ง (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
25. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.
26. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (Cryotube) ของบริษัท Nalgene Nunc International, Denmark.
27. หลอดไฟ Sylvania ขนาด 60W แบบแสงเหลือง (warm white) ของบริษัท Havells Sylvania (Thailand) Co., Ltd., Thailand.
28. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตตขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Sartorius Biolab Product, Germany.
29. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE (Polytetrafluoroethylene) ขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
30. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis System) รุ่น Minis-150 ของบริษัท Major Science, Taiwan.

31. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
32. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)
 - เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N ของบริษัท Agilent Technologies, USA.
 - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ หน้า 0.25 ไมโครเมตร
 - เครื่องตรวจจับ (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)
 - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyrings) ขนาด 10 ไมโครลิตร

เคมีภัณฑ์

1. น้ำมันดีเซล (diesel oil) ของบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
2. แก๊สโซฮอล์ E20 ของบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
3. แก๊สโซฮอล์ E85 ของบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
4. แก๊สโซฮอล์ G91 ของบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
5. แก๊สโซฮอล์ G95 ของบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
6. เบนซิน ULG95 ของบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
7. ไบโอดีเซล B100 ชนิดน้ำมันปาล์ม ของบริษัท Witcorp Products, Thailand.
8. ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) ของบริษัท Sigma, USA.
9. ไพรีน (pyrene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
12. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรรัส (Anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
13. กรดมาลิก (DL-malic acid) ของบริษัท Merck, Germany.
14. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
15. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
16. กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท AJEX Chemicals, Australia.
17. ไดโซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Sigma, USA.

18. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
19. แมงกานีส(II)ซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท M&B, England.
20. คอปเปอร์(II)ไนเตรตไตรไฮเดรต ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
21. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany.
22. เอทิลีนไดเอมีนเททราอะซีติกแอติก ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, EDTA)
ของบริษัท Sigma, USA.
23. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck,
Germany.
24. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
25. วิตามินบีหนึ่ง (Vitamin B1) ของบริษัท Sigma, USA.
26. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Merck, Germany.
27. ไบโอติน (Biotin) ของบริษัท Fluka, Germany.
28. สารปฏิชีวนะนิสตาติน ของบริษัท Bio Basic Inc., Canada.
29. นิโคตินาไมด์ (nicotinamide) ของบริษัท Sigma, USA.
30. โคบอล(II)คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA,
France.
31. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
32. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
33. อะกาโรส (Molecular biology grade) ของบริษัท IUI, Japan.
34. เอทานอล (C_2H_5OH) ของบริษัท Merck, Germany.
35. Anaerocult A ของบริษัท Merck, Germany.
36. Dry anaerobic indicator strip ของบริษัท BD, France.
37. ชุดเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Fermentas)
ของบริษัท Thermo Fisher Scientific Inc., USA.
38. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ของบริษัท 1st BASE Laboratories, Malaysia
หรือ Integrated DNA Technologies, USA.
39. ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ (DNA Gel/PCR Fragments Extraction Kit
ของบริษัท Geneaid, Taiwan.
40. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNAzol@Direct) ของบริษัท Molecular Research Center,
USA.
41. 100 bp DNA Ladder ของบริษัท New England Biolabs, USA.

42. 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) ของบริษัท Theromo Fisher Scientific Inc., USA.
43. สารละลาย dNTP ได้แก่ dATP dCTP dGTP และdTTP (Fermentas) ของบริษัท Theromo Fisher Scientific Inc., USA.
44. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
45. สีบรอมฟีนอลบลู (Bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.
46. ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน (Trizma base) ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
47. เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB) ($(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$) ของบริษัท Sigma, USA.
48. เอธิเดียมโบรไมด์ ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.

ตารางที่ 3.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *pufM* (229bp)

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
<i>pufM</i> _557	5'-CGC ACC TGG ACT GGA C-3'	Achenbach และคณะ, 2001
<i>pufM</i> _750R	5'-CCC ATG GTC CAC CGC CAG AA-3'	Achenbach และคณะ, 2001

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การตัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (PNSB)

จากแอกทิเวทสแลตจ์

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างแอกทิเวทสแลตจ์ (Activated Sludge) บริเวณบ่อเติมอากาศและจุดรีเทิร์นสแลตจ์ จากน้ำเสียสามแห่ง วัดค่าความเป็นกรดต่างของตัวอย่าง ภายหลังจากเก็บตัวอย่างแล้วควรวิเคราะห์ทันที หรือเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทดลอง

3.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (PNSB)

คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใส่ตัวอย่างตะกอน 200 ไมโครลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน (Tao และคณะ, 2008) (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ซึ่งเติมนิสตาติน ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมเพื่อยับยั้งราและยีสต์ ปรับค่า pH เท่ากับ 6.8-7.0 บรรจุอยู่ในหลอดแก้วกันแบนขนาดบรรจุ 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอาหารจนเต็มหลอดหรือให้มีพื้นที่เหลือน้อยที่สุดปิดฝาให้สนิท เพาะเลี้ยงเชื้อในภาวะ photoheterotroph ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 3,000-3,500 ลักซ์ (ใช้หลอดไฟทั้งสแตนด์กำลังไฟ 60 วัตต์ เป็นแหล่งกำเนิดแสง) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-7 วัน หรือจนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีส้ม ชมพูแดง แดงเข้มจนถึงน้ำตาลแดง

เมื่อสีของอาหารเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีส้ม ชมพูแดง แดงเข้มจนถึงน้ำตาลแดง ให้คัดแยกเชื้อโดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง RCVB (ภาคผนวก ก.) เพาะเลี้ยงเชื้อในภาวะ photoheterotroph ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศภายในกล่องสุญญากาศ (anaerobic box) ที่บรรจุ Anaerocult A (Merck, Germany) ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 3,000-3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 2-7 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะแตกต่างกัน สีแดง น้ำตาลแดง ส้ม และสีชมพู จำนวน 3 โคโลนีต่อ plate มาขีดเชื้อ (streak) ข้างบนอาหารแข็ง RCVB จนได้โคโลนีเดี่ยว

3.2 การเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษาแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (PNSB)

เพาะเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรียสังเคราะห์แสงใน 2 ภาวะดังนี้

3.2.1 การเพาะเลี้ยงด้วยภาวะ photoheterotroph

ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลตของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงบนอาหารแข็ง RCVB ลงในอาหารเหลว RCVB นำไปบ่มภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 3,000-3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-7 วัน บ่มเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl เก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว RCVB ที่เติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อต่อเชื้อในอัตราส่วน 70 ต่อ 30

3.2.2 การเพาะเลี้ยงด้วยภาวะ chemoheterotroph

ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลตของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงบนอาหารแข็ง RCVB ลงบนอาหารเอียง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-14 วัน (หรือจนกว่าเชื้อจะเจริญ) เก็บหลอดเชื้อทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหลอดเชื้อตั้งต้นสำหรับการทดลองต่อไป

3.3 การคัดกรอง PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลได้

3.3.1 การคัดกรอง PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลเบื้องต้น

เพิ่มปริมาณเชื้อโดยถ่าย PNSB โคโลนีเดี่ยวจำนวน 10 ไอโซเลตที่แตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง RCVB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-7 วัน จากนั้นเตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ไม่เติมกรดมาลิก (minimum RCVB) (ภาคผนวก ก.) เติมอาหารเหลว LB เป็นแหล่งคาร์บอน 10 เปอร์เซ็นต์ และเติมดีเซล 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-7 วัน ในภาวะ chemoheterotroph เพื่อปรับสภาพของเชื้อ PNSB ก่อนการทดลอง จากนั้นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์สองครั้งด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อและแขวนลอยด้วยอาหาร minimum RCVB จากนั้นปรับเซลล์แขวนลอยให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของ PNSB โดยถ่ายหัวเชื้อข้างต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว minimum RCVB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่เติม 1% ดีเซล ภายใต้ภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และ 14 (ทุกชุดทดลองมี 3 ซ้ำ) เพื่อสกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ตามวิธีของ (Luepromchai และคณะ, 2007) โดยมีชุดที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุมการลดลงของดีเซลเนื่องจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม

3.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของ PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลสายพันธุ์เดียว

จากผลการทดลองข้อ 3.3.1 เลือกกลุ่ม PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลได้ดีที่สุด นำ PNSB สายพันธุ์เดียวแต่ละชนิดจากกลุ่มนั้นมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลของ

เชื้อบริสุทธิ์ตามขั้นตอนเดียวกันกับข้อ 3.3.1 เก็บตัวอย่างชุดละ 3 ซ้ำในวันที่ 0 และ 14 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เพื่อคัดเลือก PNSB สายพันธุ์เดียวที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซลที่ดีที่สุดไปศึกษาต่อไปในขั้นถัดไป

3.4 ประสิทธิภาพของ PNSB สายพันธุ์เดียวในการย่อยสลายดีเซล

3.4.1 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ chemoheterotroph

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของ PNSB สายพันธุ์เดียว จากข้อ 3.3.2 ในภาวะ chemoheterotroph เตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยง PNSB สายพันธุ์เดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimum RCVB ที่เสริมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 50 เปอร์เซ็นต์ และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มในภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว minimum RCVB ที่เติมดีเซลความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มในสภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ทั้งสองขั้นตอนส่งเสริมการเจริญของเชื้อ PNSB สายพันธุ์เดียวและปรับสภาวะก่อนการทดลอง หลังจากนั้นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์สองครั้งด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อและแขวนลอยด้วยอาหาร minimum RCVB จากนั้นปรับเซลล์แขวนลอยให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของ PNSB โดยถ่ายหัวเชื้อข้างต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว minimum RCVB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่เติม 1% ดีเซล บ่มในภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างชุดละ 3 ซ้ำ ในวันที่ 0 1 3 5 7 10 และ 14 เพื่อสกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยมีชุดที่ไม่เติมเชื้อเป็นชุดควบคุมการลดลงของดีเซลเนื่องจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และวิเคราะห์การเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยเทคนิคหยดเชื้อ (drop plate) บนอาหารแข็ง LB บ่มในภาวะ chemoheterotroph ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 วัน หรือจนกว่าเชื้อเจริญ

3.4.2 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ photoheterotroph

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ของสายพันธุ์เดียวในภาวะ photoheterotroph โดยถ่ายเชื้อจากอาหารเหลว minimum RCVB ที่เติมดีเซลความเข้มข้น

0.5 เปอร์เซ็นต์ จากข้อ 3.4.1 ลงอาหาร RCVB นำไปเพาะเลี้ยงในภาวะ photoheterotroph เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อกลับมาสังเคราะห์แสงอีกครั้งโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ทำการล้างเซลล์สองครั้งด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อและแขวนลอยด้วยอาหาร RCVB ปรับเซลล์แขวนลอยให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของ PNSB โดยถ่ายหัวเชื้อข้างต้นประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร ลงใน minimum RCVB ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ที่เสริมด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วกันแบน เดิม 1% ดีเซล บ่มในภาวะ photoheterotroph ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 3,000-3,500 ลักซ์ เก็บตัวอย่างที่ 14 และ 21 วัน (ทำ 3 ซ้ำ) วิเคราะห์หาปริมาณดีเซลที่เหลือเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (ในระหว่างการทดลองให้เขย่าโดยการกลับหลอดไม่ให้เซลล์ตกตะกอนทุกวัน วันละ 10 ครั้ง ในทุกชุดการทดลอง)

3.4.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ของ PNSB สายพันธุ์เดียวในภาวะ chemoheterotroph โดยถ่ายเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.4.1 ลงในอาหารเหลว minimum RCVB ที่เดิม 1% ดีเซล บ่มในสภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์สองครั้งด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อและแขวนลอยด้วยอาหาร minimum RCVB จากนั้นปรับเซลล์แขวนลอยให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของ PNSB โดยถ่ายหัวเชื้อข้างต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว minimum RCVB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เดิมดีเซลความเข้มข้น 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง บ่มในภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน วิเคราะห์หาปริมาณดีเซลที่เหลือเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์การเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยเทคนิคหยดเชื้อ (drop plate) บนอาหารแข็ง LB (ทุกชุดทดลองมี 3 ซ้ำ) บ่มในภาวะ chemoheterotroph ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-14 วัน หรือจนกว่าเชื้อเจริญ

3.4.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ทดสอบความสามารถการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง สายพันธุ์เดี่ยวในภาวะ chemoheterotroph โดยเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 3.4.3 จากนั้นถ่าย 1 มิลลิลิตรของหัวเชื้อ (10^8 CFU/มิลลิลิตร) ลงอาหารเหลว minimum RCVB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมน้ำมันชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ไบโอดีเซล (B100) E20 E85 G91 G95 หรือ ULG95) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง บ่มในภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 และ 14 วัน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันชนิดต่างๆ ที่เหลืออยู่เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

3.4.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนทรินและไพรีนของ PNSB สายพันธุ์เดี่ยว

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรินของ PNSB สายพันธุ์เดี่ยวในภาวะ chemoheterotroph โดยใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.3 ก่อนถ่าย 1 มิลลิลิตรของหัวเชื้อ (10^8 CFU/มิลลิลิตร) ลงในอาหารเหลว minimum RCVB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่เติมไพรีนและพีแนนทริน ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ทำ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวัน 7 และ 14 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไพรีนและพีแนนทรินที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ

3.4.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs (ไพรีนและพีแนนทริน)

วิเคราะห์หาปริมาณ PAHs โดยสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ RCVB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รวมกับนอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่อง Vortex mixer จากนั้นแยกตัวอย่างน้ำออกจากนอร์มัลเฮกเซนโดยการทำให้ตัวอย่างน้ำแข็งตัวที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน แยกส่วนใสหรือชั้นนอร์มัลเฮกเซนใสหลอดทดลองใหม่ นำไประเหยที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยส่วนของนอร์มัลเฮกเซนออก เก็บหลอดตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หา PAHs ที่เหลืออยู่ ให้นำหลอดตัวอย่างที่ผ่านการต้มระเหยสารนอร์มัลเฮกเซนออกแล้วมาเติมนอร์มัลเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนำไปกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีต่อไป

3.4.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs (ไพรีนและพีแนนทริน)

ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

วิเคราะห์ปริมาณ PAHs ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟียี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 6890N ใช้คอลัมน์ชนิด capillary column HP-5 ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซนความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจจับสัญญาณชนิด Frame Ionization Detector (FID) ภายใต้สภาวะดังนี้คือ

- อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส
- ช่วงที่หนึ่งอุณหภูมิขึ้นครั้งละ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- ช่วงที่สองอุณหภูมิขึ้นครั้งละ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- ช่วงที่สามอุณหภูมิขึ้นครั้งละ 40 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- และช่วงสุดท้ายอุณหภูมิคงที่ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

โดยมีแก๊สฮีเลียมอัตราการไหลเท่ากับ 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที ทำหน้าที่เป็นตัวพา

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีรวมทั้งลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะการติดสีแกรม และความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ของทั้งสองภาวะคือ chemoheterotroph และ photoheterotroph สำหรับการศึกษสมบัติการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ใช้อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ (Motility test medium) โดยใช้เข็มเย็บเชื้อ (needle) เขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงบนอาหารแข็ง RCVB ที่เพาะเลี้ยงในภาวะ photoheterotroph แทงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตรงๆ (stab) พันฟาราฟินทับจุลสำลีเพื่อปิดหลอดอาหาร บ่มในภาวะ chemoheterotroph และ photoheterotroph เป็นเวลา 2-7 วัน

3.5.2 พิสูจน์ยืนยันการเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยการเพิ่มจำนวนยีน *pufM*

3.5.2.1 สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNAzol®Direct

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ภายใต้สภาวะ photoheterotroph ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 3,000-3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 2-7 วัน สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNAzol®Direct ตามวิธีการที่ผู้ผลิตระบุไว้ โดยนำเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์และแยกส่วนใสออก จากนั้นนำ ตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย DNAzol®Direct ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอน เซลล์ด้วยเครื่องปั่นผสมก่อนนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้งเพื่อแยกส่วนใสออก เก็บลงในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรสต่อไป โดยก่อนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอของสาร สกัดดีเอ็นเอนั้นด้วยเครื่องวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (nanodrop spectrophotometer) ซึ่งเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A₂₆₀ และ A₂₈₀) โดยค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1.8 ถึง 2.0 หากมีค่าน้อยกว่า 1.8 หมายถึงการมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่สูง แต่หากมีค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่ในปริมาณมาก สมการที่เครื่องใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอคือ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.5.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *pufM* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ใช้สารสกัดดีเอ็นเอจากข้อ 3.5.2.1 เป็นแม่แบบสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสโปรตีนบริเวณ photosynthetic reaction center โดยใช้ไพรเมอร์ *pufM*_{557F} และ *pufM*_{750R} (Achenbach และคณะ, 2001) ผลิตภัณฑ์มีขนาดเท่ากับ 229 คู่เบส หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler, Biorad, USA)

ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา ดังนี้ (ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร)

ไพรเมอร์ pufM_557F (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์)	0.25 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ pufM_750R (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์)	0.25 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์)	1.5 ไมโครลิตร
PCR buffer 10X	2.5 ไมโครลิตร
สารละลาย dNTP (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร
เอนไซม์ Tag DNA polymerase (ความเข้มข้น 5U/ μ l)	0.2 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	18.8 ไมโครลิตร

เพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ photosynthetic reaction center ของแบคทีเรีย ตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	} 30 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 วินาที	

3.5.2.3 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ดังนี้ เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายในบัฟเฟอร์ 1X TAE อุ่นจนกว่าจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทลงแม่พิมพ์เจลรอนเจลแข็งตัว ให้ใส่ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากข้อ 3.5.2.2 ลงในช่องของอะกาโรสเจลโดยมี 100kb DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอขนาด 229 bp ด้วยเครื่อง Gel Documentation

3.5.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ PNSB สายพันธุ์เดียวโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB สายพันธุ์เดียวบนอาหารแข็ง RCVB บ่มในภาวะ photoheterotroph ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-7 วัน จัดส่งไปยังบริษัท MacroGen เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S DNA หลังจากนั้นบ่งชี้สายพันธุ์

ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเบื้องต้นโดยการเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2 และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม BLAST เพื่อจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

3.6 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของ PNSB ในน้ำจืด

เก็บตัวอย่างน้ำจืดบริเวณผิวน้ำ นำไปกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกสิ่งสกปรกออก บันทึกลักษณะตัวอย่างเบื้องต้น จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลอง เตรียมหัวเชื้อ PNSB สายพันธุ์เดี่ยว ตามวิธีในข้อ 3.5.3 ก่อนถ่ายหัวเชื้อที่ปรับเซลล์แขวนลอยให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ลงในชุดทดลองซึ่งแบ่งเป็นสองชุดทดลองคือ ชุดทดลองปลอดเชื้อและชุดทดลองไม่ปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงในสภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 14 วิเคราะห์หาปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ รวมทั้งวิเคราะห์ค่า COD BOD ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ของตัวอย่างน้ำก่อนและหลังการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณดีเซลและน้ำมันชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

3.7.1 การสกัดดีเซลและน้ำมันชนิดต่างๆจากอาหารเหลว ดัดแปลงจาก Luepromchai และคณะ (2007)

สกัดดีเซลจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ร่วมกับนอร์มัลเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นนำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อแยกน้ำออกจากเฮกเซน แยกชั้นเฮกเซนออกใส่หลอดทดลองใหม่ กำจัดน้ำออกจากสารละลายโดยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีหรือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเซลและน้ำมันชนิดต่างๆ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

วิเคราะห์ปริมาณดีเซลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟียี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 6890N ใช้คอลัมน์ชนิด capillary column HP-5 ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจจับสัญญาณชนิด Flame Ionization Detector (FID) ภายใต้สภาวะดังนี้คือ

- อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส
 - ช่วงที่หนึ่งอุณหภูมิขึ้นครั้งละ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
 - ช่วงที่สองอุณหภูมิขึ้นครั้งละ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
 - ช่วงที่สามอุณหภูมิขึ้นครั้งละ 40 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
 - และช่วงสุดท้ายอุณหภูมิคงที่ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- โดยมีแก๊สฮีเลียมอัตราการไหลเท่ากับ 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที ทำหน้าที่เป็นตัวพา

3.8 การคำนวณปริมาณดีเซล ไบโอดีเซล (B100) แก๊สโซฮอล์ E20 E85 G91 G95 และ เบนซิน ULG95

คำนวณปริมาณดีเซลและน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดอื่น โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าปริมาณน้ำมันทั้งหมดในตัวอย่างจากผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด (ภาคผนวก ง) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ที่เหลืออยู่} = \frac{\text{ผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดของตัวอย่าง}}{\text{ผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดของตัวอย่างวันที่ 0}} \times 100$$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (PNSB)

จากแอกทิเวเทสสลัดจ์

4.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างแอกทิเวเทสสลัดจ์ (Activated Sludge) บริเวณบ่อเติมอากาศและ จูตรีเทิร์นสลัดจ์ จากโรงงานอุตสาหกรรม 3 ประเภท ในจังหวัดชลบุรี ได้แก่ โรงงาน อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โรงงานอุตสาหกรรมสีย้อม และโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งโรงงาน อุตสาหกรรมสีย้อมพบว่ามีการปนเปื้อนน้ำมันจากเครื่องจักรในโรงงานเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย

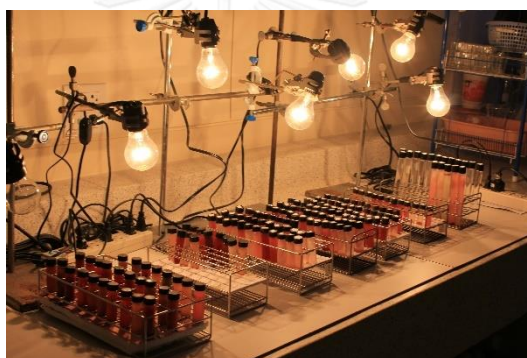
แอกทิเวเทสสลัดจ์ เป็นตะกอนของระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งซึ่งจะมีจุลินทรีย์เทอรัน สลัดจ์ทำหน้าที่ในการรับตะกอนจากบ่อตกตะกอนและนำตะกอนกลับไปยังบ่อเติมอากาศของระบบ บัดอีกครั้ง และเนื่องจากเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีขนาดเล็กมากคือ ประมาณ 0.5-3.0 ไมโครเมตร ทำให้มีความต้านทานต่อการตกตะกอนแต่จะกระจายตัวในน้ำเป็นส่วนใหญ่ (Lu และ คณะ, 2013) ดังนั้นสำหรับการเก็บตัวอย่างจึงเลือกเก็บตัวอย่างจากสองจุดของระบบบำบัด คือ บริเวณบ่อเติมอากาศ และ จูตรีเทิร์นสลัดจ์

ลักษณะตัวอย่างมีดังนี้ ตัวอย่างที่หนึ่งมีสีน้ำตาลอ่อน ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 ตัวอย่างที่สองมีสีดำ ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 และตัวอย่างที่สามมีสีดำ ค่าความเป็น กรดต่างเท่ากับ 5.5 แสดงดังตารางที่ 4.1

4.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (PNSB)

คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงด้วยการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน (Tao และคณะ, 2008) (ภาคผนวก ก.) ภายใต้ภาวะการ เพาะเลี้ยงแบบ photoheterotroph ที่ความเข้มแสงประมาณ 3,000-3,500 ลักซ์ โดยตั้ง หลอดไฟห่างจากจุดทดลองประมาณ 20-30 เซนติเมตร แสดงดังรูปที่ 4.1 สังเกตพบการเปลี่ยนสี ของอาหารเลี้ยงเชื้อจากไม่มีสีเป็นสีส้ม ชมพู แดง หรือแดงเข้มจนถึงน้ำตาล แสดงดังรูปที่ 4.2 จากนั้นคัดแยกเชื้อจากหลอดทดลองที่สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีส้ม ชมพู แดง หรือแดงเข้มจนถึงน้ำตาล โดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง RCVB เพาะเลี้ยงเชื้อใน ภาวะ photoheterotroph ภายในกล่องสุญญากาศ ระยะเวลา 7 วัน พบการเจริญของ

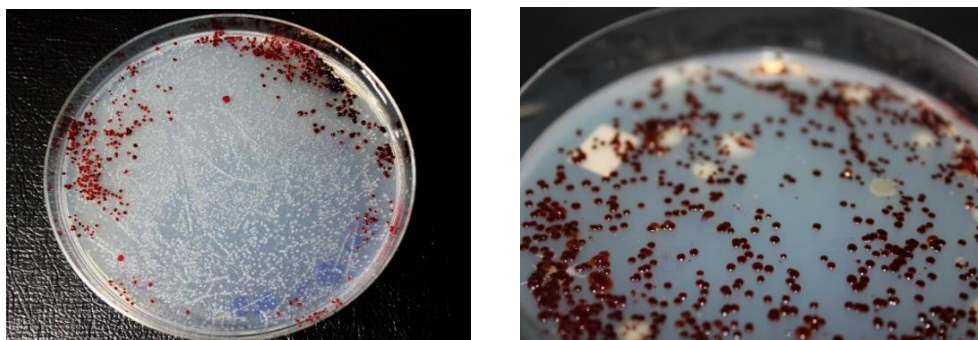
แบคทีเรียทั้งโคโลนีที่มีสีขาว แดง ส้ม ชมพู และสีน้ำตาลปะปนกัน แสดงดังรูปที่ 4.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะแตกต่างกันสีแดง น้ำตาลแดง ส้ม และสีชมพู จำนวน 3 โคโลนีต่อ plate มาขีดเชื้อ (streak) ข้างบนอาหารแข็ง RCVB จนได้โคโลนีเดี่ยว แสดงดังรูปที่ 4.4 ในขั้นตอนนี้สามารถแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ทั้งสิ้น 98 ไอโซเลต จากอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง 27 ไอโซเลต อุตสาหกรรมสีย้อม 60 ไอโซเลต และอุตสาหกรรมอาหาร 11 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 4.1 จากการทดลองพบว่าแอกทิเวเทดสลัดจ์จากระบบบำบัดของอุตสาหกรรมสีย้อมพบแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมากที่สุด อาจเนื่องมาจากความสมบูรณ์ของแร่ธาตุจากสีย้อมที่มีอยู่ในน้ำทิ้งสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (Türğay และคณะ, 2011) นอกเหนือจากสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโมเลกุลใหญ่จากสีย้อม (Phalakornkule และคณะ, 2010) รวบรวมเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมดเก็บเป็นเชื้อตั้งต้นสำหรับการทดลองต่อไปตามวิธีจัดเก็บแบคทีเรียสังเคราะห์แสงข้อ 3.2



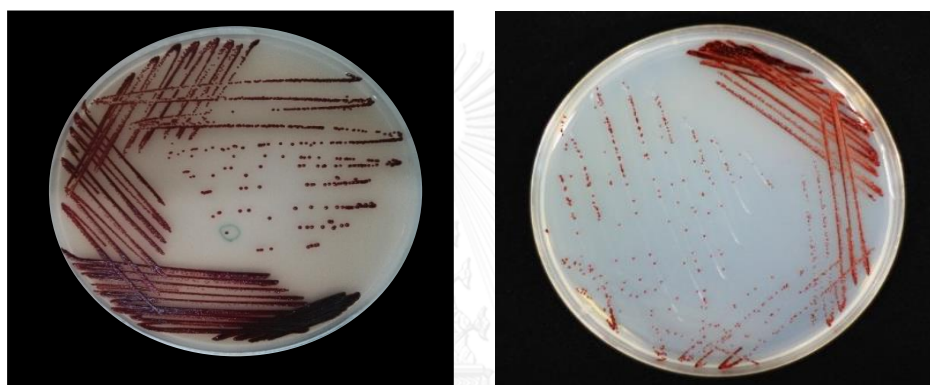
รูปที่ 4.1 แสดงการเพาะเลี้ยง PNSB ในสภาวะ photoheterotroph



รูปที่ 4.2 สีของ PNSB ในอาหารเหลว RCVB ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะ photoheterotroph



รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของ PNSB (สีแดง) เมื่อคัดแยกด้วยวิธี Spread plate



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของ PNSB เมื่อคัดแยกด้วยวิธี Streak plate

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลตัวอย่างตะกอนและไอโซเลตที่คัดแยกได้

ชนิด อุตสาหกรรม	สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของตะกอน	ลักษณะของ ตะกอน	จำนวนไอโซเลต ที่แยกได้
เครื่องสำอาง	บ่อเติมอากาศ	5.5	สีน้ำตาล	14
เครื่องสำอาง	จุดรีเทิร์นสลัดจ์	5.5	สีน้ำตาล	13
สีย้อม	บ่อเติมอากาศ	6.5	สีดำ	23
สีย้อม	จุดรีเทิร์นสลัดจ์	6.5	สีดำ	37
อาหาร	บ่อเติมอากาศ	5.5	สีดำ	6
อาหาร	จุดรีเทิร์นสลัดจ์	5.5	สีดำ	5

4.2 การคัดกรอง PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลได้

4.2.1 การคัดกรอง PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลเบื้องต้น

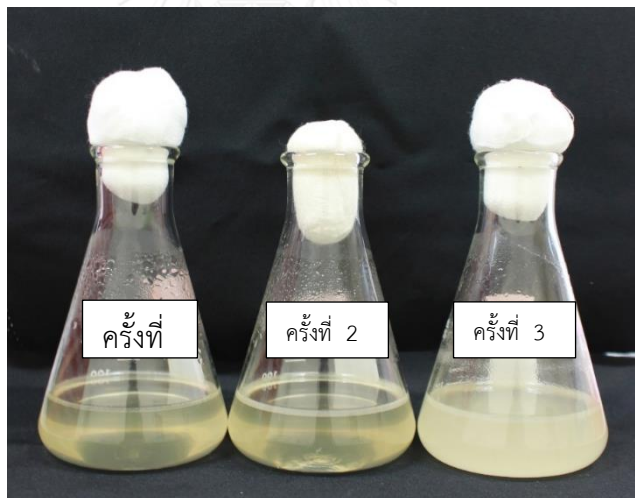
เนื่องจากมี PNSB ที่คัดแยกได้จำนวนมากและการทดสอบการย่อยสลายดีเซลของแต่หลายสายพันธุ์อาจต้องใช้เวลาานาน จึงคัดเลือกโดยการรวม PNSB เป็นกลุ่มอย่างน้อย 10 สายพันธุ์ต่อกลุ่ม ได้ทั้งสิ้น 7 กลุ่ม เนื่องจากในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเหลว LB และเพาะเลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph พบบางไอโซเลตมีลักษณะเป็นตะกอนขนาดใหญ่ สีแดงในขณะที่อาหารยังมีสีเหลืองใสอยู่และถึงแม้จะถ่ายเชื้อใหม่อีกครั้งก็ยังคงเป็นตะกอนสีแดงอยู่ซึ่งไม่ใช่ลักษณะของ PNSB จึงไม่นำมาทดสอบ จากการทดลองพบว่ากลุ่ม G4AS มีความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล สูงสุด คือ 77.81 ± 3.09 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มอื่นมีความสามารถในการย่อยสลายน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.2

4.2.2 การคัดแยก PNSB ที่ย่อยสลายดีเซลสายพันธุ์เดียว

จากผลการทดลองข้อ 4.2.1 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB ในกลุ่ม G4AS น่าจะมีสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายดีเซล จึงทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ของ PNSB แบบแยกสายพันธุ์ ซึ่งเป็นสมาชิกในกลุ่ม G4AS ด้วยวิธีการเดียวกันกับข้อ 4.2.1 จากผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ AS85 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้สูงสุด คือ 79.69 ± 6.51 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นในกลุ่มเดียวกันมีความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกไอโซเลต AS85 มาศึกษาต่อไป ทั้งนี้สายพันธุ์ AS85 เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกจากแอคติเวเทตสลัดจ์ของของโรงงานอุตสาหกรรมสีย้อมซึ่งเคยมีปนเปื้อนน้ำมันเครื่องจักรลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย จึงทำให้แบคทีเรียปรับตัวเพื่อใช้น้ำมันเป็นแหล่งอาหารได้



รูปที่ 4.5 ลักษณะน้ำเลี้ยงเชื้อของ PNSB ในภาวะ chemoheterotroph ในอาหารเหลว LB ระยะเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.6 ลักษณะน้ำเลี้ยงเชื้อของ PNSB ในภาวะ chemoheterotroph ในอาหาร minimum RCVB ที่เติม LB 10 เปอร์เซ็นต์ และ 0.5% ดีเซล ระยะเวลา 2-7 วัน ในชั้นปรับภาวะของเชื้อ PNSB จำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของกลุ่ม PNSB ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน

กลุ่มของแบคทีเรีย	ปริมาณดีเซลที่ย่อยสลาย (%)
ชุดควบคุม	15.70 ± 4.02
G2AS	15.98 ± 1.31
G3AS	20.32 ± 2.72
G4AS	77.81 ± 3.09
G5AS	21.28 ± 2.42
G6AS	23.82 ± 5.34
G7AS	14.97 ± 6.52

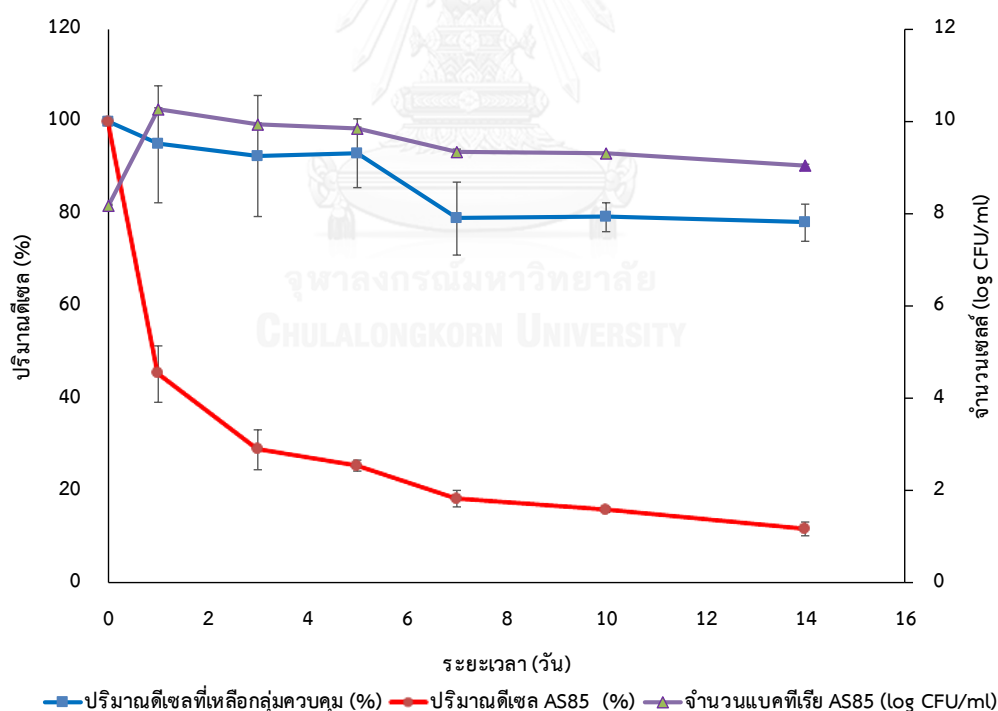
ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของแต่ละไอโซเลตในกลุ่ม G4AS ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณดีเซลที่ย่อยสลาย (%)
ชุดควบคุม	14.34 ± 5.83
AS74	17.96 ± 4.53
AS77	23.47 ± 6.40
AS80	19.44 ± 4.07
AS81	27.35 ± 3.83
AS82	27.51 ± 0.76
AS83	27.66 ± 4.40
AS84	22.54 ± 4.89
AS85	79.69 ± 6.51
AS86	27.70 ± 5.43
AS87	29.95 ± 4.93

4.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ AS85 ในการย่อยสลายดีเซล

4.3.1 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ chemoheterotroph

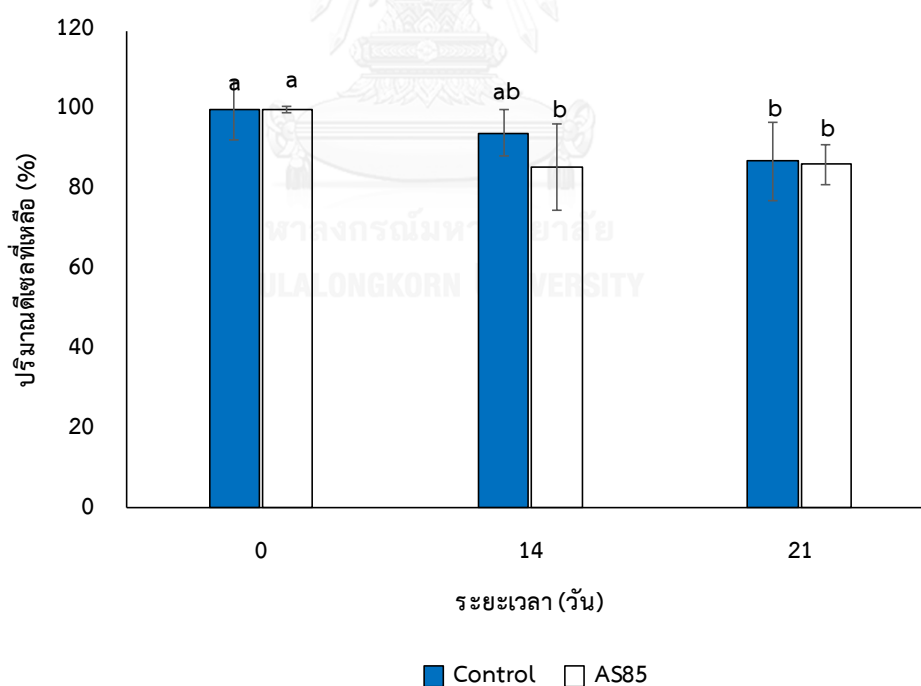
ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลของ PNSB สายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ตามวิธีทดลองในข้อ 3.4.1 พบว่าสายพันธุ์ AS85 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้จนเหลือ 11.72 ± 1.53 เปอร์เซ็นต์ภายใน 14 วัน และสามารถย่อยสลายดีเซลได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (เหลือ 45.24 ± 6.07 เปอร์เซ็นต์) ภายในวันแรกของการทดลอง ในขณะที่ดีเซลในชุดควบคุมยังเหลือมากถึง 78.13 ± 4.044 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 14 วัน จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 10^8 CFU/มิลลิลิตร เป็น 10^{10} CFU/มิลลิลิตร ในวันแรกและลดลงจนเหลือประมาณ 10^9 CFU/มิลลิลิตร ในวันที่ 14 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และเมื่อวิเคราะห์จากข้อมูล GC โครมาโตแกรม พบว่าฟีกในทุกช่วงเวลาลดลงอย่างชัดเจนแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ AS85 สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั้งแบบอะลิฟาติกและอะโรมาติกได้



รูปที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 และความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ chemoheterotroph

4.3.2 ความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ photoheterotroph

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ของสายพันธุ์ AS85 ในภาวะ photoheterotroph ตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.2 เนื่องจากในภาวะ photoheterotroph เซลล์จะมีลักษณะเป็นสีแดง ดังนั้นในการเตรียมหัวเชื้อก่อนการทดลองจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร ผลการทดลองย่อยสลาย 1% ดีเซล ในภาวะ photoheterotroph ที่ระยะเวลา 14 วัน พบว่าสายพันธุ์ AS85 ย่อยสลายดีเซลได้เหลือ 85.64 ± 10.94 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 14 วัน และไม่สามารถลดปริมาณดีเซลลงได้อีกเมื่อบ่มถึง 21 วัน สำหรับชุดควบคุมพบปริมาณดีเซลเหลืออยู่ 94.31 ± 5.65 และ 87.12 ± 9.98 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 14 และ 21 ตามลำดับ จะเห็นว่า การลดลงของดีเซลในชุดที่เติม AS85 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากชุดควบคุมในเวลา 14 วัน และไม่พบการลดลงอีก ($p < 0.05$) แสดงดังรูปที่ 4.8 ทั้งนี้การลดลงของดีเซลในระยะเวลา 14 วันแรกอาจเนื่องมาจากออกซิเจนที่มีอยู่ในอาหารตั้งแต่ต้นทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน และเมื่อออกซิเจนหมดจึงไม่เกิดการย่อยสลายต่อไปได้อีก



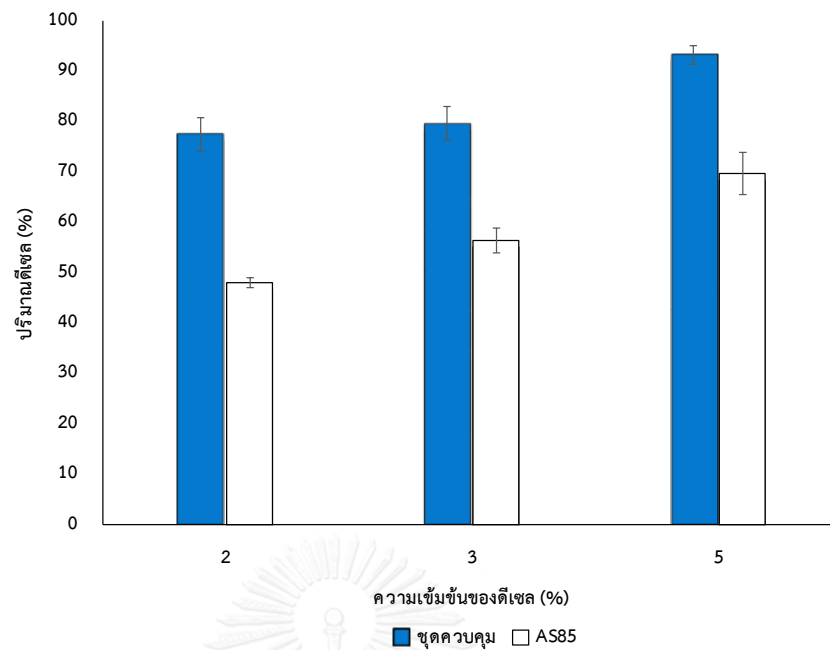
รูปที่ 4.8 ปริมาณดีเซลที่เหลือในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ photoheterotroph โดยสายพันธุ์ AS85

4.3.3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้น 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

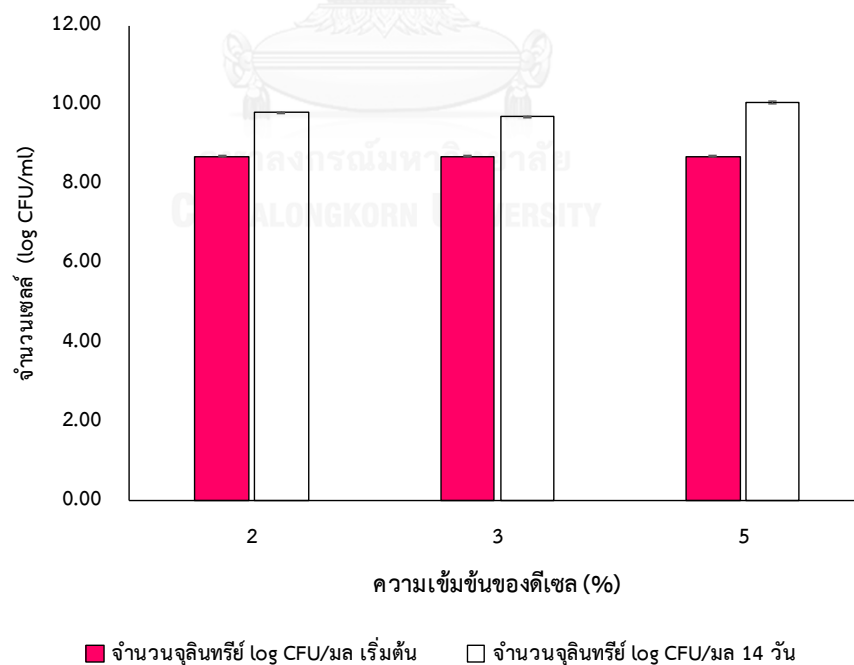
ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้น 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน วิเคราะห์หาปริมาณดีเซลที่เหลือเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อพบว่าที่ความเข้มข้น 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ AS85 ย่อยสลายจนเหลืออยู่ 48.04 ± 1.05 56.41 ± 2.41 และ 69.72 ± 4.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมเมื่อครบกำหนดพบปริมาณดีเซลเหลืออยู่ 77.56 ± 3.25 79.73 ± 3.33 และ 93.36 ± 1.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.9

จากการทดสอบการเจริญของเชื้อ PNSB สายพันธุ์ AS85 ด้วยวิธีการหยดเชื้อบนอาหารแข็ง LB เพาะเลี้ยงระยะเวลา 2-14 วัน ในภาวะ chemoheterotroph ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากเซลล์เริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 2% ดีเซล มีการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นประมาณ 10^9 CFU/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของดีเซลเท่ากับ 3 และ 5% มีการเจริญของแบคทีเรียประมาณ 10^9 และ 10^{10} CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.10

จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 5% ดีเซล มีการเจริญของแบคทีเรียถึง 10^{10} CFU/มิลลิลิตร แสดงว่าแบคทีเรียยังสามารถเจริญได้อีก ดังนั้นถ้าเพิ่มระยะเวลาในการทดลองต่อไปอีกแบคทีเรียอาจจะสามารถย่อยสลายดีเซลได้ต่อไป เช่นเดียวกับแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus licheniformis* *Ochrobactrum tritici* และ *Staphylococcus* sp. ที่มีความสามารถย่อยสลาย 5% ดีเซลที่ปนเปื้อนในดินได้ 75 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาถึง 3 เดือน (Dadransia และ Agamuthu, 2013)



รูปที่ 4.9 การย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลว minimum RCVB โดย PNSB สายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.10 การเจริญที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลว minimum RCVB โดย PNSB สายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph

4.3.4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1%

ทดสอบความสามารถของสายพันธุ์ AS85 ในการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1% ได้แก่ ไบโอดีเซล (B100) E20 E85 G91 G95 และ ULG95 ในภาวะ chemoheterotroph ตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.4 เมื่อครบกำหนด 14 วัน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ผลการทดลองพบว่าปริมาณไบโอดีเซล (B100) เหลืออยู่ 30.40 ± 1.51 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมพบปริมาณไบโอดีเซลเหลืออยู่ 95.51 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วน E20 E85 G91 G95 และ ULG95 จากการทดลองพบว่าทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองไม่พบน้ำมันชนิดต่างๆ เหลืออยู่เลย เมื่อทดลองครบ 7 วัน แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1% ในอาหารเหลว minimum RCVB เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 ระยะเวลา 14 วัน

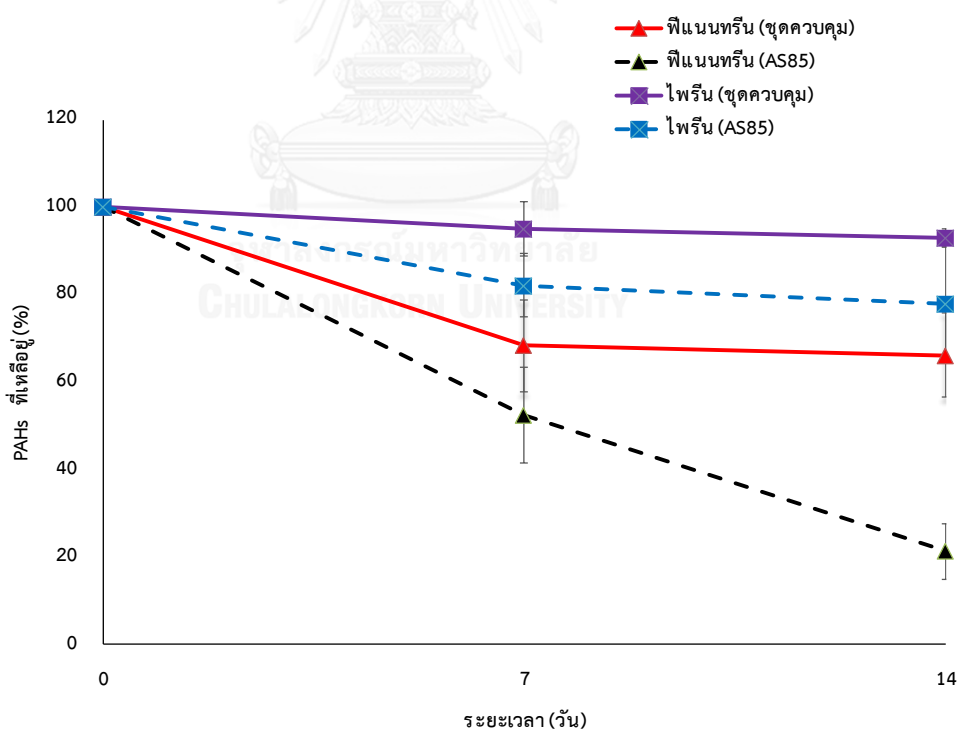
ชนิดของน้ำมัน	ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ (%)	
	ชุดควบคุม	AS85
ไบโอดีเซล (B100)	95.51 ± 0.13	30.40 ± 1.51
E20	0.00	0.00
E85	0.00	0.00
G91	0.00	0.00
G95	0.00	0.00
ULG95	0.00	0.00

4.3.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายพีแนนทรินและไพรีนของ PNSB สายพันธุ์ AS85

จากการทดลองของ Zhao และคณะ (2011) พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodospseudomonas palustris* สายพันธุ์ CQV97 สามารถย่อยสลายพีแนนทรินเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 10 วัน ในภาวะ photoheterotroph แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย PNSB มีความสามารถในการย่อยสลาย PAH ได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าในภาวะ photoheterotroph PNSB สายพันธุ์ AS85 มีความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ได้น้อยกว่าในภาวะ chemoheterotroph ดังนั้นจึงทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายไพรีนและพีแนนทรินของ PNSB สายพันธุ์ AS85 ในภาวะ

chemoheterotroph เท่านั้น ผลการทดลองพบว่าปริมาณพีแนนทรินลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในวันที่ 7 และ 14 โดยเหลือปริมาณพีแนนทริน 52.5 ± 10.95 และ 21.37 ± 6.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม พบปริมาณพีแนนทรินที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร ลดลงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างวันที่ 7 กับ 14 คือเหลือปริมาณพีแนนทรินอยู่ 68.29 ± 10.43 เปอร์เซ็นต์ และ 66.18 ± 9.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้หากเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมกับชุดทดลองที่มี PNSB สายพันธุ์ AS85 พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แสดงดังรูปที่ 4.11

สำหรับการลดลงของไพรีนเมื่อครบกำหนดการทดลองที่ 7 และ 14 วัน พบว่าในชุดทดลองปริมาณไพรีนลดลงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือ เหลือปริมาณไพรีนอยู่ 82.15 ± 7.16 เปอร์เซ็นต์ และ 77.93 ± 12.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับชุดควบคุม ที่ระยะเวลา 7 วัน พบปริมาณไพรีนเหลืออยู่ 95.09 ± 6.24 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 14 วัน พบไพรีนเหลืออยู่ 92.96 ± 1.97 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ทั้งนี้หากเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมกับชุดทดลองพบว่าปริมาณไพรีนลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน ($p > 0.05$) แสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ปริมาณ PAHs ที่เหลือในการทดสอบการย่อยสลายพีแนนทรินและไพรีน โดยสายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph

4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ AS85

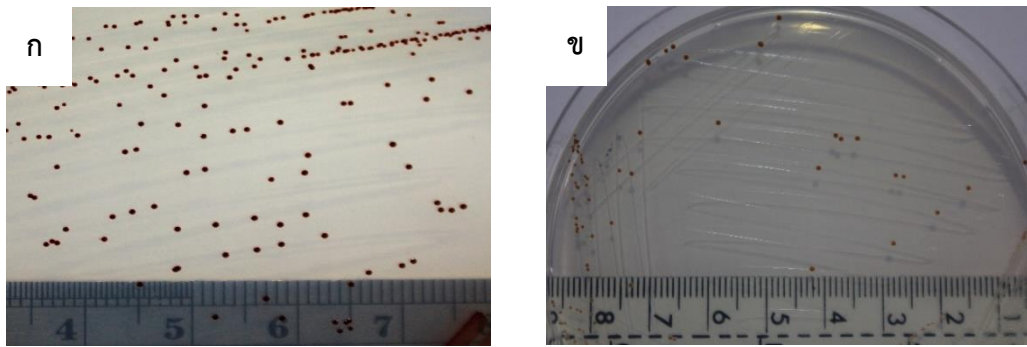
4.4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะสัณฐานวิทยาทางโคโลนีของ PNSB สายพันธุ์ AS85 เมื่อเลี้ยงในภาวะ photoheterotroph บนอาหารแข็ง RCVB คือ กลมมนูน ขอบเรียบ สีแดงเข้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 4.12(ก) และเมื่อเลี้ยงในภาวะ chemoheterotroph บนอาหารแข็ง RCVB มีลักษณะโคโลนี กลมมนูน ขอบเรียบ สีขาว ตรงกลางมีสีออกส้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 4.12(ข) และมีลักษณะเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวเป็นสีแดงถึงแดงออกม่วง ภายใต้ภาวะ photoheterotroph แสดงดังรูปที่ 4.13

จากการทดสอบการปรับเปลี่ยนภาวะการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง RCVB ระหว่างภาวะ photoheterotroph เป็น chemoheterotroph โคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 ที่เลี้ยงแบบ chemoheterotroph จะมีสีแดงอ่อนในการถ่ายเชื้อครั้งแรกจากการเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟ (heterotroph) และสีจะลดลงในการถ่ายเชื้อครั้งถัดไป ในทางกลับกันเมื่อนำโคโลนีที่เพาะเลี้ยงแบบ chemoheterotroph บนอาหารแข็ง RCVB ไปเลี้ยงแบบ photoheterotroph พบว่าต้องใช้เวลามากถึง 26 วันจึงจะเห็นโคโลนีสีแดง

เมื่อเปลี่ยนภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว RCVB ระหว่าง photoheterotroph เป็น chemoheterotroph จะพบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง RCVB แต่การเปลี่ยนสีจะเกิดขึ้นเร็วกว่า กล่าวคือ เซลล์ที่เลี้ยงแบบ chemoheterotroph เมื่อเปลี่ยนเป็น photoheterotroph จะใช้เวลา 5 วัน จึงจะมีสีแดง

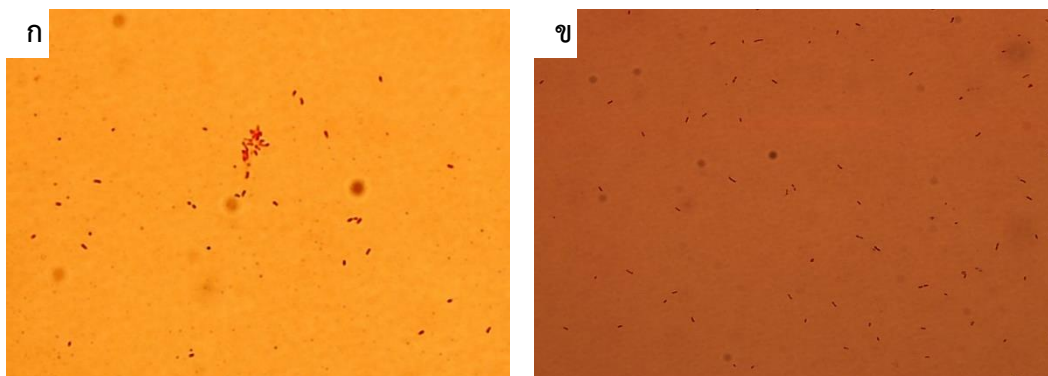
ลักษณะเซลล์ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะติดสีแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้นและสามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารทดสอบการเคลื่อนของเชื้อ (Motility test medium) แสดงดังรูปที่ 4.14 และ 4.15



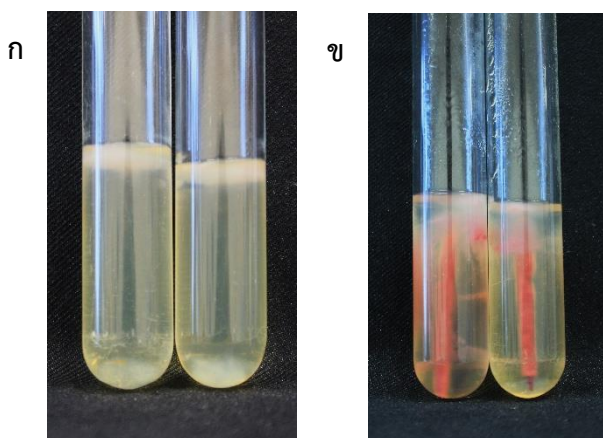
รูปที่ 4.12 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 เมื่อเพาะเลี้ยงในภาวะ photoheterotroph (ก) และภาวะ chemoheterotroph (ข) บนอาหารแข็ง RCVB



รูปที่ 4.13 ลักษณะเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์ AS85 ในอาหารเหลว RCVB ภายใต้ภาวะ photoheterotroph



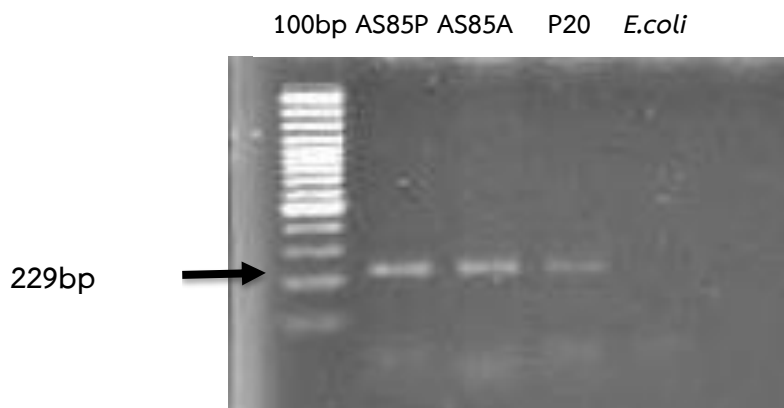
รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ chemoheterotroph (ก) และแบบ photoheterotroph (ข)



รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 ในอาหาร semisolid medium ภายใต้ภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ chemoheterotroph (ก) และ photoheterotroph (ข)

4.4.2 พิสูจน์ยืนยันการเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยการเพิ่มจำนวนยีน *pufM*

เนื่องจากแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีแดงมีหลายชนิด เช่น *Rhodococcus* sp. *Serratia* sp. เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจยืนยันเบื้องต้นว่าสายพันธุ์ AS85 เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจริง การพิสูจน์ยืนยันสามารถทำได้โดยการเพิ่มจำนวน *pufM* ขนาด 229 คู่เบส ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสโปรตีนบริเวณ photosynthetic reaction center ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะคือ *pufM*_557F และ *pufM*_750R (Achenbach และคณะ, 2001) ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 มียีน *pufM* ทั้งที่เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph (AS85P) และภาวะ chemoheterotroph (AS85A) เปรียบเทียบกับ *Escherichia coli* ซึ่งไม่มียีนดังกล่าว และมี *Rhodospseudomonas palustris* สายพันธุ์ 20 (ปูนหอม เหลืองอ่อน, ข้อมูลไม่เปิดเผย) เป็นผลบวกควบคุม แสดงดังรูปที่ 4.17



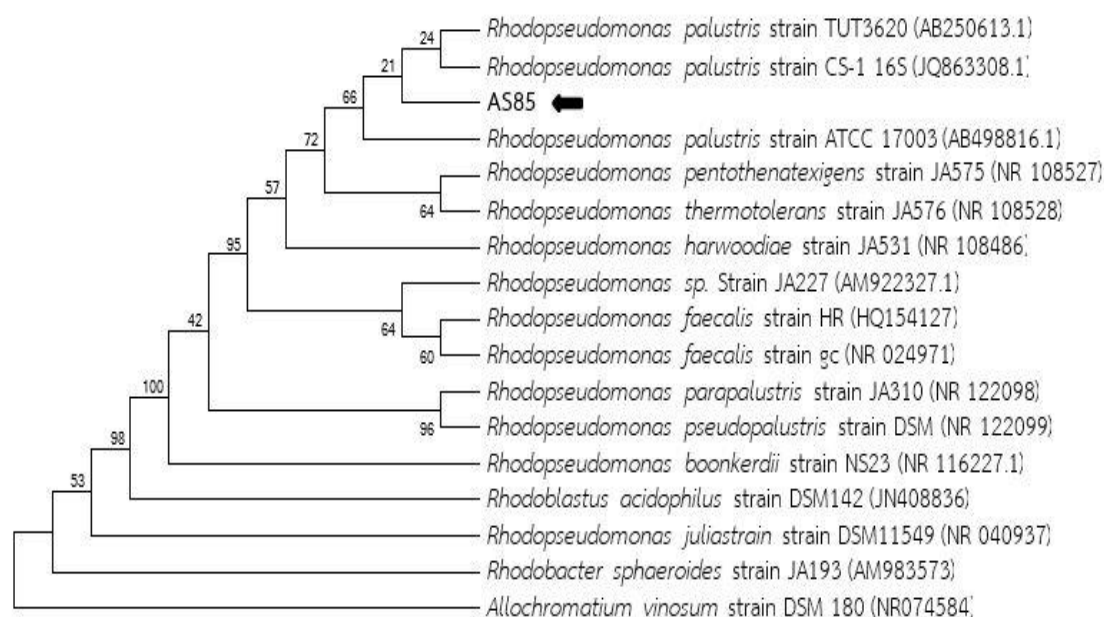
รูปที่ 4.16 ผลิตรหัส PCR จากการเพิ่มจำนวนยีน *pufM* ของสายพันธุ์ AS85 ที่เลี้ยงในภาวะ photoheterotroph (AS85P) และภาวะ chermoheterotroph (AS85A) เปรียบเทียบกับ *Escherichia coli* และ *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ 20

4.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

ผลการส่งวิเคราะห์ยีนบริเวณ 16S rDNA กับบริษัท Macrogen และบ่งชี้สายพันธุ์ของ PNSB ด้วยการเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2 (Bio Edit Sequence Alignment Editor) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ PNSB สายพันธุ์ *Rhodopseudomonas palustris* แสดงดังตารางที่ 4.5 และเมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA บางส่วน (1425bp) กับสายพันธุ์มาตรฐาน (Type strain) ของ PNSB กลุ่มต่างๆ โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0) แสดงให้เห็นว่า PNSB สายพันธุ์ AS85 มีความใกล้เคียงกับ *Rhodopseudomonas palustris* แสดงดังรูปที่ 4.18 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AS85 (ภาคผนวก จ) ได้ฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้หมายเลขเข้าถึง

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 กับฐานข้อมูลใน NCBI โดยใช้โปรแกรม MEGA7

แบคทีเรียในสกุล	identity (%)	Accession	เอกสารอ้างอิง
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	99%	AB689796.1	Wong และคณะ (2014)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> สายพันธุ์ (ATCC 17003)	99%	AB498816.1	Okamura และคณะ (2009)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> สายพันธุ์ (SS55)	99%	D84187.1	Inui และคณะ (2000)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> สายพันธุ์ TUT3620	99%	AB241409.1	Hisada และคณะ (2007)



รูปที่ 4.17 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rDNA ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 กับแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง ตัวเลขที่กิ่งสาขาบ่งบอกถึงผลจากการนับผลซ้ำจากทั้งหมด 1,000 ครั้งด้วย bootstrap

4.5 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีเซลของแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 ในน้ำจืด

ใช้ตัวอย่างน้ำจืดจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ เนื่องจากเป็นคลองสำคัญที่คอยรับน้ำเหนือก่อนระบายลงสู่แม่น้ำเจ้าพระยา บริเวณโดยรอบประกอบด้วยแหล่งชุมชน โรงแรม ร้านอาหาร มีแหล่งอุตสาหกรรมกระจายอยู่ 6-8 จุด มีบ่อบำบัดน้ำเสียอยู่ริมน้ำหรือบริเวณใกล้เคียงประมาณ 7-8 จุด และเป็นเส้นทางคมนาคมของคนในชุมชน (กองสาธารณสุข, 2558) เก็บตัวอย่างบริเวณผิวน้ำ นำไปกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อเอาสิ่งสกปรกออก ลักษณะของตัวอย่างเบื้องต้นเมื่อผ่านการกรองแล้วน้ำมีสีเหลืองใส มีตะกอนเล็กน้อย จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลอง ทดสอบการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในภาวะ chemoheterotroph บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 14 วิเคราะห์หาปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ รวมทั้ง COD BOD ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ

ผลการทดลองพบว่า ชุดทดสอบปลอดเชื้อที่มีแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB สายพันธุ์ AS85 สามารถย่อยสลายดีเซลได้ 57.49 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมปลอดเชื้อพบดีเซลลดลง 10.03 ± 4.38 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดทดสอบไม่ปลอดเชื้อที่มีแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB สายพันธุ์ AS85 พบว่าสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 79.68 ± 1.58 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่ปลอดเชื้อพบปริมาณดีเซลลดลง 14.44 ± 6.48 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.6 และจากการวิเคราะห์ค่า COD BOD ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส พบว่า ชุดทดสอบปลอดเชื้อที่มีแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB สายพันธุ์ AS85 ค่า COD ลดลง 59.41 เปอร์เซ็นต์ BOD ลดลง 10.42 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจนลดลง 91.58 เปอร์เซ็นต์ และฟอสฟอรัสลดลง 51.38 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชุดทดสอบไม่ปลอดเชื้อที่มี PNSB สายพันธุ์ AS85 ค่า COD ลดลง 87.78 เปอร์เซ็นต์ BOD ลดลง 44.23 เปอร์เซ็นต์ และค่าฟอสฟอรัสและไนโตรเจนลดลง 92.19 และ 84.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการลดลงของค่าต่างๆ ในชุดทดสอบปลอดเชื้อมีค่าน้อยกว่าชุดทดสอบไม่ปลอดเชื้อทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียเดิมในน้ำตัวอย่างเองก็มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 4.6 % การลดลงของพารามิเตอร์ต่างๆ และ 1% ดีเซล ในการทดสอบการย่อย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน

การทดลอง	N	P	BOD	COD	1% ดีเซล
	%การ	%การ	%การ	%การ	%การ
	ลดลง	ลดลง	ลดลง	ลดลง	ลดลง
ชุดทดสอบน้ำปลอดเชื้อ+AS85	91.51	51.38	10.42	59.41	57.49±1.20
ชุดทดสอบน้ำไม่ปลอดเชื้อ+AS85	92.19	84.23	44.23	87.78	79.68±1.58
ชุดควบคุมน้ำปลอดเชื้อ	-50	41.89	79.43	41.09	10.03±4.38
ชุดควบคุมน้ำไม่ปลอดเชื้อ	7.14	51.32	17.01	49.2	14.44±6.48

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (PNSB) จากแอคติเวเทดสลัดจ์บริเวณบ่อเติมอากาศและจุลรีเทิร์นสลัดจ์ของระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรม เพิ่มปริมาณเชื้อ PNSB จากตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB ภายใต้ภาวะ photoheterotroph ถ้ามี PNSB ในตัวอย่างสีของอาหารจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีส้มชมพู แดง หรือแดงเข้มจนถึงน้ำตาล ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของ PNSB (Madukasi และคณะ, 2011) และเมื่อคัดแยกได้สายพันธุ์เดี่ยวของ PNSB จะพบโคโลนี กลมมนูน ขอบเรียบ สีส้ม ชมพู แดง จนถึงน้ำตาลแดงบนอาหารแข็ง RCVB ในภาวะ photoheterotroph สามารถคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ทั้งสิ้น 98 ไอโซเลต ซึ่งมาจากแอคติเวเทดสลัดจ์ของโรงงานอุตสาหกรรม สีข้อม 60 ไอโซเลต โรงงานอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง 27 ไอโซเลต และโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร 11 ไอโซเลต

จากนั้นคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายดีเซลได้ โดยแบ่งเป็นกลุ่ม อย่างน้อย 10 โคโลนีต่อกลุ่ม เป็นจำนวน 7 กลุ่ม ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว minimum RCVB ในภาวะ chemoheterotroph พบว่า G4AS เป็นกลุ่มเดียวที่สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้สูงสุด 77.81 ± 3.09 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่กลุ่มอื่นมีความสามารถในการย่อยสลายน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังตารางที่ 4.2) และเมื่อคัดกรองแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวจากกลุ่ม G4AS พบว่าสายพันธุ์ AS85 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้สูงสุด คือ 79.69 ± 6.51 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมพบดีเซลลดลงเพียง 14.34 ± 5.83 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น สายพันธุ์ AS85 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมสีข้อม หลังจากถ่ายเชื้อ 2 ครั้ง ในอาหาร minimum RCVB เสริมด้วย 0.5% ดีเซลเพื่อปรับสภาวะการย่อยสลายของเชื้อ พบว่า สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซล ได้ถึง 88.28 ± 1.53 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่ดีเซลในชุดควบคุมพบดีเซลลดลงเพียง 21.87 ± 4.04 เปอร์เซ็นต์ ในงานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากแอคติเวเทดสลัดจ์ และสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้เป็นครั้งแรก การคัดแยก PNSB จากแอคติเวเทดสลัดจ์เคยมีรายงานมาแล้ว เช่น Liang และคณะ (2010) คัดแยก *Rhodospseudomonas palustris* 4 สายพันธุ์ จากแอคติเวเทดสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสีย เพื่อศึกษาความสามารถในการสะสมพอลิฟอสเฟต โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสแตกต่างกัน

พบว่า *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ G11 สามารถสะสมพอลิฟอสเฟตได้ 13-15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายใต้ภาวะ photoheterotroph Schott และคณะ (2010) คัดแยก *Thiocapsa* sp. สายพันธุ์ KS1 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ LQ17 จากแอ่งที่เวตสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสียจากเมืองคอนสแตนซ์ประเทศเยอรมนี พบว่าสายพันธุ์ KS1 สามารถออกซิไดซ์ไนโตรเจนความเข้มข้น 1 mM เป็นไนเตรตได้ทั้งหมด ในระยะเวลา 2-3 วัน ขณะที่สายพันธุ์ LQ17 ออกซิไดซ์ไนโตรเจนได้น้อยกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ในภาวะไม่มีอากาศ มีแสง ต่อมา Laocharoen และ Reungsang (2014) คัดแยก *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ KKU-PS5 จากตะกอนสลัดจ์ของระบบบำบัดน้ำเสียชนิด Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) หรือถังกรองไร้อากาศแบบไหลขึ้น พบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 1330 mL-H₂ ต่อลิตรของอาหารที่มีมาเลตเป็นแหล่งคาร์บอนและของเสียจากกระบวนการตกผลึกผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจนภายใต้ภาวะมีแสง

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของสายพันธุ์ AS85 กับ แบคทีเรียและกลุ่มแบคทีเรียชนิดอื่นพบว่า AS85 ย่อยสลายได้สูงสุด 88.28 ± 1.53 เปอร์เซ็นต์ที่ ระยะเวลา 14 วัน ซึ่งน้อยกว่า *Acinetobacter baumannii* ที่ย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 99 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิตั้งที่ 35 องศาเซลเซียส (Palanisamy และคณะ, 2014) แต่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* สายพันธุ์ J4AJ และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ U-3 ที่คัดแยกจาก *Scirpus triqueter* ในแหล่งน้ำปนเปื้อนดีเซล ซึ่ง *Pseudomonas* สายพันธุ์ J4AJ สามารถย่อยสลาย 0.6% ดีเซลได้ 42.55 เปอร์เซ็นต์ และ 59.65 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำงานร่วมกับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ U-3 ในระยะเวลา 7 วัน (Zhang และคณะ, 2014) และ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ Z41 ซึ่งสามารถย่อยสลาย 0.5% crude oil ได้ 36.0 - 46.4% ในระยะเวลา 7 วัน (Zhang และคณะ, 2012)

จากการทดสอบความสามารถของสายพันธุ์ AS85 ในการย่อยสลาย 1% ดีเซล ในภาวะ photoheterotroph พบว่าที่ระยะเวลา 14 วัน ย่อยสลายดีเซลได้ไม่ดี นั่นคือเหลือดีเซลมากถึง 85.64 ± 10.94 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถย่อยสลายดีเซลได้อีกแม้บ่มถึง 21 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับ ชุดควบคุมที่พบปริมาณดีเซลเหลืออยู่ 94.31 ± 5.65 และ 87.12 ± 9.98 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 14 และ 21 ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของสายพันธุ์ AS85 ในภาวะ photoheterotroph ไม่ดีเท่ากับภาวะ chemoheterotroph หรืออาจกล่าวได้ว่าไม่ย่อยสลายเลย อาจเนื่องมาจาก ในภาวะ photoheterotroph แบคทีเรียสังเคราะห์แสง PNSB ใช้แสงเป็น แหล่งพลังงานและใช้สารประกอบอินทรีย์ขนาดเล็กจำพวก มาเลต ไพรูเวต ซักซิเนต แลคเตต และ โพรไพโอเนต เป็นแหล่งคาร์บอน (Madigan และ Jung, 2009) นอกจากนี้ในภาวะ photoheterotroph PNSB อยู่ในภาวะ microaerophilic ซึ่งมีออกซิเจนน้อย แต่การย่อยสลาย

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจน ดังรายงานของ Prathiba และคณะ (2014) กล่าวถึงการย่อยสลาย 0.5% (v/v) ดีเซลของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 ว่า ในภาวะมีอากาศแบคทีเรียย่อยสลายดีเซลได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ภาวะไม่มีอากาศย่อยสลายได้เพียง 60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นภาวะ photoheterotroph จึงไม่เหมาะสมกับการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน

เมื่อทดสอบการย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 2 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยสายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน พบว่า ดีเซลลดลงเหลืออยู่ 48.04 ± 1.05 56.41 ± 2.41 และ 69.72 ± 4.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมพบปริมาณดีเซลเหลืออยู่ 77.56 ± 3.25 79.73 ± 3.33 และ 93.36 ± 1.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ AS85 ย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นสูงได้ไม่ด้อย ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อพบว่าที่ความเข้มข้น 5% ของดีเซล เชื้อยังมีการเจริญเติบโตได้คืออยู่ คือเพิ่มจาก 10^8 CFU/มิลลิลิตรเป็น 10^{10} CFU/มิลลิลิตร ดังนั้นหากเพิ่มระยะเวลาการทดลองอาจทำให้การย่อยสลายเพิ่มขึ้นได้

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสายพันธุ์ AS85 ในการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสายพันธุ์ AS85 ย่อยสลายไบโอดีเซล (B100) จนเหลืออยู่ 30.40 ± 1.51 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมพบปริมาณไบโอดีเซลเหลืออยู่มากถึง 95.51 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงดีเซลทางเลือกที่ผลิตจากวัตถุดิบทดแทนเช่นน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ นำมาทำปฏิกิริยาทางเคมี transesterification ร่วมกับเมทานอลจนเกิดเป็นสารเอสเทอร์ที่มีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ไบโอดีเซล (B100) (Phalakornkule และคณะ, 2010) ดังนั้นจึงเกิดการระเหยได้น้อยยืนยันได้จากชุดควบคุมที่ยังพบไบโอดีเซลเหลืออยู่มากถึง 95.51 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ และ PNSB หลายชนิดมีความสามารถย่อยสลายไขมันได้ดี เช่น *Rhodobacter sphaeroides* สามารถบำบัดน้ำมันปนเปื้อนได้ 76 เปอร์เซ็นต์ (Tao และคณะ, 2008) *Rhodopseudomonas palustris* สามารถผลิตไฮโดรเจนโดยมีน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้น (Carlozzi และคณะ, 2010) จึงเป็นเหตุให้ สายพันธุ์ AS85 สามารถย่อยสลายไบโอดีเซลได้

ส่วนการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันแก๊สโซลีน (gasoline) ได้แก่ E20 E85 G91 G95 และ ULG95 ในภาวะ chemoheterotroph พบว่าเมื่อทดสอบครบ 7 วัน ทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุมไม่มีน้ำมันเหลืออยู่เลย ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบของน้ำมันแก๊สโซลีนชนิดต่างๆ เกิดจากการผสมกันของเอทานอล หรือเอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ตามอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เช่น แก๊สโซลีน E20 มีส่วนผสมของเอทานอลไม่เกินร้อยละ 20 และไม่ต่ำกว่าร้อยละ 19 กับน้ำมันแก๊สโซลีนพื้นฐานร้อยละ 80 โดยปริมาตร น้ำมันแก๊สโซลีน E85 มีส่วนผสม

ของเอทานอลร้อยละ 85 กับน้ำมันแก๊สโซลีนพื้นฐานร้อยละ 15 โดยปริมาตรหรือมีเอทานอลไม่ต่ำกว่าร้อยละ 75 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน และ 2559) จากส่วนผสมข้างต้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้น้ำมันต่างๆ ระเหยได้ง่าย และจาก GC โครมาโตแกรมของน้ำมันแก๊สโซลีนชนิดต่างๆ พบว่าช่วงเวลาที่พบพีกของโครมาโตแกรมอยู่ระหว่าง นาทีที่ 1-10 ซึ่งเป็นพีกของไฮโดรคาร์บอนอิมัลชันที่ระเหยง่าย (Zhang และคณะ, 2014)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ AS85 สามารถย่อยสลายพีแนทรีนที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรได้ โดยพบปริมาณพีแนทรีนลดลงเหลือ 21.37 ± 6.39 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 14 วัน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากชุดควบคุม ที่พบไพรีนเหลืออยู่ 77.93 ± 12.91 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 14 วัน มีรายงานการย่อยสลาย PAHs โดย *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ CQV97 ที่สามารถย่อยสลายพีแนทรีนเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 10 วัน ในภาวะ photoheterotroph (Zhao และคณะ, 2011) ประสิทธิภาพของแบคทีเรียชนิดอื่นเช่น *Burkholderia fungorum* ย่อยสลายไพรีน 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ 98.6 ± 1.9 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 20 วัน และ *Mycobacterium gilvum* ย่อยสลายไพรีน 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 99.9 ± 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 16 วัน (Darmawan และคณะ, 2015)

จากการทดสอบข้างต้นพบว่า AS85 สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลในอาหารเหลว minimum RVCB ได้จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 1% ดีเซลของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 ในน้ำตัวอย่างจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ ในภาวะ chemoheterotroph ผลแสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 และแบคทีเรียประจำถิ่นในน้ำตัวอย่างสามารถย่อยสลายดีเซล และลดค่า COD BOD ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ได้ในระยะเวลา 14 วัน และสามารถย่อยสลายดีเซลได้ 79.68 ± 1.58 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการเติม AS85 เพียงชนิดเดียว (น้ำตัวอย่างปลอดเชื้อ) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้อยกว่า คือ 57.49 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่ปลอดเชื้อพบปริมาณดีเซลลดลง 14.44 ± 6.48 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมปลอดเชื้อดีเซลลดลง 10.03 ± 4.38 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ค่า COD BOD ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสพบว่าสายพันธุ์ AS85 สามารถลดค่าต่างๆ ได้ 59.41 10.42 91.58 และ 51.38 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีรายงานจำนวนมากที่แสดงว่า PNSB สามารถใช้ฟอสเฟตและไนเตรตในน้ำเสียได้ (Lu และคณะ, 2013, Hulsen และคณะ, 2014) PNSB สามารถลด COD ในภาวะต่างๆ ได้ เช่น Hulsen และคณะ (2014) พบว่า PNSB สามารถลดค่า COD ในน้ำเสียจากชุมชนในภาวะไร้อากาศได้ประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเดิม 526 ± 99 มิลลิกรัมต่อลิตร) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ Wang และคณะ (2016) ศึกษาความสามารถของ PNSB สายพันธุ์ *Rhodopseudomonas*

sp. ต่อการบำบัด white spirit wastewater พบว่า สามารถลดค่า COD ได้ 76.02 เปอร์เซ็นต์ (จากค่าเดิม 9100-25,600 มิลลิกรัมต่อลิตร)

เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีในภาวะ photoheterotroph บนอาหารแข็ง RCVB คือ กลมมนูน ขอบเรียบ สีแดงเข้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 มิลลิเมตร และภาวะ chemoheterotroph บนอาหารแข็ง RCVB มีลักษณะโคโลนี กลมมนูน ขอบเรียบ สีขาว ตรงกลางมีสีออกส้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 มิลลิเมตร ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ติดสีแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้นและสามารถเคลื่อนที่ได้ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ตรงกับลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมก้ำมะถัน (PNSB) Schott และคณะ (2010) กล่าวถึงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ของ *Rhodospseudomonas* sp. สายพันธุ์ LQ17 ว่า เซลล์ติดสีแกรมลบ รูปร่าง มีการเคลื่อนที่ และเมื่อเติบโตในภาวะมีแสงจะทำให้อาหารเหลวมีสีชมพูจนถึงม่วงหรือแดง ซึ่งสีของอาหารเกิดจากรงควัตถุของ bacteriochlorophylls (BChl a) หรือ BChl b หรือ carotenoids ทำให้เห็นสารแขวนลอยของเซลล์เป็นสี ม่วง แดง ส้ม น้ำตาล หรือน้ำตาลออกเหลือง (Madigan และ Jung, 2009) ซึ่งสายพันธุ์ AS85 มีลักษณะเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวเป็นสีแดงถึงแดงออกม่วงเช่นกันภายใต้ภาวะ photoheterotroph แสดงดังรูปที่ 5.1

อย่างไรก็ตาม แม้สายพันธุ์ AS85 จะแสดงลักษณะเฉพาะในการสร้างรงควัตถุสีแดงและลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ตรงกับลักษณะของ PNSB แต่มีแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถสร้างรงควัตถุสีแดงได้เช่นกัน เช่น *Rhodococcus* sp. และ *Serratia* sp. เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องพิสูจน์ยืนยันการเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยการเพิ่มจำนวนยีน *puf* (photosynthetic unit forming) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสโปรตีนบริเวณ photosynthetic reaction center type II ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Tank และคณะ, 2009) ปัจจุบันพบยีนกลุ่ม *puf* ทั้งหมด 5 รูปแบบ โดยที่ *pufLM* เป็นยีนอนุรักษ์ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *pufL* และ *pufM* เป็นยีนที่รู้จักกันมากที่สุด เนื่องจากมีตำแหน่งที่ไม่แตกต่างกันใน phototrophic purple bacteria แต่แตกต่างกันตรงที่ตำแหน่งที่จะให้ cofactors เข้าไปจับเพื่อให้เกิดกระบวนการ photochemical reaction (Tank และคณะ, 2009) ผลจากการเพิ่มจำนวน *pufM* ขนาด 229 คู่เบส ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะคือ *pufM_557F* และ *pufM_750R* (Achenbach และคณะ, 2001) พบว่า AS85 มีการแสดงออกของยีน *pufM* ทั้งในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะ photoheterotroph และภาวะ chemoheterotroph ในขณะที่ *Escherichia coli* ไม่มียีนดังกล่าว ยืนยันได้ว่า สายพันธุ์ AS85 น่าจะเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจริง จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ขนาด

1425bp ของ PNSB สายพันธุ์ AS85 เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ AS85 มีความใกล้เคียงกับ *Rhodospseudomonas palustris* สายพันธุ์ ATCC 17003 (99%) (Okamura และคณะ, 2009)

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดงชนิดไม่สะสมกัมมะถัน *Rhodospseudomonas palustris* สายพันธุ์ AS85 ได้จากแอ่งที่เวทสไลด์จของระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมสีย้อม ซึ่งสามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 88.28 ± 1.53 เปอร์เซ็นต์ ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน เมื่อทำงานร่วมกับแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวอย่างน้ำจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์ในภาวะเดียวกัน สามารถย่อยสลาย 1% ดีเซลได้ 79.68 ± 1.58 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 14 วัน และสามารถย่อยสลายพีแวนทรีนได้ 78.63 ± 6.39 เปอร์เซ็นต์ ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน

สายพันธุ์ AS85 นับเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงชนิดแรกที่มีรายงานการย่อยสลาย 1% ดีเซลได้และให้ผลการบำบัดดีเซลในน้ำจืดได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 14 วัน จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำที่มีการปนเปื้อนดีเซลได้ เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถใช้ซับสเตรตในการดำรงชีวิตได้หลายชนิดจึงน่าจะยังคงอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมหลังจากดีเซลหมดไป และเมื่อมีการปนเปื้อนดีเซลซ้ำก็สามารถเจริญเติบโตและย่อยสลายดีเซลได้จึงไม่จำเป็นต้องเติมเชื้อใหม่อีก ยิ่งไปกว่านั้นยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนหรือกลไกการย่อยดีเซลจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง จึงน่าสนใจที่จะศึกษาต่อไป

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

1. แอกทิเวตสล็อตจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจำนวนมากน่าจะเป็นแหล่งที่ดีที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงแดง ซึ่งจะทำให้ได้ PNSB ที่มีความสามารถย่อยสลายดีเซลได้ดีขึ้น
2. การตรึงแบคทีเรียในวัสดุต่างๆ จะสามารถช่วยให้แบคทีเรียรอดชีวิต ย่อยสลายสารพิษได้ดีขึ้น และสามารถใช้ซ้ำได้ ดังนั้นควรทดลองตรึงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง AS85 และทดสอบใช้บำบัดดีเซล
3. หากต้องการย่อยสลายดีเซลความเข้มข้นสูงๆ เช่น 5% ดีเซล อาจเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลายให้สูงขึ้นเนื่องยังมีอัตราการเจริญของเชื้ออยู่
4. ควรศึกษายินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายดีเซลหรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิธีการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน



รายการอ้างอิง

- Achenbach, L.A., Carey, J. and Madigan, M.T. (2001) Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7): 2922-2926.
- Alrumman, S.A., Standing, D.B. and Paton, G.I. (2015) Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University Science*. 27(1): 31-41.
- Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S. and Al-Sabri, A.E. (2016) Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23(2): 211-218.
- Assawamongkholisiri, T., Plangklang, P. and Reungsang, A. (2016) Photofermentation and lipid accumulation by *Rhodobacter* sp. KKU-PS1 using malic acid as a substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41(15): 6259-6270.
- Baldawi, I.A., Abdullah, S.R.S., Suja, F., Anuar, N. and Idris, M. (2013) Phytotoxicity test of *Scirpus grossus* on diesel-contaminated water using a subsurface flow system. *Ecological Engineering*. 54: 49-56.
- Bhatia, S. and Sharma, D.K. (2010) Bidesulfurization of dibenzothiophene its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea agglomerans* D23W3. *Biochemical Engineering Journal*. 50(3): 104-109.
- Bianchi, L., Mannelli, F., Viti, C., Adessi, A. and De Philippis, R. (2010) Hydrogen-producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). *International Journal of Hydrogen Energy*. 35(22): 12216-12223.
- Carlozzi, P., Buccioni, A., Minieri, S., Pushparaj, B., Piccardi, R., Ena, A. and Pintucci, C. (2010) Production of bio-fuels (hydrogen and lipids) through a photofermentation process. *Bioresource Technology*. 101: 3115-3120.
- Chan, H. (2011) Biodegradation of petroleum oil achieved by bacteria and nematodes in contaminated water. *Separation and Purification Technology*. 80: 459-466.
- Chilcott, R.P. and Hq, C. (2011) HPA Compendium of chemical hazards diesel. *Health Protection Agency*. 3: 2-33.

- Dadrasnia, A. and Agamuthu, P. (2013) Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 769–778.
- Dadrasnia, A. and Agamuthu, P. (2013) Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 10(4): 769-778.
- Darmawan, R., Nakata, H., Ohta, H., Niidome, T., Takikawa, K. and Morimura, S. (2015) Isolation and evaluation of PAH degrading bacteria. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*. 6(3): 1-7.
- Das, N. and Chandran, P. (2010) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*. 2011: 1-13.
- Dussán, J. and Numpaque, M. (2012) Degradation of diesel a component of the explosive ANFO by bacteria selected from an open cast coal mine in La Guajira, Colombia. *Journal of Bioprocess Biotechniq.* 2(4): 1-5.
- Goldstein, D.B., Osofsky, H.J. and Lichtveld, M.Y. (2011) The gulf oil spill. *The New England Journal of Medicine*. 364: 1334-1348.
- Hisada, T., Okamura, K. and Hiraishi, A. (2007) Isolation and characterization of phototrophic purple nonsulfur bacteria from Chloroflexus and cyanobacterial Mats in Hot Springs. *Microbes and Environments*. 22: 405-411.
- Hulsen, T., Batstone, D.J. and Keller, J. (2014) Phototrophic bacteria for nutrient recovery from domestic wastewater. *Water Research*. 50: 18-26.
- Inui, M., Roh, J.H., Zahn, K. and Yukawa, H. (2000) Sequence analysis of the cryptic plasmid pMG101 from *Rhodospseudomonas palustris* and construction of stable cloning vectors. *Applied Environmental Microbiol.* 66(1): 54-63.
- Jagtap, S.S., Woo, S.M., Kim, T.S., Dhiman, S.S., Kim, D. and Lee, J.K. (2014) Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. *The Science and Technology of Fuel and Energy*. 116: 292-298.
- Jamil, Z., Mohamad Annuar, M.S., Ibrahim, S. and Vikineswary, S. (2009) Optimization of phototrophic hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris*

- PBUM001 via statistical experimental design. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34(17): 7502-7512.
- Kantachote, D., Kornochalert, N. and Chaiprapat, S. (2010) The use of the purple non sulfur bacterium isolate P1 and fermented pineapple extract to treat latex rubber sheet wastewater for possible use as irrigation water. *African Journal of Microbiology Research* 4: 2296-2308.
- Kien, N.B., Kong, I.S., Lee, M.G. and Kim, J.K. (2010) Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37(5): 521-529.
- Kornochalert, N., Kantachote, D., Chaiprapat, S. and Techkarnjanaruk, S. (2014) Bioaugmentation of latex rubber sheet wastewater treatment with stimulated indigenous purple nonsulfur bacteria by fermented pineapple extract. *Electronic Journal of Biotechnology*. 17(4): 174-182.
- Laocharoen, S. and Reungsang, A. (2014) Isolation characterization and optimization of photo-hydrogen production conditions by newly isolated *Rhodobacter sphaeroides* KKU-PS5. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39(21): 10870-10882.
- Liang, C.M., Hung, C.H., Hsu, S.C. and Yeh, I.C. (2010) Purple nonsulfur bacteria diversity in activated sludge and its potential phosphorus-accumulating ability under different cultivation conditions. *Applied Microbiology Biotechnology*. 86(2): 709-719.
- Liu, X., Wang, Z., Zhang, X., Wang, J., Xu, G., Cao, Z., Zhong, C. and Su, P. (2011) Degradation of diesel-originated pollutants in wetlands by *Scirpus triqueter* and microorganisms *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 1967-1972.
- Lohi, A., Alvarez Cuenca, M., Anania, G., Upreti, S.R. and Wan, L. (2008) Biodegradation of diesel fuel-contaminated wastewater using a three-phase fluidized bed reactor. *Journal of Hazardous Materials*. 154: 105-111.
- Lu, H., Zhang, G., Dai, X. and He, C. (2010) Photosynthetic bacteria treatment of synthetic soybean wastewater: Direct degradation of macromolecules. *Bioresource Technology*. 101(19): 7672-7674.

- Lu, H., Zhang, G., Lu, Y., Zhang, Y., Li, B. and Cao, W. (2016) Using co-metabolism to accelerate synthetic starch wastewater degradation and nutrient recovery in photosynthetic bacterial wastewater treatment technology. *Environmental Technology*. 37(7): 775-784.
- Lu, H., Zhang, G., Dai, X., Schideman, L., Zhang, Y., Li, B. and Wang, H. (2013) A novel wastewater treatment and biomass cultivation system combining photosynthetic bacteria and membrane bioreactor technology. *Desalination*. 322: 176-181.
- Luepromchai, E., Lertthamrongsak, W., Pinphanichakarn, P., Thaniyavarn, S., Pattaragulwanit, K. and Juntongjin, K. (2007) Biodegradation of PAHs in petroleum-contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 29(2): 515-527.
- Maddela, N.R., Reyes, J.J.M., Viafara, D. and Gooty, J.M. (2015) Biosorption of copper (II) by the microorganisms isolated from the crude-oil-contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination International Journal*. 24(8): 898-908.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. and (2012) *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education Inc., Benjamin Cummings. San Francisco.
- Madigan, M.T. and Jung, D.O. (2009) An overview of purple bacteria: Systematics physiology and habitats. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. 28: 1-15.
- Madukasi, E.I., Chunhua, H. and Zhang, G. (2011) Isolation and application of a wild strain photosynthetic bacterium to environmental waste management. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 8: 513-522.
- Madukasi, E.I., Dai, X., He, C. and Zhou, J. (2010) Potentials of phototrophic bacteria in treating pharmaceutical wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 7: 165-174.
- Mahalingam, P.U. and Sampath, N. (2014) Isolation, characterization and identification of bacterial biosurfactant. *European Journal of Experimental Biology*. 4: 59-64.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N. and Naidu, R. (2011) Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*. 37(8): 1362-1375.

- Moreira, I.T.A., Oliveira, O.M.C., Triguís, J.A., dos Santos, A.M.P., Queiroz, A.F.S., Martins, C.M.S., Silva, C.S. and Jesus, R.S. (2011) Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemical Journal*. 99(2): 376-382.
- Mortazavi, B., Horel, A., Beazley, M.J. and Sobecky, P.A. (2013) Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. *Journal of Hazardous Materials*. 244–245: 537–544.
- Nwinyi, O.C., Kanu, I.A., Tunde, A. and Ajanaku, K.O. (2014) Characterization of diesel degrading bacterial species from contaminated tropical ecosystem. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57(5): 789-796.
- Okamura, K., Takata, K. and Hiraishi, A. (2009) Intrageneric relationships of members of the genus *Rhodopseudomonas*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 55(6): 469-478.
- Palanisamy, N., Ramya, J., Kumar, S., Vasanthi, N.S., Chandran, P. and Khan, S. (2014) Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 14: 142.
- Peixoto, P.S., Vermelho, A.B. and Rosado, A.S. (2011) Petroleum-degrading enzymes: Bioremediation and new prospects. *Enzyme Research* 2011: 1-7.
- Phalakornkule, C., Polgumhang, S., Tongdaung, W., Karakat, B. and Nuyut, T. (2010) Electrocoagulation of blue reactive red disperse and mixed dyes and application in treating textile effluent. *Journal of Environmental Management*. 91(4): 918-926.
- Prathiba, G.J., Keerthi, K., Deshpande, A., Bhattacharya, S. and Priyadarsini, R.I. (2014) Molecular identification of the isolated diesel degrading bacteria and optimization studies. *Journal Biochemical Technology Society*. 5: 727-730.
- Sasaki, K., Watanabe, M., Suda, Y., Ishizuka, A. and Noparatnaraporn, N. (2005) Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100(5): 481-488.

- Schott, J., Griffin, B.M. and Schink, B. (2010) Anaerobic phototrophic nitrite oxidation by *Thiocapsa* sp. strain KS1 and *Rhodopseudomonas* sp. strain LQ17. *Microbiology*. 156: 2428-2437.
- Seviour, R.J. and Nielsen, P.H. (2010) Microbial ecology of activated sludge. *International Water Association London, United Kingdom*
- Sharma, A., Kumar, P. and Rehman, M.B. (2014) Biodegradation of diesel hydrocarbon in soil by bioaugmentation of *Pseudomonas aeruginosa*: A laboratory scale study. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*. 2(4): 202-212.
- Silva, D.S.P., Cavalcanti, D.L., Melo, E.J.V., Santos, P.N.F., Luz, E.L.P., Gusmao, N.B. and Sousa, M.F.V.Q. (2015) Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 97: 85-89.
- Tank, M., Thiel, V. and Imhoff, J.F. (2009) Phylogenetic relationship of phototrophic purple sulfur bacteria according to *pufL* and *pufM* genes. *International Microbiology*. 12: 175-185.
- Tao, Y., He, Y., Wu, Y., Liu, F., Li, X., Zong, W. and Zhou, Z. (2008) Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33: 963-973.
- Türgay, o., Ersöz, G., Atalay, S., Forss, J. and Welander, U. (2011) The treatment of azo dyes found in textile industry wastewater by anaerobic biological method and chemical oxidation. *Separation and Purification Technology* 79 26–33.
- Tyagi, M., da Fonseca, M.M. and de Carvalho, C.C. (2011) Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. 22: 231-241.
- Wang, H., Zhang, G., Peng, M., Zhou, Q., Li, J., Xu, H. and Meng, F. (2016) Synthetic white spirit wastewater treatment and biomass recovery by photosynthetic bacteria: Feasibility and process influence factors. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 113: 134-138.

- Wattayakorn, G. (2012) Petroleum pollution in the gulf of Thailand: A historical review. *Coastal Marine Science*. 35: 234–245.
- White, D., Drummond, J. and Fuqua, C. (2011) Photosynthesis, The physiology and biochemistry of prokaryotes. *Oxford University Press*. 149-170.
- Wong, W.T., Tseng, C.H., Hsu, S.H., Lur, H.S., Mo, C.W., Huang, C.N., Hsu, S.C., Lee, K.T. and Liu, C.T. (2014) Promoting effects of a single *Rhodopseudomonas palustris* inoculant on plant growth by *Brassica rapa chinensis* under low fertilizer input. *Microbes and Environments*. 29(3): 303-313.
- Wu, J., Wang, Y. and Lin, X. (2013) Purple phototrophic bacterium enhances stevioside yield by *Stevia rebaudiana* bertonii via foliar spray and rhizosphere irrigation. *The Public Library of Science*. 8(6): e67644.
- Wu, P., Zhang, G., Li, J., Lu, H. and Zhao, W. (2012) Effects of Fe^{2+} concentration on biomass accumulation and energy metabolism in photosynthetic bacteria wastewater treatment. *Bioresource Technology*. 119: 55-59.
- Wu, S.C., Liou, S.Z. and Lee, C.M. (2012) Correlation between bio-hydrogen production and polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5. *Bioresource Technology*. 113: 44-50.
- Yu, S., Li, S., Tang, Y. and Wu, X. (2011) Succession of bacterial community along with the removal of heavy crude oil pollutants by multiple biostimulation treatments in the Yellow River Delta, China. *Journal of Environmental Sciences*. 23: 1533-1543.
- Zhang, T., Shao, M.F. and Ye, L. (2012) 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *International Society for Microbial Ecology*. 6(6): 1137-1147.
- Zhang, X., Liu, X., Wang, Q., Chen, X., Li, H., Wei, J. and Xu, G. (2014) Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triquetus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 87: 99-105.
- Zhao, L., Zhao, C. and Han, D. (2011) Anaerobic utilization of phenanthrene by *Rhodopseudomonas palustris*. *Biotechnology Letters Journal*. 33 2135–2140.
- กรมธุรกิจพลังงาน (2556) "ประกาศกรมธุรกิจพลังงานเรื่อง" กำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันดีเซล พ.ศ. 2556. ราชกิจจานุเบกษา 130 (29 มกราคม 2556): 70-72.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน (2559).

[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.dede.go.th/main.php?filename=TheKing9>.

กองสาธารณสุข. (2558) รายงานผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำในคลองรังสิต-ประยูรศักดิ์.

การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ฝ่ายจัดการเชื้อเพลิง (2559) กระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ.

[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www2.egat.co.th/fuel/index.php>.

ปิยนุช นาคพงศ์ (2555) สารเคมีปิโตรเลียม. ทริบเบิลกรุ๊ปจำกัด. กรุงเทพมหานคร.

อลิสา วังโน (2554) การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB (RCVB broth) (Tao และคณะ, 2008)

ก.

กรดมาลิก (DL-malic acid)	4	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.75	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.85	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	2.8	มิลลิกรัม
ไดโซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.75	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.24	มิลลิกรัม
แมงกานีส(II)ซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	2.1	มิลลิกรัม
คอปเปอร์(II)ไนเตรตไตรไฮเดรต ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$)	0.04	มิลลิกรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.75	มิลลิกรัม
เอทิลีนไดเอมีนเททราอะซีติกแอติก (EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	2	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	11.8	มิลลิกรัม

ข.

วิตามินบีหนึ่ง (Vitamin B1)	5	มิลลิกรัม
ไบโอติน (Biotin)	0.1	มิลลิกรัม
นิโคตินาไมด์ (nicotinamide)	10	มิลลิกรัม

วิธีเตรียม stock solution

วิตามินบีหนึ่ง (Vitamin B1) ความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งวิตามินบีหนึ่ง 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยแอลกอฮอล์
เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ 10 มิลลิลิตร

ไบโอติน (Biotin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งไบโอติน 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 25
เปอร์เซ็นต์ให้ได้ 10 มิลลิลิตร

นิโคตินาไมด์ (nicotinamide) ความเข้มข้น 10000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งนิโคตินาไมด์ 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

ทำการเตรียมสารดังกล่าวตามวิธีข้างต้น จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรอง
สำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตทขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร เติมหายหลังการฆ่าเชื้ออาหารส่วน ก
ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในส่วน ก ทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็น
กรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่ง
ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15
นาที ภายหลังการฆ่าเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนเย็นลงก่อนเติมส่วนผสมส่วน ข (stock solution) ถ้า
ต้องการ สารปฏิชีวนะนิสตาตินความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อป้องกันการเจริญของรา

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimum RCVB

เตรียมเช่นเดียวกับกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RCVB แต่ตัดกรดมาลิกซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน
หลักและส่วนผสมในส่วน ข ออก และเสริมด้วยสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 0.02
เปอร์เซ็นต์

3. อาหารแข็ง RCVB (RCVB agar)

เตรียมอาหาร RCVB ส่วน ก เติมน้ำ (bacto agar) 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร นำไป
นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
15 นาที เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเติม
สารอาหารส่วน ข ถ้าต้องการ เติมสารปฏิชีวนะนิสตาตินความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อ
ป้องกันการเจริญของรา

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารแข็ง LB (LB agar)

เตรียมอาหาร LB เสริมด้วยวุ้น (bacto agar) 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร นำไปนึ่งด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Motility test

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

ซังโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. เอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

ละลายเอทานอลความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ซังโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

4. สารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 12 นอร์มัล ปริมาตร 8.33 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร (ทำในตู้ดูดควัน)

5. สารละลายนิสเตตินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซังนิสเตติน 400 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 10 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร เก็บในที่ไม่มีแสง

6. สารละลายฟิแนนทรินความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซังฟิแนนทริน 100 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 20 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร เก็บในที่ไม่มีแสง

7. สารละลายไพรีนความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซังไพรีน 100 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 20 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร เก็บในที่ไม่มีแสง

8. อะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ผงอะกาโรสเจล	2	กรัม
1X TAE บัฟเฟอร์	100	มิลลิลิตร

ละลายผงอะกาโรสเจลใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ต้มให้ความร้อนจนผงเจลเข้ากับตัวทำละลายเป็นอย่างดี เทลงในแม่พิมพ์ที่มีช่องใส่ตัวอย่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนอะกาโรสแข็งตัว

9. บัฟเฟอร์ 1X Tris-acetate TAE

Trozma base	121	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุเป็น 1 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน

100 bp DNA ladder	3	ไมโครลิตร
6X loading dye	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุ	2	ไมโครลิตร
ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน		

ภาคผนวก ค

1 การคำนวณปริมาณดีเซล ไบโอดีเซล (B100) และเบนซินชนิดต่างๆ E20 E85 G91 G95 และ ULG95

ดีเซล คำนวณปริมาณดีเซลในการทดลองโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าสูงที่สุดทั้งหมด 18 พิค ที่เวลา 2.6 3.0 3.5 4.2 5.0 6.0 7.4 9.3 11.4 13.9 16.7 19.6 22.5 25.4 28.3 31.2 33.8 และ 36.0 นาที

ไบโอดีเซล (B100) คำนวณปริมาณไบโอดีเซล (B100) ในการทดลองโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าสูงที่สุดทั้งหมด 6 พิค ที่เวลา 7.6 11.8 17.4 22.2 22.5 และ 23.1 นาที

แก๊สโซฮอล์ E20 คำนวณปริมาณแก๊สโซฮอล์ E20 ในการทดลองโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าสูงที่สุด ทั้งหมด 13 พิค ที่เวลา 2.1 2.4 2.5 2.8 2.9 3.0 3.1 3.2 3.3 3.4 3.7 3.9 และ 4.2 นาที

แก๊สโซฮอล์ E85 คำนวณปริมาณแก๊สโซฮอล์ E85 ในการทดลองโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าสูงที่สุด ทั้งหมด 6 พิค ที่เวลา 2.1 2.4 2.5 2.8 3.0 และ 3.1 นาที

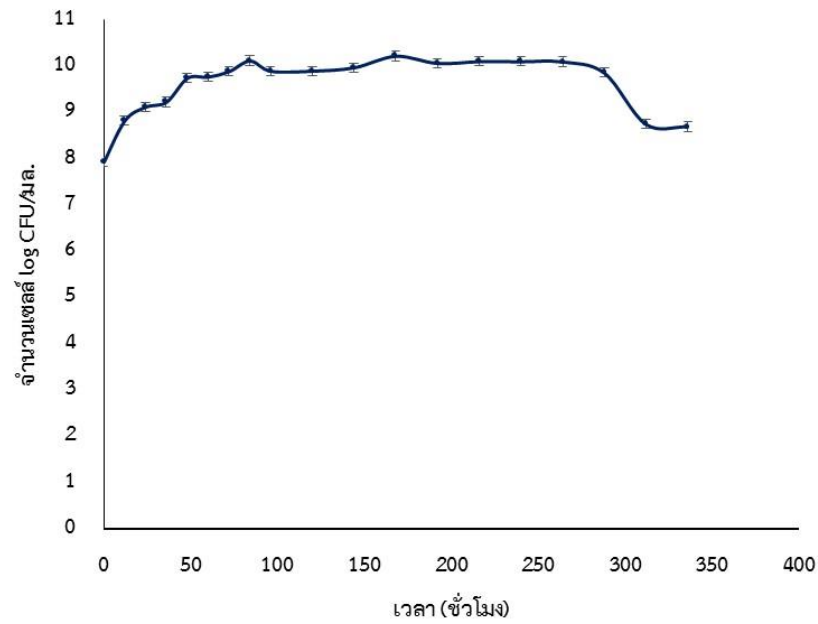
แก๊สโซฮอล์ G91 คำนวณปริมาณแก๊สโซฮอล์ G91 ในการทดลองโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าสูงที่สุด ทั้งหมด 16 พิค ที่เวลา 2.1 2.2 2.41 2.47 2.53 2.56 2.8 2.9 3.0 3.1 3.3 3.44 3.49 3.7 3.9 และ 4.2 นาที

แก๊สโซฮอล์ G95 คำนวณปริมาณแก๊สโซฮอล์ G95 ในการทดลองโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าสูงที่สุด ทั้งหมด 17 พิค ที่เวลา 2.1 2.47 2.56 2.6 2.81 2.84 2.9 3.0 3.1 3.25 3.28 3.3 3.44 3.49 3.7 3.9 และ 4.2 นาที

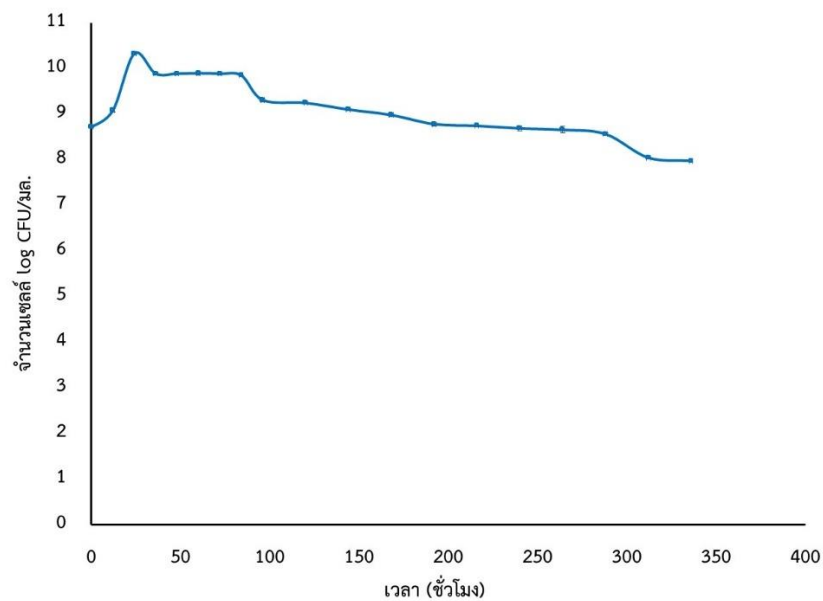
เบนซิน ULG95 คำนวณปริมาณเบนซิน ULG 95 ในการทดลองโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าสูงที่สุด ทั้งหมด 17 พิค ที่เวลา 2.1 2.84 2.9 3.0 3.1 และ 3.7 นาที

ภาคผนวก ง

รูปที่ ง.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 (Growth Curve) ในอาหาร RCVB ภาวะ photoheterotroph



รูปที่ ง.2 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย PNSB สายพันธุ์ AS85 (Growth Curve) ในอาหาร TSB ภาวะ chemoheterotroph



ภาคผนวก จ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ AS85 (1425bp)

0 5'-GCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCGTAGCAATAC 60
 61 GTCAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAACAACACAG 120
 121 GGAAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGGGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCG 180
 181 GCCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCT 240
 241 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGG 300
 301 CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGA 360
 361 TGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAATGACGGTACCGCAAGAA 420
 421 TAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTC 480
 481 GGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGGTTTCTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGA 540
 541 GCTCAACTCCAGAACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGCAGAGGTGAGTGGAA 600
 601 CTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT 660
 661 CACTGGGCCATTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC 720
 721 CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCCAGCCGTTAGTGGGTTTACTCACTAGTGGC 780
 781 GCAGCTAACGCTTAAGCATTTCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAG 840
 841 GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAG 900
 901 AACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCAGGACCGGTGCGAGAGACGTGACCTTCTCTTCGGA 960
 961 GCCTGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG 1020
 1020 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGA 1080
 1080 GACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTAC 1140
 1141 GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCTAAGGGGTGACCCTT 1200
 1201 CGCAAATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGGGCTCTGCAACTCGAGCCCATGAAGT 1260
 1261 TGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATC 1320
 1321 ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTACCTGAAGACGGTGGCTAACCCAGCAAT 1380
 1381 GGGGGCAGCCGGCCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGT -3' 1425

ภาคผนวก ฉ

ตารางที่ ฉ.1 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ AS85 และความสามารถในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ chemoheterotroph

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ (%)		จำนวนแบคทีเรีย (AS85) (logCFU/ml)
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง (AS85)	
1	95.12 ± 12.65	45.42 ± 6.07	10.267 ± 0.024
3	92.59 ± 13.11	28.90 ± 4.36	9.937 ± 0.030
5	83.1 ± 7.36	25.44 ± 1.10	9.855 ± 0.017
7	79.01 ± 7.92	18.31 ± 1.74	9.349 ± 0.059
10	79.30 ± 3.07	15.87 ± 0.69	9.301 ± 0.011
14	78.13 ± 4.04	11.72 ± 1.53	9.048 ± 0.023

ตารางที่ ฉ.2 ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ในการย่อยสลาย 1% ดีเซลในภาวะ photoheterotroph โดยสายพันธุ์ AS85

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ (%)	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง (AS85)
0	100.00 ± 7.46 ^a	100.00 ± 0.85 ^a
14	94.31 ± 5.65 ^{ab}	85.64 ± 10.94 ^b
21	87.12 ± 9.98 ^b	86.41 ± 5.05 ^b

ตารางที่ ๓.3 การย่อยสลายดีเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ และการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว minimum RCVB ในภาวะ chemoheterotroph ระยะเวลา 14 วัน

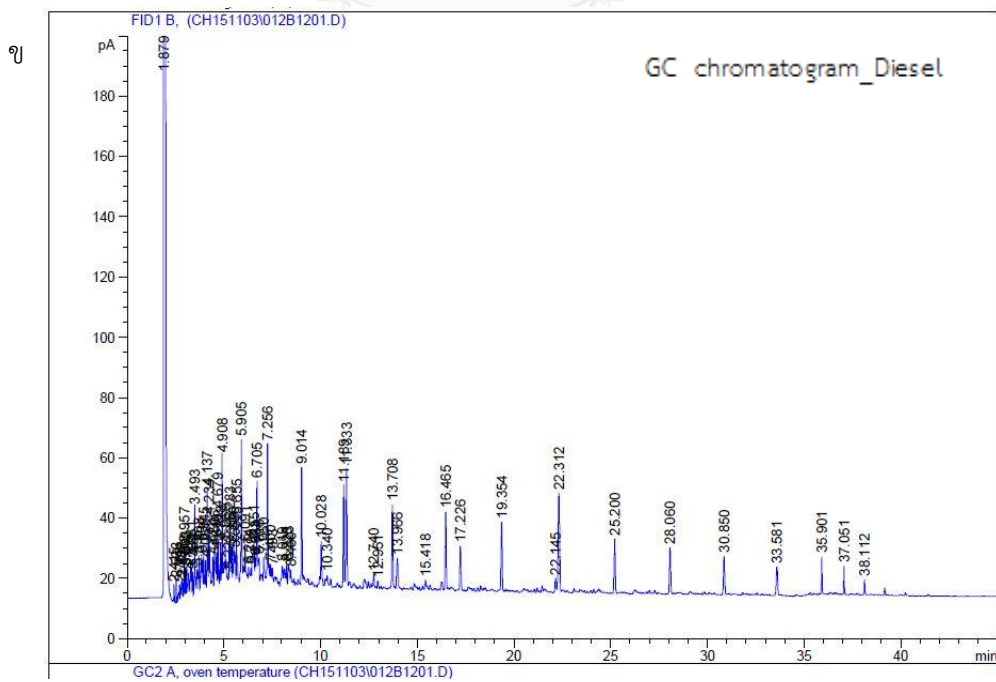
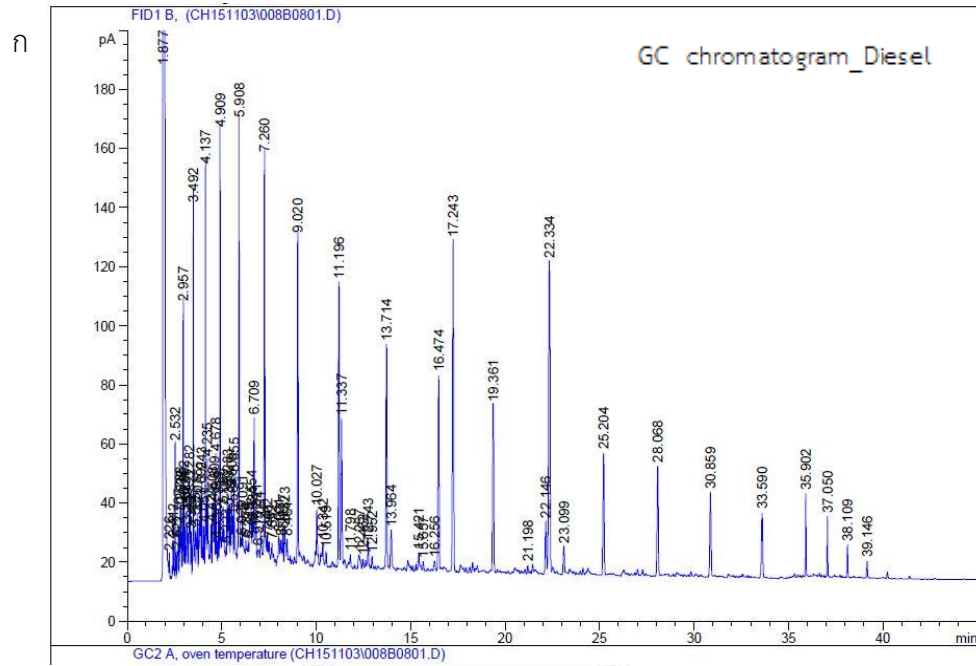
ปริมาณดีเซล (%)	ปริมาณดีเซลที่เหลืออยู่ (%)		จำนวนแบคทีเรีย (AS85) (logCFU/ml)
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง (AS85)	
2	77.56 ± 3.25	48.04 ± 1.05	9.82 ± 0.02
3	79.73 ± 3.33	56.41 ± 2.41	9.71 ± 0.02
5	93.36 ± 1.82	69.72 ± 4.17	10.08 ± 0.04

ตารางที่ ๓.4 การลดลงของพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบการย่อย 1% ดีเซลในตัวอย่างน้ำจากคลองรังสิตประยูรศักดิ์

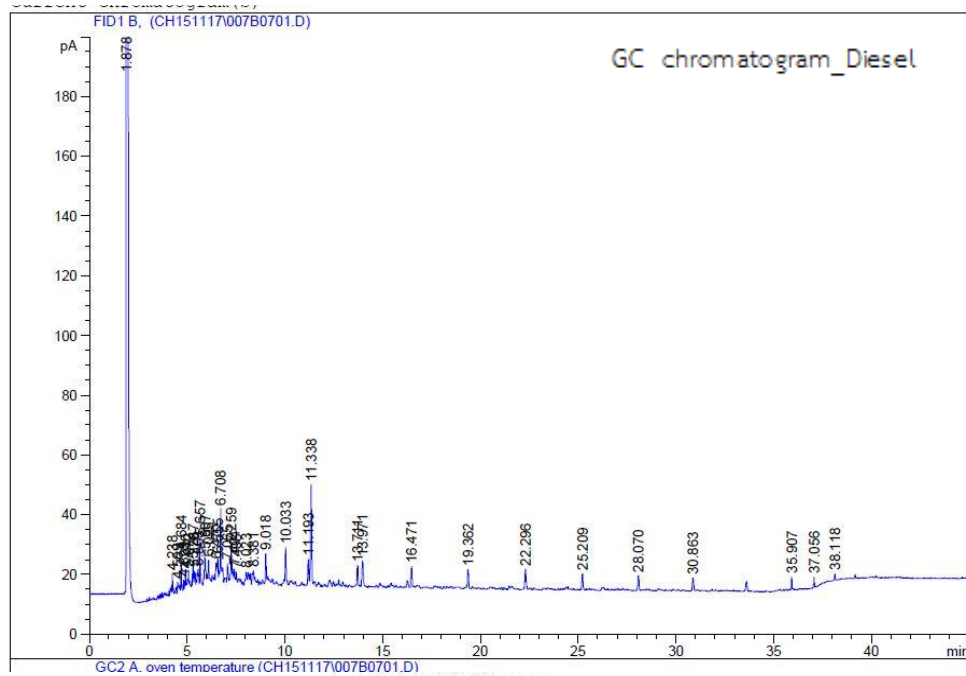
ชุดทดลอง	COD		BOD		Total Nitrogen		Total Phosphorus	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
	ชุดทดสอบน้ำปลอดเชื้อ+AS85	3003	1219	3600	3225	20.2	1.7	8.68
ชุดทดสอบน้ำไม่ปลอดเชื้อ+AS85	3298	403	3900	2175	12.8	1	10.78	1.7
ชุดควบคุมน้ำปลอดเชื้อ	3298	1943	4424	910	0.6	0.9	0.74	0.43
ชุดควบคุมน้ำไม่ปลอดเชื้อ	3297	1675	3750	3112	1.4	1.3	0.76	0.37

ภาคผนวก ข

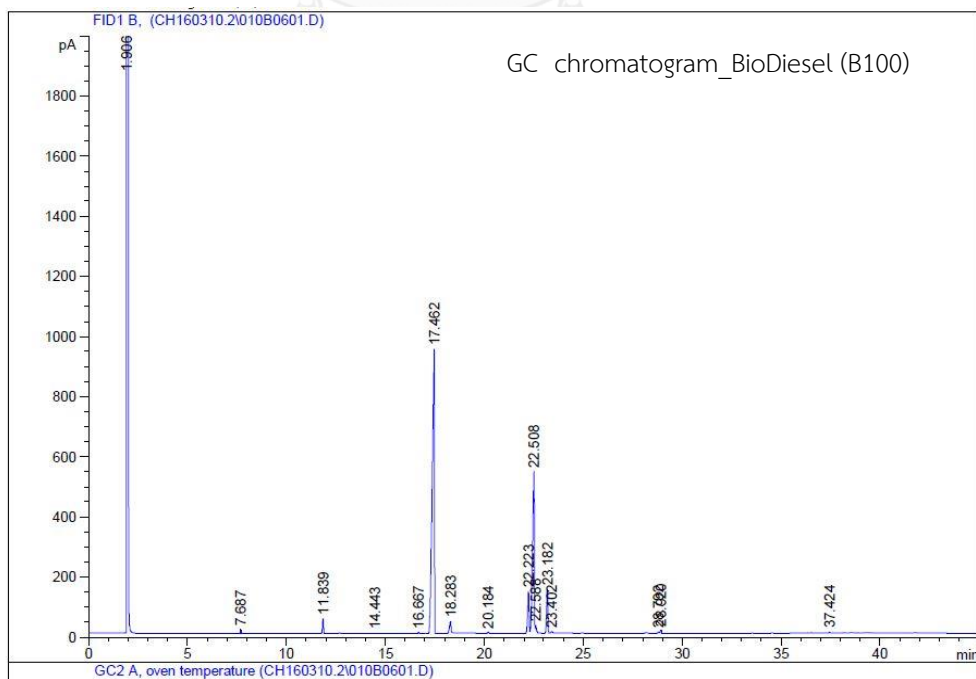
รูปที่ ข.1 GC โครมาโตแกรม 1% ดีเซล ย่อยสลายโดยสายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph วันที่ 0 (ก) และวันที่ 1 (ข)



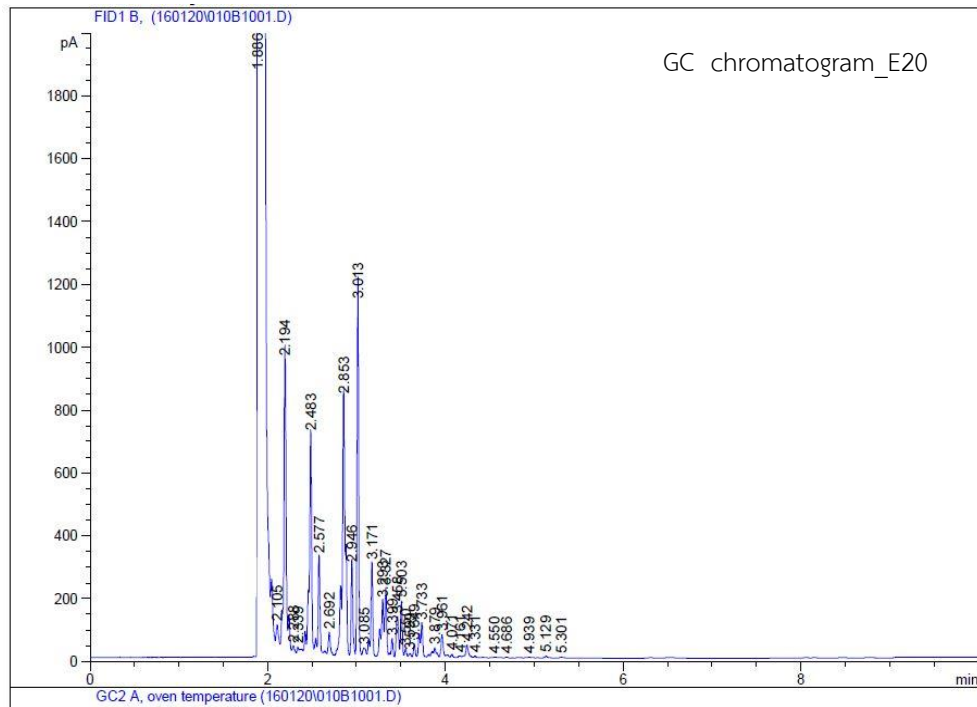
รูปที่ ข.2 GC โครมาโตแกรม 1% ดีเซล ย่อยสลายโดยสายพันธุ์ AS85 ในภาวะ chemoheterotroph วันที่ 14



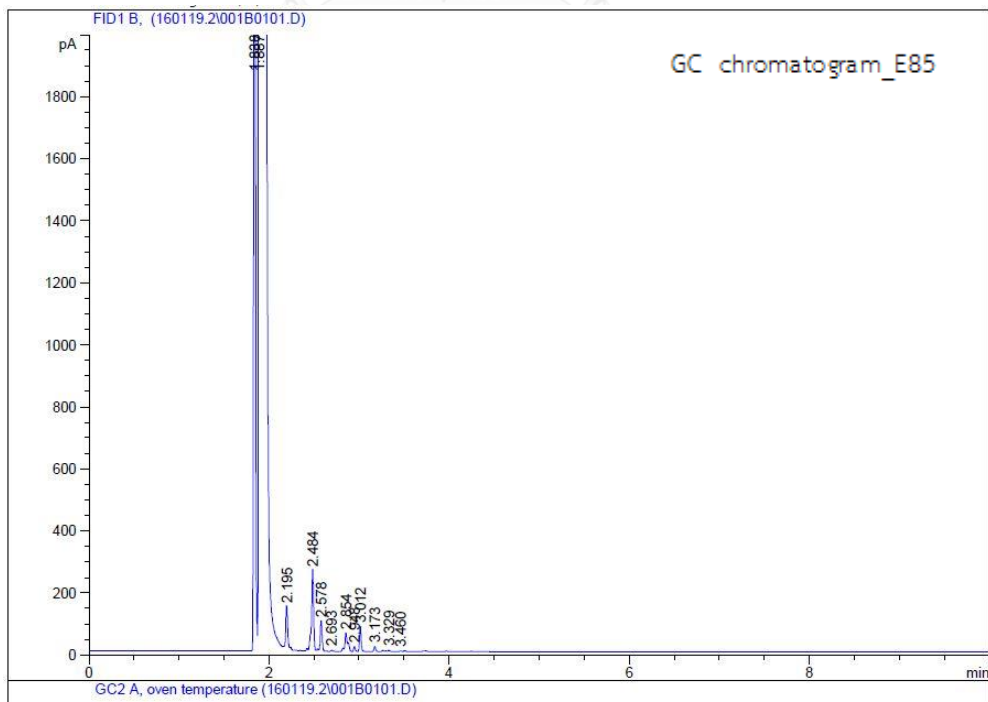
รูปที่ ข.3 GC โครมาโตแกรมไบโอดีเซล B100



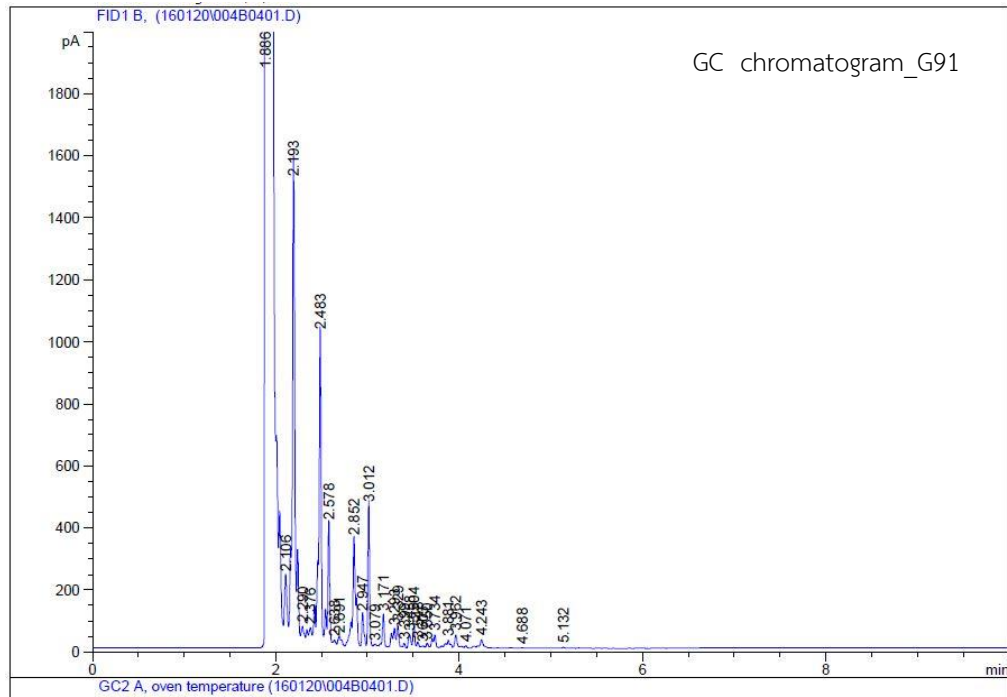
รูปที่ ข.4 GC โครมาโตแกรมเบนซิน E20



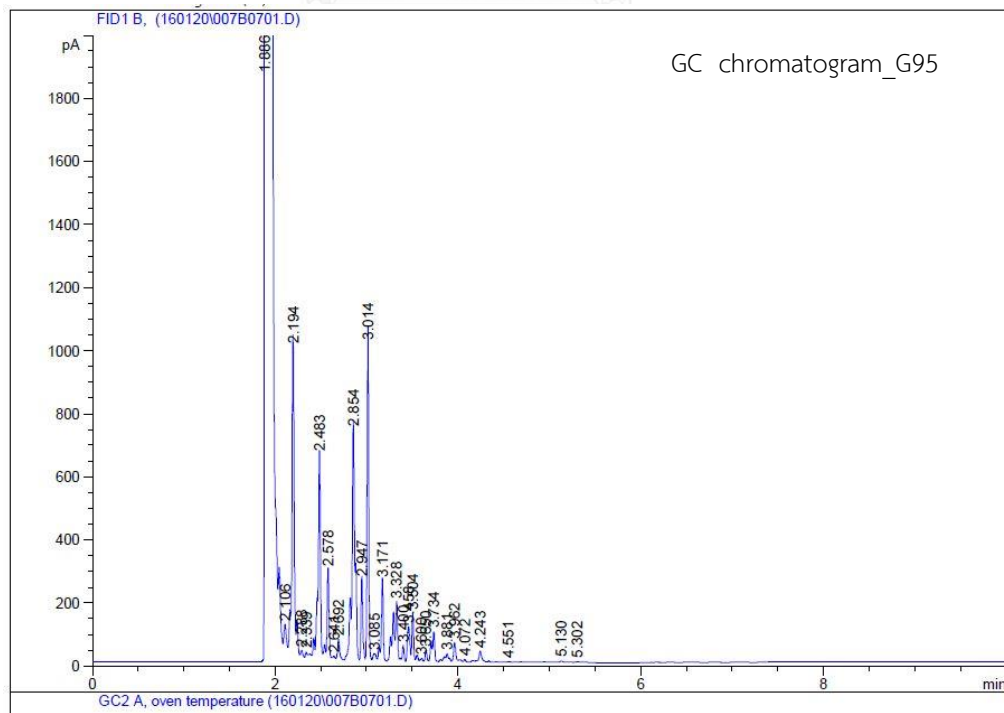
รูปที่ ข.5 GC โครมาโตแกรมเบนซิน E85



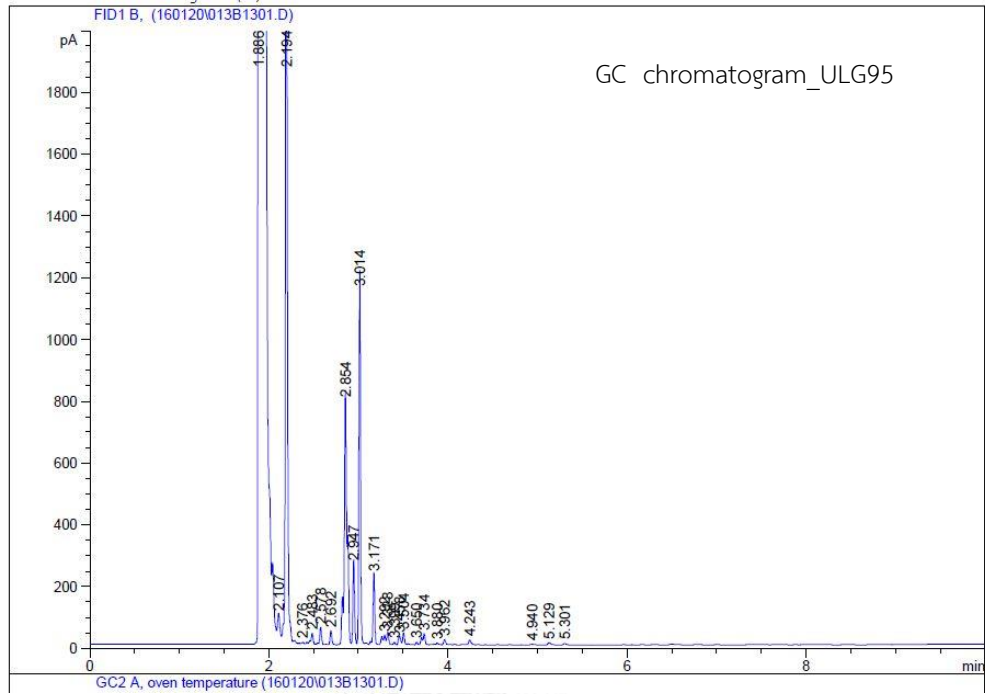
รูปที่ ข.6 GC โครมาโตแกรมเบนซิน G91



รูปที่ ข.7 GC โครมาโตแกรมเบนซิน G95



รูปที่ ข.8 GC โครมาโตแกรมของเบนซิน ULG95



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชื่นสมน บุญเจริญ เกิดเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527 สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ (จุลชีววิทยา) คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ในปีการศึกษา 2550 และเข้า ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 (เทอมปลาย)

ผลงานที่เผยแพร่

Booncharoen, C. and Pattaragulwanit, K. 2015. Isolation of photosynthetic purple non-sulfur bacteria from activated sludge for diesel degradation. Proceeding of November 17 -20 . Mandarin Hotel, Bangkok.Thailand. The 27 th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2015).