Science and Technology
RMUTT Journal
Vol.3 No.2 (2013) : 75–89
www.sci.rmutt.ac.th/stj
Online ISSN 2229-1547

การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนกรด/ชอบกรด จากเขตดินเปรี้ยว ในจังหวัดนครศรีธรรมราช และส่งเสริมการผลิตชีวมวลและกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก โดยเทคนิค Plackett-Burman

Isolation of Acidotolerant/Acidophilic Photosynthetic Bacteria from Peat Soils in Nakhon Si Thammarat Province and the Promoting of Biomass and 5-Aminolevulinic Acid Production by Plackett-Burman Technique

อังคณา ใสเกื้อ

สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
E-mail: angkana_sai@hotmail.com

บทคัดย่อ

มีการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงชอบกรด/ทนกรด จากดินพรุในเขตพื้นที่ 7 อำเภอ ของจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GMY ที่ช่วงพีเอช 4.5-6.5 ภายใต้สภาวะมีอากาศน้อย-มีแสง (5,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิห้อง (32±3°C) นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 9, 5 และ 2 ไอโซเลทจากอาหารพีเอช 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชต่ำคือ 4.5 และ 5.0 สามารถคัดแยกเชื้อได้เพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกได้ไปคัดกรองการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) ในอาหาร GMY ที่พีเอช 6.0 พบว่าไอโซเลทที่ผลิต ALA ได้สูงสุดคือ *Rhodopseudomonas palustris* JP255 สามารถผลิต ALA ได้ 20.42 ไมโครโมลาร์ จากนั้นได้ออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของ 7 ปัจจัย (ไกลซีน, ซัคซิเนต, กรดโพรพิโอนิก, แมกนีเซียมคลอไรด์, กรดลีวูลินิก, ค่าพีเอช และกลูโคส) ต่อการผลิตชีวมวลและ ALA โดยไอโซเลท JP255 สามารถประมาณการการผลิตชีวมวลได้ 4.156 กรัมต่อลิตร และผลิต ALA ได้ 218.78 ไมโครโมลาร์ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยเทคนิค Plackett-Burman พบว่าแมกนีเซียมคลอไรด์, กลูโคส และค่าพีเอช ส่งเสริมต่อการผลิต ALA ในขณะที่ไกลซีน, ซัคซิเนต, กรดโพรพิโอนิก และกรดลีวูลินิกส่งผลในเชิงลบ พบว่าอาหารที่เหมาะสม (1 ลิตร) ต่อการผลิตชีวมวลและ

Received: Nov 19, 2013
Revised: Dec 07, 2013
Accepted: Dec 12, 2013

ALA คือ อาหาร GMY medium (ประกอบด้วย L-glutamic 3.8 กรัม, DL-malic acid 2.7 กรัม, yeast extract 2.0 กรัม, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.8 กรัม, KH_2PO_4 0.5 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.053 กรัม, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ $1.2x10^{-3}$ กรัม, thiamine-HCl $1.0x10^{-3}$ กรัม, nicotinic-HCl $1.2x10^{-3}$ กรัม และ Biotin $1.0x10^{-5}$ กรัม) และเติมไกลซีน 5 มิลลิโมลาร์, ซัคซิเนต 10 มิลลิโมลาร์, กรดโพรพิโอนิก 1 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 20 มิลลิโมลาร์, กรดลีวูลินิก 10 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส 10 มิลลิโมลาร์ และปรับพีเอชสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5

คำสำคัญ: แบคทีเรียสังเคราะห์แสง, กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก, Plackett-Burman

Abstract

Peat soils samples collected from 7 districts of Nakhon Si Thammarat province were used for isolation acidotolerant/acidophilic photosynthetic bacteria. The soil samples were inoculated into GMY medium with pH of 4.5-6.5, and cultivated under microaerobic-light condition (5,000 Lux) at room temperature (32±3C) for 48 hours. The results showed that 9, 5 and 2 isolates can be isolated from the medium with pH of 5.5, 6.0 and 6.5, respectively. At lower pH values, 4.5 and 5.0, only 2 isolates were isolated. All isolates were subsequently screened for the production of 5-aminolevulinic acid (ALA) by culturing in the GMY medium, pH 6.0. The highest ALA (20.42 μM) was found from the isolate named *Rhodopseudomonas palustris* JP255. The Plackett-Burman design with 7 factors (glycine, succinate, propionic acid, magnesium chloride, levulinic acid, pH and glucose) at 3 levels was performed for optimization biomass and ALA production of the JP255. By this design, approximately 218.78 μM ALA and 4.156 g/L biomass could be enhanced. Statistical analysis of the results from Plackett-Burman revealed that magnesium chloride, glucose and the pH gave positive affected on biomass and ALA production; whereas glycine succinate propionic acid and levulinic acid gave negative results. The suitable medium (1 liter) for ALA and biomass production of the JP255 was GMY medium (L-glutamic 3.8 g, DL-malic acid 2.7 g, yeast extract 2.0 g, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.8 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.053 g, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ $1.2x10^{-3}$g, thiamine-HCl $1.0x10^{-3}$g, nicotinic-HCl $1.2x10^{-3}$g and Biotin $1.0x10^{-5}$g) addition with glycine 5 mM, succinate 10 mM, propionic acid 1 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 20 mM, levulinic acid 10 mM and glucose 10 mM and adjusted the final pH to 6.5.

Keywords: photosynthetic bacteria, 5-aminolevulinic acid, Plackett-Burman

1. บทนำ

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีกระจายอยู่ในดินหลายๆ แหล่งทั้งในในนาข้าว ท้องร่อง ท้องน้ำ ชายฝั่งทะเล หรือแม้แต่ในน้ำเสียจากโรงงานกำจัดน้ำเสีย [1] Sasaki และคณะ [2] ได้คัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่ม *Rhodospirillaceae* ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะมีอากาศ/ไม่มีแสง โดยใช้สารอินทรีย์หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วสร้างสารชีวภัณฑ์ เช่น วิตามินบี12 ยูบิควิโนน และกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) Koh และ Sang [3] ได้นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas* sp. KL9 และ BL6 มากระตุ้นการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ แล้วยังกระตุ้นการผลิตฮอร์โมน IAA และ ALA ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อพร้อมกันด้วย นอกจากนี้ Lee และคณะ [4] ยังรายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas* sp. KL9 สามารถกระตุ้นการเจริญ การออกผล และเพิ่มคุณภาพของผลผลิตในโรงเรือน และมีรายงานว่าตัวเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงยังสามารถเพิ่มผลผลิตข้าว และช่วยลดอาการรากเน่าในข้าว [1] ทั้งสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนในพืชได้ [5] แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถสร้าง ALA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์พอร์ไฟริน เช่น คลอโรฟีลล์ ไฟโคบิลลิน ฮีม และวิตามินบี12 [6] มีรายงานการนำ ALA ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (0.06-0.6 mM) มาใช้แช่เมล็ด หรือฉีดพ่นทางรากและใบ โดยมีบทบาทส่งเสริมการเจริญของ พริก ถั่ว แตงกวา ผักโขม กระเทียม มันฝรั่ง ข้าว ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี หัวไชเท้า อินทผาลัม เนื้อเยื่ออินทผาลัมที่เพาะเลี้ยง และแปะก๊วย [2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13] ALA ยังช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส [14] เพิ่มการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มีแสงและยับยั้งการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มืด [7, 15] ทั้งยังช่วยเพิ่มอัตราการเกิดกระบวนการไนโตรเจน แอสซิมิเลชั่น, ซัลเฟอร์ แอสซิมิเลชั่น [16] และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรท์ รีดักเทส ในพืช [17] นอกเหนือจากนี้ ALA ก็ยังไปมีบทบาทเพิ่มปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในแปะก๊วยได้ด้วย [13] หากใช้ ALA ที่ความเข้มข้นสูงๆ (2-5 mM) สามารถใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ โดยกลไกการเข้าไปทำลายชั้นเมมเบรน ของพืช ทำให้ใบและลำต้นเหี่ยวเฉาเกิดการสูญเสียน้ำและตายในที่สุด [18] มีรายงานการใช้ ALA เพื่อให้พืชหลายชนิดสามารถทนความกดดันจากสภาพแวดล้อมที่หลากหลายกันไป เช่น สภาพดินเค็มจัดในการปลูกฝ้าย ทานตะวัน และอินทผาลัมโดยจะไปส่งเสริมการเพิ่มแรงดันออสโมซิสและยับยั้งการดูดซึม Na^+ เข้าสู่ปลายราก [14, 19, 20] ความสามารถทนต่ออากาศเย็นจัด ของพริกแดง และถั่วเหลือง [11, 21] ทนต่อสภาพดินที่ปนเปื้อนด้วยยาฆ่าแมลง [22] จึงจัด ALA ว่าเป็นสารชีวภาพที่มีความปลอดภัยและมีศักยภาพสูงในกระบวนการผลิตทางการเกษตร [23]

ดินพรุเป็นดินที่มีศักยภาพในการเพาะปลูกต่ำ เนื่องจากคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีบางประการเช่น มีระดับน้ำใต้ดินสูง มีสารอาหารต่ำ ดินพรุส่วนใหญ่มีความเป็นกรดสูงจึงทำให้มีปริมาณอะลูมิเนียมแลกเปลี่ยนได้สูงด้วย จึงหมายความว่าจะไม่มีพืชผลชนิดใดที่สามารถเจริญได้ในพื้นที่ดังกล่าว ถ้าหากยังไม่ได้ทำการปรับปรุงดินเสียก่อน ในจังหวัดนครศรีธรรมราชมีเขตดินพรุพีเอชต่ำในพื้นที่ราบลุ่มน้ำขังหลายอำเภอ ปัญหาดังกล่าวเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผลผลิตพืชตกต่ำ [24]

ในการศึกษานี้ได้นำเทคนิค Plackett-Burman มาใช้ตรวจสอบหาปัจจัยของสารสารตั้งต้นและสารยับยั้งต่อการผลิต ALA โดยนำสารทั้งสองกลุ่มไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ALA วิธีศึกษานี้เป็นวิธีที่รวดเร็วและไม่สิ้นเปลืองทรัพยากร มีชุดการ

ทดลองผันแปรตามระดับปัจจัยและจำนวนปัจจัยที่ศึกษา และสามารถลดรูปลงจากการทดลองแบบแฟคทอเรียลเต็มรูปในสัดส่วนของจำนวนระดับปัจจัย ดังนั้นในปัจจุบันวิธีนี้จึงได้รับความนิยมใช้ในการคัดเลือกปัจจัยบางส่วนออก ลดปัจจัยลงให้เหลือเฉพาะปัจจัยที่สำคัญๆ เท่านั้น

จากประโยชน์ของชีวมวลและ ALA ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง จึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ในการแก้ปัญหาผลผลิตตกต่ำในเขตพื้นที่ดินเปรี้ยว โดยเริ่มจากการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิต ALA ได้สูงสุดจากพื้นที่ดินพรุใน จ. นครศรีธรรมราช จากนั้นนำไอโซเลทที่คัดแยกได้ไปหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต ALA แล้วนำเชื้อดังกล่าวมาเพิ่มจำนวนเพื่อนำกลับไปใช้ในที่เขตพื้นที่ดินเปรี้ยวนั้นๆต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนกรดจากพื้นที่ดินเปรี้ยวในจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยครอบคลุมพื้นที่ 7 อำเภอ (อำเภอละ 4 ตัวอย่าง) คือ อ.เมือง อ.ร่อนพิบูลย์ อ.พระพรหม อ.จุฬาภรณ์ อ.เฉลิมพระเกียรติ อ.หัวไทร และ อ.เชียรใหญ่ โดยเก็บตัวอย่างดินที่เป็นดินร่วนปนเหนียวมีสีเทาหรือสีเทาเข้มถึงดำ จำนวน 100 กรัมต่อตัวอย่าง ที่ระดับความลึก 10-15 เซนติเมตรจากผิวดิน ใช้ช้อนตักดินมา 1 กรัมใส่ในอาหารเหลวสูตร GMY [25] ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 4.5, 5.0, 5.5,6.0 และ 6.5 ในหลอดทดลองฝาเกลียว บ่มหลอดทดลองที่ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (32±3 องศาเซลเซียส) จนหลอดทดลองมีสีแดง ส้ม น้ำตาลส้ม หรือชมพู จากนั้นนำเชื้อมาขีดบนอาหารแข็ง GMY จนปรากฏเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ บนจานเพาะเลี้ยง นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปเก็บรักษาในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

2.2 การคัดกรองแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไอโซเลทที่ผลิต ALA ได้สูงสุด

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิต ALA โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็ง GMY แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในขวดแม่โขงแบนขนาด 300 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว GMY 250 มิลลิลิตร บ่มที่ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (32±3 องศาเซลเซียส) นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์จากน้ำหมักด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปรับปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 1.0 แล้วดึงมา 0.15 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่บรรจุอาหารเหลว GMY (ที่พีเอช 6.0) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะมีอากาศน้อย/มีแสงความเข้ม 5,000 ลักซ์ โดยใช้หลอดทังสเตนขนาด 60 วัตต์ ประกบทั้งด้านหน้าและด้านหลัง ที่อุณหภูมิห้อง (32±3 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างเมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (Concort รุ่น C8) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Biochrom6 รุ่น Libra S22) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ส่วนน้ำหมักนำไปปั่นแยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Hettich

Zentrifugen รุ่น UNIVERSAL32) ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ ALA ตามวิธีการเทียบสี [26]

2.3 การตรวจหาปริมาณ ALA

นำสารละลายส่วนใส (จากข้อ 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม acetate buffer (pH 4.6) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม acetyl acetone ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาทีและทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Modified Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank เปรียบเทียบปริมาณ ALA ด้วยกราฟมาตรฐาน คัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิต ALA ได้สูงสุดเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* JP255 ในอาหารเหลว GMY นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 วัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง นำตะกอนเซลล์ไปใส่โถอบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วนำไปอบที่ 103 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจนได้น้ำหนักแห้งคงที่ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักแห้ง

2.5 การทดลองแบบ Plackett-Burman design

ใช้แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ 7 ปัจจัย คือ ไกลซีน, ซัคซิเนต, กรดโพรพิโอนิก, แมกนีเซียมคลอไรด์, กรดลีวูลินิก, ค่าพีเอชเริ่มต้น และกลูโคส ต่อการผลิตชีวมวลและ ALA ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไอโซเลทที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 2) โดยกำหนดรหัสแต่ละปัจจัยด้วย X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 , X_6 และ X_7 ตามลำดับ แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับคือค่าสูง (1) ค่ากลาง (0) และค่าต่ำ (-1) จำนวนทั้งสิ้น 15 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 1) ความสัมพันธ์หลักของแต่ละตัวแปรตรวจสอบจากสมการต่อไปนี้:

$$E_{xi} = (\Sigma M_{i+} - \Sigma M_{i-}) / N$$

เมื่อกำหนดให้ E_{xi} คือ ปัจจัยหลักที่เป็นตัวแปรในการทดลอง, M_{i+} และ M_{i-} คือร้อยละการตอบสนองในแต่ละชุดการทดลอง โดยตัวแปรอิสระ (*Xi*) จะแสดงในรูปแบบของค่าสูงและค่าต่ำตามลำดับ และค่า N คือจำนวนครึ่งหนึ่งของชุดการทดลอง คัดเลือกปัจจัยที่มีผล (significant) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้นนำค่าตอบสนองที่ได้ไปประมวลผลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป design expert (trial version) เวอร์ชั่น 8.0.1 (Stat-Ease, Minneapolis, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบ ในการศึกษาจะเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น (เหมือนข้อ 2) แล้วเติมกล้าเชื้อ 30 มิลลิลิตร ลงในขวดแม่โขงแบนขนาด 300 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารแต่ละสูตร 270

มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (32±3 องศาเซลเซียส) นาน 72 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักมา 15 มิลลิลิตร ตรวจวัดการเจริญโดยวัดจากค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ระดับ 660 นาโนเมตรแล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอชวัดด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ ส่วนน้ำหมักนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปตรวจหา ALA ภายนอกเซลล์ที่เชื้อสร้างขึ้น

ตารางที่ 1 ชุดการทดลองที่ออกแบบด้วย Plackett-Burman เพื่อศึกษาผลของ 7 ปัจจัยที่ส่งเสริมการผลิต ชีวมวล และ ALA ที่เวลา 72 ชั่วโมง

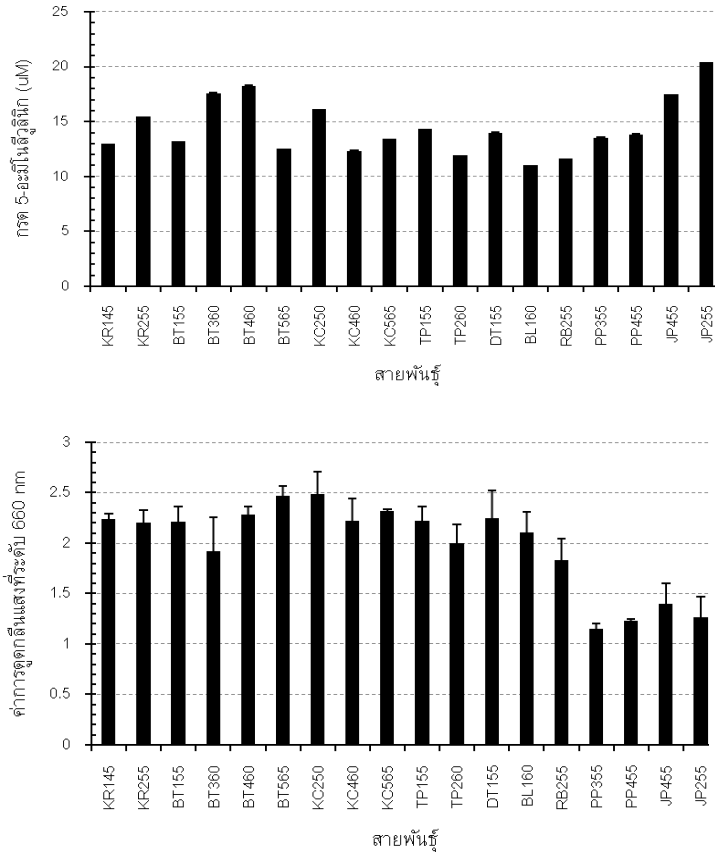
ชุดทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา						
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
1	15	30	1	20	20	6.5	0
2	15	10	1	10	20	5.5	10
3	5	30	1	20	20	5.5	10
4	15	30	1	10	10	6.5	0
5	10	20	2	15	15	6.0	5
6	10	20	2	15	15	6.0	5
7	5	10	3	10	20	6.5	0
8	5	10	1	10	10	5.5	0
9	15	10	3	20	20	5.5	0
10	15	30	3	10	10	5.5	10
11	5	30	3	10	20	6.5	10
12	5	30	3	20	10	5.5	0
13	15	10	3	20	10	6.5	10
14	5	10	1	20	10	6.5	10
15	10	20	2	15	15	6.0	5

หมายเหตุ: X_1: ไกลซีน (มิลลิโมลาร์), X_2: ซัคซิเนต (มิลลิโมลาร์), X_3: กรดโพรพิโอนิก (มิลลิโมลาร์), X_4: แมกนีเซียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์), X_5: กรดลีวูลินิก (มิลลิโมลาร์), X_6: พีเอช และ X_7: กลูโคส (มิลลิโมลาร์) โดยทุกปัจจัยจะเติมลงในอาหารที่เวลา 0 ชั่วโมง ยกเว้นกรดลีวูลินิกที่เติมลงในอาหารระยะกลางของการเจริญ (ที่ 24 ชั่วโมง)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

จากการเก็บตัวอย่างดินในป่าพรุเขตพื้นที่ดินเปรี้ยว จ.นครศรีธรรมราช สามารถคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เจริญในอาหาร GMY จากพีเอชเริ่มต้น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ได้ทั้งสิ้น 18 ไอโซเลท โดยแยกได้จาก อ. หัวไทร 7 ไอโซเลท คือรหัส BT155, BT460, BT565, KC250, KC460, KC565 และ BL160 จาก อ. เชียรใหญ่ 2 ไอโซเลท คือรหัส KR145 และ KR255 จาก อ. เฉลิมพระเกียรติ 3 ไอโซเลท คือรหัส TP155, TP260 และ DT155 จาก อ. ร่อนพิบูลย์ 1 ไอโซเลท คือรหัส RB255 จาก อ. จุฬาภรณ์ 2 ไอโซเลท คือ รหัส JP255 และ JP455 และจาก อ. เมือง 2 ไอโซเลท คือรหัส PP355 และ PP455 อาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 5.5 สามารถแยกเชื้อได้มากที่สุดถึง 9 ไอโซเลท รองลงมาคือที่พีเอช 6.0 แยกได้ 5 ไอโซเลท ที่พีเอช 6.5 แยกได้ 2 ไอโซเลท ส่วนที่พีเอชต่ำ (คือที่พีเอช 4.5 และ 5.0) สามารถ แยกได้เพียงพีเอชละ 1 ไอโซเลท เท่านั้น (ข้อมูลไม่ได้แสดง)



รูปที่ 1 ปริมาณ ALA (ก) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (ข) โดยเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 18 ไอโซเลท (KR = บ้านการะเกด, BT = บ้านทรายขาว, KC = ควนชะลิก, TP = ทางพูน, RB = ร่อนพิบูลย์, PP = พระพรหม และ JP = จุฬาภรณ์ ส่วนรหัส 3 ตัวหลังคือลำดับโคโลนีที่คัดแยกและพีเอชที่คัดแยกเชื้อได้)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้จัดเป็นกลุ่ม extremophilic phototrohs เนื่องจากคัดแยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชต่ำกว่า 6.0 คุณสมบัตินี้สัมพันธ์กับแหล่งเก็บตัวอย่าง นั่นคือดินที่เก็บนั้นมีพีเอชที่ค่อนข้างต่ำจึงทำให้ได้เชื้อที่มีลักษณะและคุณสมบัติตามที่ต้องการ เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารที่มีค่าพีเอชมากกว่า 6.0 พบว่าทุกไอโซเลทเจริญเติบโตได้สูงกว่าเดิม เนื่องจากค่าพีเอชดังกล่าวเป็นค่า optimal ที่เหมาะสมต่อการเจริญในขณะที่ช่วงพีเอชที่คัดแยกได้เป็นสภาวะที่แบคทีเรียสามารถจะทนได้ (tolerate) เพื่อการเจริญเติบโตและเพื่อให้สามารถเกิดกิจกรรมเมตาบอลิซึมได้เท่านั้น [27] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kantachote และคณะ [28] ที่ได้แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter blastica* DK6 จากบ่อบำบัดน้ำเสียในโรงงานน้ำยางข้นในภาคใต้ของประเทศไทยพบว่าสามารถเจริญได้ที่พีเอช 5.0-9.0 แต่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วง 6.5-7.5 นอกจากนี้มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม extreme anoxygenic ชนิดทนกรด (เจริญได้ที่พีเอชต่ำกว่า 6.0) 2 สายพันธุ์ คือ *Rhodoblastus acidophilus* และ *Rhodopila globiformis* ซึ่งคัดแยกโดย Norbert Pfennig นักจุลชีววิทยาชาวเยอรมันที่มีความเชี่ยวชาญในการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม anoxygenic จากทะเลสาบและน้ำพุร้อนที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 6.0 [29, 30, 31]

ค่าพีเอชของดินเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพทางเคมีของดิน ส่งผลกระทบต่อพืชในการนำสารอาหารกลับไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 6.0 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 4.0 แสดงว่าสารละลายมีฤทธิ์เป็นกรดจัด ทำให้ดินมีแคลเซียม แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ค่อนข้างต่ำเนื่องจากธาตุทั้ง 3 ถูกชะล้างออกจากดินได้ง่าย ความเป็นกรดเป็นด่างของดินไม่มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่จะมีผลทางอ้อมต่อการเจริญเติบโตของพืช คือเป็นตัวควบคุมปริมาณธาตุอาหารพืชที่ละลายออกมาในดิน ถ้าละลายออกมามากเกินไปก็อาจเป็นอันตรายต่อพืชได้ ถ้าละลายออกมาน้อยเกินไปก็ทำให้พืชขาดธาตุอาหารที่จำเป็นได้ พืชแต่ละชนิดจะมีช่วงของพีเอชของดินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิด ของพืชและพันธุ์ของพืช นอกจากค่าพีเอชจะควบคุมการละลายของธาตุอาหารพืชแล้ว พีเอชยังมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการทำงานของจุลินทรีย์ในดิน [32] โดยเฉพาะแบคทีเรียและเชื้อราที่มักพบบริเวณปลายรากพืช สามารถย่อยสลายอินทรีย์สาร (ซากพืช ซากสัตว์ ซากจุลินทรีย์ รวมถึงของเสียจากมนุษย์) ให้เปลี่ยนเป็นเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส, น้ำตาล, แว๊กซ์, กรดนิวคลีอิก, โปรตีน และกรดอะมิโน ที่รากพืชสามารถดูดซึมในรูปไอออน เช่น ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, ซัลเฟอร์ และไฮโดรเจน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต [33] สำหรับพื้นที่พรุเป็นบริเวณที่มีการสะสมอินทรีย์สารที่ยังย่อยสลายไม่สมบูรณ์ ดินพรุมีคุณสมบัติเฉพาะ เช่น มีค่าพีเอชต่ำ ($\pm$3) มีอินทรีย์สารสูง มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก มีค่าความอิ่มตัวด้วยด่างของดินต่ำ คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ปริมาณ โพแทสเซียม, แคลเซียม และแมกนีเซียมในดินต่ำ ส่งผลให้พืชนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้ยาก [34] ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากดินพรุที่มีค่าพีเอชต่ำ เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณสูงแล้วนำกลับไปใช้ในพื้นที่นั้นๆ จึงอาจเป็นแนวทางช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่ดีให้กับดิน โดยไปมีผลโดยตรงต่อผลผลิตของพืช โดยเฉพาะนาข้าวใน จ.นครศรีธรรมราช

จากการคัดกรองแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (แสดงดังรูปที่ 1) พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผลิต ALA ได้สูงสุดคือรหัส JP255 สามารถผลิต ALA ได้ถึง 20.42 ไมโครโมลาร์ และมีค่าการเจริญเติบโตโดยวัดเป็นค่าการดูดกลืนแสงเป็น 1.26 แบคทีเรียไอโซเลท JP255 ที่คัดแยกได้นี้คือ *R. palustris* และจากคุณสมบัติทน

กรดที่พีเอช 5.5 ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงดังกล่าว ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มจำนวน ชีวมวล และ ALA ต่อไป

3.2 ผลของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลและ ALA ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้

ผลการวิเคราะห์การผลิตชีวมวลและ ALA โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้โดยออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman ด้วยโปรแกรม Design expert ให้ผลการทดลองเป็นค่าจริงและค่าการทำนายแสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งวิธีการนี้มีชุดการทดลอง 15 ชุด ซึ่งถ้าหากใช้วิธีการการทดลองแบบดั้งเดิมนั้นเป็นการทดลองแฟคทอเรียลเต็มรูป จะต้องใช้ถึง 2^7 ชุดการทดลอง ทำให้สิ้นเปลืองทรัพยากรและเสียเวลาโดยไม่จำเป็น ทั้งยังช่วยกำหนดผลของตัวแปรที่มีจำนวนขั้นต่ำของการทดลอง แต่ไม่สามารถบอกถึงผลกระทบร่วมของแต่ละตัวแปรได้ [35] แต่ภายในขอบเขตของข้อจำกัดเหล่านี้ พบว่าการคัดกรองจากในขั้นการออกแบบการทดลองจะมีประสิทธิภาพสูง ให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย ดังนั้นวิธีดังกล่าวนี้จึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งต่อการนำมาคัดกรองเพื่อนำไปสู่การศึกษาหาองค์ประกอบที่เหมาะสมต่อไป ในการทดลองนี้มี 7 ปัจจัยที่ศึกษา โดยประกอบด้วยสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ALA โดยวิถี C_4 (คือซัคซิเนตและไกลซีน) และสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALA dehydratase (คือกรดลีวูลินิก) ส่วนกรดโพรพิโอนิกและกลูโคสมีรายงานการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อส่งเสริมการเจริญของเซลล์เพื่อให้สามารถผลิต ALA ได้ [36, 37] ส่วนแมกนีเซียมมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยน ProtoporphyrinogenIX ให้เป็นคลอโรฟีลล์ [38] และปัจจัยที่ 7 คือค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อและส่งผลให้มีปริมาณ ALA ที่เชื้อสร้างเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย [39]

ตารางที่ 2 ชีวมวลและ ALA จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายภายหลังเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)		ALA (ไมโครโมลาร์)	
	ค่าจริง	ค่าการทำนาย	ค่าจริง	ค่าการทำนาย
1	0.780	0.779	7.35	2.83
2	1.250	1.249	9.70	5.18
3	1.038	1.037	8.35	3.83
4	0.667	0.666	7.75	3.23
5	1.104	1.083	10.15	27.78
6	1.185	1.083	10.25	27.78
7	1.017	1.016	5.40	0.88
8	1.466	1.465	71.05	66.53
9	0.293	0.292	5.65	1.13
10	0.318	0.317	10.65	6.13
11	0.915	0.914	16.75	12.23
12	0.535	0.534	6.00	1.48
13	0.573	0.572	15.70	11.18
14	4.157	4.156	223.30	218.78
15	0.950	1.083	8.70	27.78

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้สามารถทนต่อสภาพดินกรด ที่สภาวะพีเอชต่ำๆ จะส่งเสริมให้ปริมาณ ALA ในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถคงตัวอยู่ได้ โดยพบว่าเมื่อ ALA อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงที่พีเอชเป็นกลาง (พีเอช 7.5) นาน 48 ชั่วโมง ปริมาณ ALA จะไม่คงตัวและสูญหายไปถึงร้อยละ 60 แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่พีเอชน้อยกว่า 6.5 ปริมาณ ALA จะสูญหายไปเพียงร้อยละ 20 เท่านั้น [40] ในวิธีการศึกษานี้มีการกำหนดให้ทุกปัจจัยมีระดับค่าสูง ค่ากลาง และค่าต่ำ จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าชุดการทดลองที่ 14 ทั้งชีวมวลและ ALA สามารถผลิตได้สูงสุดโดยสภาวะดังกล่าวมีการเติมไกลซีน 5 มิลลิโมลาร์, ซัคซิเนต 10 มิลลิโมลาร์, กรดโพรพิโอนิก 1 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์, กรดลีวูลินิก 10 มิลลิโมลาร์, กลูโคส 10 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหาร GMY และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 ทำให้สามารถผลิตชีวมวลได้ถึง 4.16 กรัมต่อลิตร และผลิต ALA ได้ถึง 223.30 ไมโครโมลาร์ และพบว่าสามารถผลิต ALA ได้มากกว่าสภาวะเดิม (ที่ไม่ได้เติมสารข้างต้นที่กล่าวมา) ถึง 11 เท่า สำหรับวิธีการเพิ่มปริมาณ ALA ทำได้หลายวิธี เช่น การก่อกลายพันธุ์ทั้งแบบใช้แสงยูวี และใช้สารเคมี [38] การเติมสารตั้งต้นและสารยับยั้งกระบวนการผลิต ALA [41, 42, 43] การตัดต่อยีน *hem*A ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง ALA จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงใส่ลงไปในแบคทีเรีย *E. coli* [44, 45, 46, 47] สำหรับวิธีที่ใช้นี้เป็นการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman ที่ทำให้ทราบถึงผลของปัจจัยที่นำมาศึกษา โดยสามารถเพิ่มปริมาณการผลิต ALA ให้สูงขึ้นได้

ตารางที่ 3 ผลของปัจจัยหลักและผลทางสถิติ (*P*-values) ที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญในชุดการทดลอง

ปัจจัยที่ศึกษา	ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)			ALA (ไมโครโมลาร์)		
	coefficient	***F*-value**	***P*-value**	**coefficient**	***F*-value**	***P*-value**
ไกลซีน (X_1)	-0.44	241.80	0.0006	-22.84	15.29	0.0297
ซัคซิเนต (X_2)	-0.38	178.12	0.0009	-22.83	15.28	0.0297
กรดโพรพิโอนิก(X_3)	-0.48	286.18	0.0004	-22.28	14.55	0.0317
แมกนีเซียม (X_4)	0.15	26.70	0.0141	12.09	4.28	0.1303
กรดลีวูลินิก (X_5)	-0.20	51.59	0.0056	-23.44	16.11	0.0278
พีเอช (X_6)	0.29	90.44	0.0025	13.74	5.53	0.1001
กลูโคส (X_7)	0.27	107.06	0.0019	15.10	6.69	0.0813
R^2			0.9976			0.9725
Adjusted-R^2			0.9887			0.8716
Lack of Fit		0.0028	0.9620		1629.60	0.0006
Model		112.06	0.0012		5243.58	0.0002

ในการศึกษานี้พบว่าในระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทุกปัจจัยมีผลต่อการผลิตชีวมวล และ ALA (แสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 3) มี 4 ปัจจัยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) เป็นค่าลบ คือ ไกลซีน, ซัคซิเนต , กรดโพรพิโอนิก และกรดลีวูลินิก หมายความว่าควรลดค่าของปัจจัยเหล่านี้ให้อยู่ในระดับต่ำ (low level) จึงจะให้ผลดีต่อการผลิตชีวมวลและ ALA ในขณะที่ปัจจัยที่เหลือคือ แมกนีเซียมคลอไรด์ กลูโคสและค่าพีเอช มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก หมายถึงควรใช้ปัจจัยนั้นในระดับสูง (high level) จึงจะให้ผลดี และพบว่าจากแผนการทดลองให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ในการผลิตชีวมวลและ ALA เป็นร้อยละ 99.76 และร้อยละ 97.25 ตามลำดับ ค่าดังกล่าวอธิบายได้ว่าการผลิตชีวมวลที่ได้เป็นผลจากตัวแปรที่ศึกษาร้อยละ 99.76 ส่วนอีกร้อยละ 0.24 เป็นผลจากปัจจัยอื่นที่ไม่ทราบได้ ส่วนการผลิต ALA นั้นเป็นผลจากตัวแปรที่ศึกษาร้อยละ 97.25 ส่วนอีกร้อยละ 2.75 เป็นผลจากปัจจัยอื่นที่ไม่ทราบได้เช่นกัน ส่วนความแม่นยำของค่าการทำนายของการผลิตชีวมวลและ ALA ดูจากค่า *Adjusted-*R^2 โดยค่าดังกล่าวอธิบายได้ว่าการทำนายการผลิตชีวมวลมีความแม่นยำถึงร้อยละ 98.87 และการผลิต ALA การทำนายมีความแม่นยำถึงร้อยละ 87.16 ค่าเหล่านี้แสดงถึงความถูกต้องของค่าการทดลองในแต่ละชุดการทดลองและสามารถนำมาใช้ได้จริงต่อไป ในการผลิตชีวมวลและ ALA ชี้ให้เห็นว่าสารตั้งต้นต่อการผลิต ALA (ไกลซีน ซัคซิเนต และกรดโพรพิโอนิก) และสารยับยั้ง (กรดลีวูลินิก) ต่างก็เป็นปัจจัยจำกัดและควรควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ส่วนแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟีลล์ โดยแมกนีเซียมจะจับกับ *protoporphyrin* IX และเปลี่ยนเป็นแบคเทอริโอคลอโรฟีลล์ในที่สุด จากการวิเคราะห์ผลทางสถิตินอกจากจะทำให้ทราบว่าปัจจัยใดมีผลต่อการผลิตชีวมวลและ ALA แล้วโปรแกรมยังสามารถทำนายสมการสำหรับการผลิตชีวมวล (ให้ผลการทำนายดังสมการที่ 1)

Y (กรัมต่อลิตร) = 0.32969-(0.087442*X_1) - (0.037525*X_2) - (0.47565*X_3) + (0.029059*X_4) - (0.040391*X_5) + (0.53479*X_6) + (0.058184*X_7) .....(สมการที่ 1)

เมื่อกำหนดให้ตัวแปรที่ศึกษาเป็นค่าจริงของปัจจัย โดยให้ผลเป็นค่าการผลิตชีวมวล (Y) ซึ่งค่าที่ได้เกิดจากผลของ ไกลซีน (X_1) ซัคซิเนต (X_2) กรดโพรพิโอนิก (X_3) แมกนีเซียมคลอไรด์ (X_4) กรดลีวูลินิก (X_5) ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (X_6) และกลูโคส (X_7) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของชีวมวลสามารถทำนายผลได้ (ดังตารางที่ 2) ส่วนการผลิต ALA ให้ผลการวิเคราะห์ดังสมการที่ 2 (และสามารถทำนายผลได้ดังตารางที่ 2) เช่นเดียวกัน

Z (ไมโครโมลาร์) = 17.77083 – (4.5675*X_1) - (2.28292*X_2) - (22.27917*X_3) + (2.41750*X_4) - (4.6875*X_5) + (27.475* X_6) + (3.02083* X_7) .....(สมการที่ 2)

เมื่อกำหนดให้ตัวแปรที่ศึกษาเป็นค่าจริงของปัจจัย โดยให้ผลเป็นค่าการผลิต ALA (Z) ซึ่งค่าที่ได้เกิดจากผลของ ไกลซีน (X_1) ซัคซิเนต (X_2) กรดโพรพิโอนิก (X_3) แมกนีเซียมคลอไรด์ (X_4) กรดลีวูลินิก (X_5) ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (X_6) และกลูโคส (X_7) ตามลำดับ

จากสมการข้างต้นสามารถให้ค่าการทำนายการผลิตชีวมวลและ ALA ได้เป็น 4.156 กรัมต่อลิตร และ 218.78 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อมีการเติมไกลซีน 5 มิลลิโมลาร์ ซัคซิเนต 10 มิลลิโมลาร์ กรดโพรพิโอนิก 1 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ กรดลีวูลินิก 10 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส 10 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหาร GMY และปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 โดยพบว่าค่าดังกล่าวนั้นตรงกันกับชุดการทดลองที่ 14 ที่มีค่าจริงจากการทดลองของการผลิตชีวมวล เป็น 4.157 กรัมต่อลิตร และผลิต ALA เป็น 223.30 ไมโครโมลาร์ ซึ่งพบว่ามีความใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนายเป็นอย่างสูง

4. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2555 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

5. เอกสารอ้างอิง

[1] Kobayashi, M and Kobayashi, M. 2000. Waste remediation and treatment using anoxygenic Phototrophic bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT and Bauer CE, (eds): Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, pp.1269-1282.

[2] Sasaki, K., Tanaka, T and Nagai, S. 1998. Use of photosynthetic bacteria for the production of SCP and chemicals from organic wastes. In: Bioconversion of waste materials to industrial products, second edition. Martin AM, (eds): Blackie Academic and professional, pp. 247-291.

[3] Koh, R.H. And Song, H.G. 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. **J. Microbiol. Biotechnol**. 17: 1805-1810.

[4] Lee, K.H., Koh, R.H. and Song, H.G. 2008. Enhancement of growth and yield of tomato by *Rhodopseudomonas* sp. under greenhouse conditions. **The J. Microbiol**. 46: 641-646.

[5] Raymond, J., Siefert, J.L. Staples, C.R. and Blankenship, R.E. 2004. The natural history of nitrogen fixation. **Mole. Biol. Evolution**. 21: 541-555.

[6] Sasikala, Ch., Ramana, Ch.V. and Rao, P.R. 1994. 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganisms. **Biotechnol. Prog**. 10: 451-459.

[7] Hotta, Y. Tanaka, T., Takaoka, H., Takeuchi, Y. and Konnai, M. 1997. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. **Plant Growth Regul**. 22: 109-114.

[8] Al-Thabet, 2006a. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on growth and yield of wheat grown under dry conditions. **J. Agron**. 5(1): 45-49.

[9] Al-Thabet, S.S. 2006b. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on growth and yield of wheat grown under drough conditions. **J. Agron**. 5: 45-49.

[10] Al-Khateeb, A.A., Alkhateeb, S.A., Okawara, R. and Al-Abdoulhady, I.A. 2006. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) on fruit yield and quality of Date Palm cv. Khalas. **J. Biol. Sci**. 6(6): 1118-1121.

[11] Korkmaz, A. and Korkmaz, Y. 2009. Promotion by 5-aminolevulinic acid pepper seed germination and seedling emergence under low-temperature stress. **Sci. Hort**. 119: 98-102.

[12] Awad, M.A. and Al-Qurashi, A.D. 2011. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on growth of young 'Barhee' tissue culture derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.) trees in a newly established orchard. **J. Food. Agric. Environ**. 9: 783-786.

[13] Xu, F., Cheng, S., Zhu, J., Zhang, W. and Wang, Y. 2011. Effect of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoid of *Ginko biloba*. **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj**. 39(1): 41-47.

[14] Nishihara, E., Kondo, K., Parvez, M.M., Takahashi, K., Watanabe, K. and Tanaka, K. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). **J. Plant. Physiol**. 160: 1085-1091.

[15] Richter, A., Peter, E., PÖrs, Y., Lorenzen, S. and Grimm, B. 2010. Rapid dark repression of 5-aminolevulinic acid synthesis in green barley leaves. **Plant. Cell. Physiol**. 51(5): 670-681.

[16] Maruyama-Nakashita, A. 2012. Sulfate uptake, cysteine and GSH contents are increased by 5-aminolevulinic acid in *Arabidopsis thaliana*. Sulfur metabolism in plants proceedings of the international plant sulfur workshop. 1: 85-89.

[17] Mishra, S.N. and Srivastava, H.S. 1983. Stimulation of nitrate reductase activity by delta aminolevulinic acid in excised maize leaves. **Experientia**. 39: 1118-1120.

[18] Sasaki, K., Ikeda, S., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. 1987. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. **J. Ferment. Technol**. 65: 511-515.

[19] Akram, N.A. and Ashraf, M. 2011. Pattern of accumulation of inorganic elements in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants subjected to salt stress and exogenous application of 5-aminolevulinic acid. **Pak. J. Bot.** 43(1): 521-530.

[20] Youssef, T., Awad, M.A. 2008. Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm Seedling (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by 5-aminolevulinic acid based fertilizer. **J. Plant. Growth Regul**. 27: 1-9.

[21] Balestrasse, K.B. Tomaro, M.L., Batlle, A. and Noriega, G.O. 2010. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. **Phytochemistry**. 71: 2038-2045.

[22] Kumar, A.M., Chaturvedi, S. and SÖll, D. 1999. Selective inhibition of HEMA gene expression by photooxidation in Arabidopsis thaliama. **Phytochem**. 51: 847-851.

[23] Wang, J.J., Jiang, W.B. Zhang, Z., Yao, Q.H., Matsui, H. and Ohara, H. 2003. 5-Aminolevulinic acid and its application in agriculture. **Plant. Physiol. Commune**. 39: 185-192.

[24] Osaki, M., Watanabe, T., Ishizawa, T., Nilnond, C.. Nuyim, T., Sittibush, C. and Tadano, T. 1998. Nutrition al characteristics in leaves of native plants grown in acid sulfate, peat, sandy podzolic and saline soils distributed in peninsular Thailand. **Plant and Soil**. 202: 175-182.

[25] Saikeur, A., Choorit, W., Prasertsan, P., Kantachote, D. and Sasaki, K. 2009. Influence of precursors and inhibitor on the production of extracellular 5-aminolevulinic acid and biomass by *Rhodopseudomonas palustris* KG31. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 73: 987-992.

[26] Mauzerall, D. and Granick, S. 1956. The occurrence and determination of δ-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. **J. Biol. Chem**. 219: 435-446.

[27] Madigan, M.T. and Marrs, B.L. 1997. Extremophiles. **J. Sci. Am.** 276: 66-71.

[28] Kantachote, D., Torpee, S. and Umsakul, K. 2005. The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. **Electron. Biotechnol**. 8: 314-323.

[29] Pfenning, N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a New species of the *Rhodospirillaceae*. **Arch Microbiol**. 100: 197-206.

[30] Imhoff, J.F. 2011. Transfer of *Rhodopseudomonas acidophilla* to the new genus *Rhodoblastus* as *Rhodoblastus acidophilus* gen. nov., comb. **Nov Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 51: 1863-1866.

[31] Madigan, M.T. 2003. Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. **Photosyn. Research**. 76: 157-171.

[32] Alam, S.M. 1981. Effect of solution pH on the growth and chemical composition of rice plant. **J. Plant Nutr.** 4(3): 247.

[33] Sidhu, G.S. 1998. Role of Microorganisms in soil fertility. **Ultra Gro Plant Food**. Vol. 1-10.

[34] Koesnandar, P.S., Nurani, D. and Wahyono, E. 2005. Government role on research and application of technology for peatland utilization. National seminar on peatlands and their problems. March 21st 2006. University of Tanjungpura, Pontianak. (In Indonesia).

[35] Motola, S. and Agharkar, S. N. 1992. Preformulation research of parenteral medications (2nd ed.). In K. E. Avis, H. A. Lieberman, & L. Lachman(Eds.), Pharmaceutical dosage forms: Parenteral Medications. New York: Marcel Dekker. 1: 115-172.

[36] Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. 1990. Production of herbicide, 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine wastes from an anaerobic digester. **Applied Microbiol and Biotechnol**. 32: 727-731.

[37] Tangprasittipap, A., Prasertsan, P., Choorit, W. and Sasaki, K. 2002. 5-aminolevulinic acid from photosynthesis bacteria and its applications. **Songklanakarin J. of Science and Tech**. 24(4): 715-725.

[38] Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T. and Tanaka, T. 2002. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. **Applied. Microbiol. Biotechnol**. 58: 23-29.

[39] Sasaki, K., Watanabe, M. and Nishio, N. 1997. Inhibition of 5-aminolevulinic acid (ALA) dehydratase by undissociated levulinic acid during ALA extracellular formation by *Rhodobacter sphaeroides*. **Biotechnol Lett**. 19: 421-424.

[40] Bhosale, S., Kshirsagar, D., Power, P.,Yeole, T. and Ronade, D. 1995. Purification and characterization of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Methanosarcina berkeri*. **FEMS. Microbiol. Lett**. 127: 151-155.

[41] Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y. and Murooka, Y. 1999. *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. **J. Biosci. Bioeng**. 87: 798-804.

[42] Kamiyama,H., Hotta, Y., Tanaka, T., Nishikawa, S and Sasaki, K. 2000. Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a photosynthetic bacteria. **Seibutu-Kougaku**. 78: 48-55.

[43] Noparatnaraporn,N., Watanabe, M. and Sasaki, K. 2000. Extracellular formation of 5-aminolevulinic acid by intact cells of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. under various pH
conditions. World. **J. Microbiol. Biotechnol**. 16: 313-315.

[44] Chung, S.Y., Seo, K.H. and Rhee, J.I. 2005. Influence of culture conditions on the production of extra-cellular 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli*. **Process. Biochem**. 40: 385-394.

[45] Qin, G., Lin, J.P., Liu, X.X. and Cen, P.L. 2006. Effects of medium compositions on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*. **J. Biosci. Bioeng**. 102: 316-322.
Applied Microbiol and Biotechnol. 32: 727-731.

[46] Wang, J.Q., Wu. J.H. and Zhang, Z.M. 2006. Expression of 5-aminolevulinic acid synthase in recombinant *Escherichia coli*. **World. J. Microbiol. Biotechnol**. 22: 461-468.

[47] Fu, W.Q., Lin, J.P. and Cen, P.L. 2007. 5-Aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. **Applied. Microbiol. Biotechnol**. 75: 777-782.