หัวข้อวิทยานิพนธ์ การบำบัดฟอสเฟตในน้ำเสียเพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้เซลล์ตรึง *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ ΔsphU ภายในถังปฏิกรณ์อาร์เอเอสร่วมกับการเพิ่มการผลิตพีเอชบี
ชื่อ – นามสกุล นายณัฐวุฒิ กระแสสืบ
สาขาวิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์วันทนีย์ เขตต์กรณ์, วท.ด.
ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอีกหนึ่งอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว และพบว่าอุตสาหกรรมเหล่านี้มีการผลิตน้ำเสียที่มีสารอาหารสูง ประกอบด้วยสารประกอบแอมโมเนีย ไนเตรทและฟอสเฟต ดังนั้นน้ำเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงต้องผ่านการบำบัดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ เพื่อป้องกันการเกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 สายพันธุ์ ΔsphU โดยใช้น้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งภายใต้ระบบหมุนเวียนน้ำแบบอาร์เอเอสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบให้แสงเพื่อการผลิตพลาสติกชีวภาพร่วมกับการบำบัดฟอสเฟตและเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิคทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลในการเพิ่มการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพีเอชบี

ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงคือเซลล์ที่ 100% (600 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งสามารถบำบัดฟอสเฟตได้ 72.04% ภายใน 27 ชั่วโมงภายใต้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบให้แสง นอกจากนี้เซลล์ที่ถูกดัดแปลงภายใต้สภาวะที่ขาดฟอสเฟต (-P) สามารถบำบัดฟอสเฟตได้ดีกว่าเซลล์ในสภาวะปกติ (+P) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเซลล์ ΔsphU ที่ถูกปรับสภาพก่อนนำมาตรึง (-P) มีศักยภาพในการบำบัดฟอสเฟตและไนเตรท ซึ่งมีอัตราการบำบัดมากกว่า 70% และ 90% ในระบบอาร์เอเอสทั้งสามรอบ อย่างไรก็ตามการตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนตไม่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ในระบบอาร์เอเอสได้ ในทางตรงกันข้ามเซลล์ ΔsphU แบบไม่ถูกตรึงสามารถใช้น้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อส่งเสริมการผลิตชีวมวลและพีเอชบีได้ ผลผลิตชีวมวลสูงสุดประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ปริมาณพีเอชบีสูงสุดคือ 32.48% ให้อัตราการผลิตสูงสุด 12.73 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน พีเอชบีที่ผลิตจาก ΔsphU มีคุณสมบัติของวัสดุใกล้เคียงกับพีเอชบีที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้การผลิตพีเอชบีในเซลล์ *Synechocystis* ยังขึ้นอยู่กับการควบคุมของยีนไม่เพียงแต่การเครียดจากการมีสารอาหารที่จำกัด การเพิ่มแสดงออกของยีน *atoB* และ *hbd* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พีเอชบีของแบคทีเรียไปสู่จีโนมของ *Synechocystis* สามารถส่งเสริมการผลิตพีเอชบีในสายพันธุ์ดั้งเดิมได้อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ ΔsphU มีศักยภาพในการผลิตพีเอชบีสูงกว่าสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะเดียวกัน

คำสำคัญ: การบำบัดฟอสเฟต การตรึง น้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง อาร์เอเอส และพีเอชบี

Thesis Title	Phosphate Removal of Shrimp Aquaculture Wastewater Using Immobilized *Synechocystis* sp. Strain ΔsphU Under RAS-Reactor with Enhanced PHB Production
Name – Surname	Mr. Nattawut Krasaesueb
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Assistant Professor Wanthanee Khetkorn, Ph.D.
Academic Years	2019

ABSTRACT

Aquaculture farming is one of the fastest growing food industries. These industries generate nutrients rich wastewater containing ammonia, nitrate and phosphate compounds. Therefore, wastewater generated in aquaculture industry needs treatment prior to release into the environment in order to avoid the eutrophication.

The aims of this study were to: 1) cultivate immobilized cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain ΔsphU using shrimp wastewater under the recirculating aquaculture system (RAS) in a photobioreactor for bioplastic production integrated phosphate removal, and 2) study the optimum conditions using biochemical and genetic engineering techniques for enhanced bioplastic (PHB) production.

It was found that the optimum cell concentration for immobilization was the cell at 100% (600 mg L^{-1}) with 72.04% of phosphate removal within 27 h under a batch photobioreactor. In addition, cells adapted under phosphate starvation (-P) could remove phosphate better than those adapted in a normal condition (+P). The results suggested that immobilized (-P) adapted ΔsphU cell had a potential of PO_4^{3-} and NO_3^- removal. The rates were over 70% and 90% in all three cycles of the RAS system. However, the cells encapsulated in calcium-alginate could not support cell growth in the RAS system. In contrast, the free ΔsphU cells could utilize shrimp wastewater for promoting biomass and PHB production. The maximum biomass yield was approximately 500 mg L^{-1} when cultured for 14 days. The highest PHB content was 32.48% (w/w) with the maximum PHB productivity at 12.73 mg $L^{-1}d^{-1}$ after 11 days of cultivation. The produced PHB of ΔsphU had similar material properties to those of the commercial PHB. Moreover, PHB production in the *Synechocystis* cells not only depended on stress nutrients limitation but also on gene regulation. The overexpression of *atoB* and *hbd* genes involved in PHB biosynthesis of bacteria into *Synechocystis* genome could induce PHB promotion in wild types. However, the ΔsphU strain held a higher potential for PHB production than the overexpression strain under the same condition.

Keywords: phosphate removal, immobilization, shrimp wastewater, RAS and, PHB