สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานความก้าวหน้า
โครงการวิจัย
งบประมาณแผ่นดินของคณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๐

การผลิตไบโอไฮโดรเจนพลังงานทดแทนแหล่งใหม่จากจุลสาหร่าย

Production of An alternative energy biohydrogen from algae

RCH
TP
245
.H9
ส349ก
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....84478
วัน,เดือน,ปี.....13 มี.ค. 2551

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.....
i.....
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์เชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Hydrogen is one of the alternative energy sources. It can be produced from the living organisms or microorganisms which is called "Biohydrogen". Biohydrogen from cyanobacteria and green algae is produced from the solar energy via the process "Photosynthesis". This project aims to study hydrogen production from cyanobacteria and green algae isolated from natural ponds, obtained from the Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) and a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. Cells were grown in BG11 medium for 2 weeks. Their growths were studied by the optical density at 730 nm measurement. It was found that their growths were similar. Two weeks-old culture was harvested and anaerobic-adapted for 30 minutes. The result showed that *A. halophytica* produced the highest hydrogen at 0.825 nmol H_2/μg chl a/h.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.3 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	23
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph	23
3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์	24
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
4.1 ผลการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติให้มีความบริสุทธิ์	26
4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ	28
4.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (ว.ว.)	30
4.4 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*	38
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	42
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก ก	47
ภาคผนวก ข	48
ภาคผนวก ค	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย 13

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph - Thermal conductivity Detector (GC-TCD) 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน	6
2.2	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	8
2.3	ภาพรวมของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ	9
2.4	วิถีของการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย	10
2.5	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในไซยาโนแบคทีเรีย	12
2.6	โครงสร้างของยีน *hupSL* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 สายพันธุ์ปกติ (wild type) และมิวแตนท์ (mutant AMC 414)	17
3.1	การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปตและการดูดเชื้อภายใต้กล้อง inverted microscope	22
3.2	ไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11	22
3.3	การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในฟลาสก์	23
4.1	บ่อน้ำธรรมชาติที่ใช้ในการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	26
4.2	ไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11	27
4.3	ไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	27
4.4	สาหร่ายสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	28
4.5	การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย สาหร่ายสีเขียวรูปร่างรีและสาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลม	29
4.6	ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ	30
4.7	*Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261	31
4.8	*Scenedesmus obliquus* TISTR 8522	32
4.9	*Ankistidesmus falcatus* TISTR 8557	32
4.10	*Synechococcus* sp. PCC 7942	33
4.11	*Calothrix agardh*	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.12	*Synechocystis* sp. PCC 6803	34
4.13	*Nostoc carneum*	35
4.14	*Anabaena siamensis*	35
4.15	การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในอาหาร BG11	36
4.16	ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	37
4.17	*Aphanothece halophytica*	38
4.18	การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* ในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution และ *Anabaena siamensis* ในอาหาร BG11	39
4.19	ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece holophytica* เปรียบเทียบกับ *Anbaena siamensis*	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศจะได้ออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ ในปัจจุบัน มีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและขับดันยานอวกาศ ในประเทศเยอรมนีมีการประดิษฐ์รถยนต์ที่ใช้พลังงานไฮโดรเจน ในการขับเคลื่อน นอกจากนี้ ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการสร้างโรงงานผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเทอร์โมเคมิสทรี ซึ่งในการผลิตต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและเสี่ยงต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พลังงานไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตจำพวกสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่เกิดจากการแปรพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ให้เกิดประโยชน์ (Schulz. 1996)

ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต มีรายงานพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยสามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 3 ประเภท ดังนี้

1. แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (Phototrophic bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้จัดเป็น Anoxygenic phototrophic bacteria ประกอบด้วย 3 กลุ่มคือ (1) Non-sulfur purple bacteria ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. (2) Sulfur purple bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. (3) Green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. โดยการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียเหล่านี้มีรงควัตถุที่แตกต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวคือ แบคทีเรียกลุ่มนี้สังเคราะห์แสงโดยไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์หรือไธโอซัลเฟตซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สาหร่าย (Algae)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวจึงจัดเป็น Photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Codium* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นต้น

3. ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน (Oxygenic phototrophic prokaryote) ที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบและมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดของคลอโรฟิลล์เหมือนสาหร่ายและพืชสีเขียว กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคล้ายกับสาหร่าย แต่ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านทางกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) เช่น *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* sp., *Calothrix* sp., *Mastigocladus* sp. และ *Nostoc* sp. เป็นต้น

ในจำนวนสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไบโอไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากเป็นการนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ผลพลอยได้ในวิถีเป็นพลังงานไฮโดรเจน ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้และไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศอีกด้วย แบคทีเรียก็สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เช่นกันแต่จำเป็นต้องมีสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติในเขตลาดกระบัง
2. ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในเขตลาดกระบัง
3. ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
4. ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ในอาหาร BG11 เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution และคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติให้บริสุทธิ์ในเขตลาดกระบัง โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 แล้วนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้มาศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วันเป็นเวลา 14 วันและศึกษาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบชนิดของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงและปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ
    1). เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ นำตัวอย่างน้ำมาทำการส่องดูเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แยกเซลล์เดี่ยวด้วยพาสเจอร์ปิเปต นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาทีและให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน
    2). ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยการ streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง BG11
    3). นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว BG11 ปริมารตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน

4). **วัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน และวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 2 โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC)**

2. **การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)**

1). **ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ในอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน**

2). **วัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน และวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 2 โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC)**

3. **การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม**

1). **ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน**

2). **วัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน และวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 2 โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

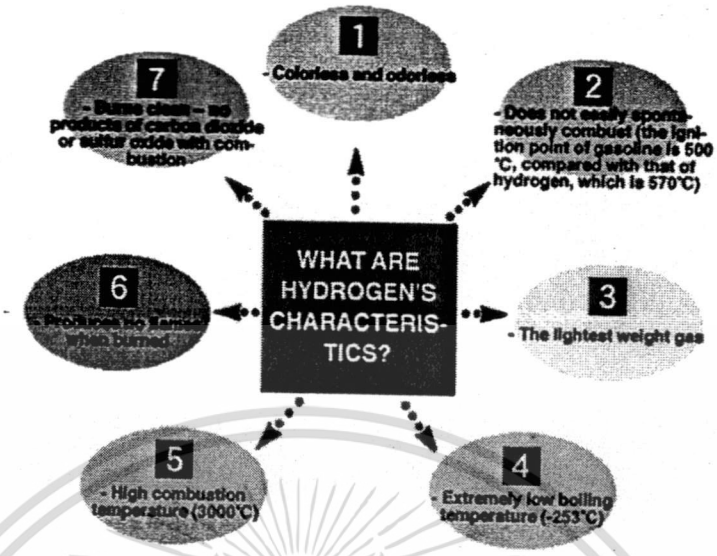
บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน

พลังงานมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์อย่างมาก นอกจากจะใช้เพื่อให้เกิดความสะดวกสบายในบ้านเรือนแล้ว พลังงานยังถูกนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคมและการผลิตกระแสไฟฟ้า ไม่ว่าจะเป็นพลังงานจากน้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ซึ่งพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด และคาดว่ากำลังจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นานนัก นอกจากนี้ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของพลังงานเหล่านี้ก่อให้เกิดมลพิษ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ก่อให้เกิดสภาวะเรือนกระจก ก๊าซคาร์บอนมอนออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เถ้าและฝุ่นละออง เป็นต้น สำหรับประเทศไทย พบว่ามีปริมาณพลังงานสำรองทรัพยากรเชื้อเพลิงภายในประเทศ ซึ่งเป็นน้ำมัน 0.714 พันล้านบาร์เรล สามารถใช้ได้อีกประมาณ 20 ปี มีปริมาณก๊าซธรรมชาติ 33 ล้านล้านลูกบาศก์ฟุต สามารถใช้ได้อีกประมาณ 30 ปี และมีปริมาณถ่านหิน 0.984 พันล้านตันซึ่งใช้ได้อีกประมาณ 60 ปี ประเทศไทยมีการนำเข้าพลังงานคิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการนำเข้าสินค้าทั้งหมด พลังงานที่นำเข้าส่วนใหญ่คือ น้ำมันเชื้อเพลิง ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เพราะพลังงานที่มีอยู่กำลังจะหมดไปและพลังงานทดแทนนั้นจะต้องเป็นพลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ น้ำพุร้อน พลังงานในมหาสมุทร พลังงานคลื่นทะเล รวมถึงพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นพลังงานที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน (ชัยชาญ, 2547)

ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและไม่มีรส (รูปที่ 2.1) ให้พลังงาน 52,000 บีทียูต่อปอนด์ เมื่อทำการเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนมีค่าพลังงานต่อหน่วยสูงสุดเมื่อเทียบกับบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน
ที่มา : http://www.enaa.or.jp/WE-NET/suiso/suiso1_e.html

ปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและใช้ในการขับดันยานอวกาศ ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมและจากกระบวนการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า (electrolysis process) นอกจากนี้ ในประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี ยังมีการผลิตรถยนต์ที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน อย่างไรก็ตาม ค่าใช้จ่ายในการผลิตมีราคาค่อนข้างสูง ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต หรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) มากขึ้น

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด ไม่ก่อมลพิษแก่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ในปัจจุบัน กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถทำได้หลายวิธี บางวิธีก็สามารถนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมและบางวิธีก็อยู่ในขั้นตอนของการวิจัยและพัฒนา ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

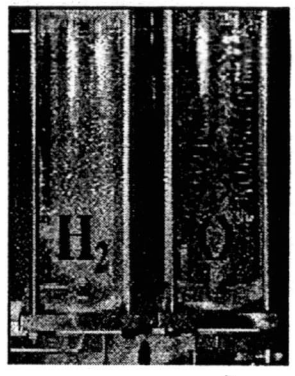
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ ซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างสารไฮโดรคาร์บอนกับน้ำในรูปไอน้ำ ที่อาศัยพลังงานความร้อนทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการทางนี้นิยมใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางอุตสาหกรรม โดยอาจเรียกว่าเป็นกระบวนการเรียกว่า coal gasification ข้อเสียของกระบวนการดังกล่าว คือ การก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ คาร์บอนไดออกไซด์และซัลเฟอร์ เป็นต้น

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าเป็นวิธีการในการใช้กระแสไฟฟ้าแยกโมเลกุลของน้ำ (water electrolysis) โดยตรงทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอมดังรูปที่ 2.2 ทั้งนี้อาศัยอิเล็กโทรด (electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (positive electrode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (negative electrode) วิธีการเตรียมคือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้ความเป็นตัวนำมากขึ้น โดยการเติมสารพวกอิเล็กโตรไลท์ (electrolyte) เช่น กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) หรือ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไปโดยไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวก วิธีนี้ต้องการกระแสไฟฟ้าถึง 90 กิโลวัตต์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต โดยวิธีนี้จะให้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง ข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและมีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำและจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า
ที่มา: http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

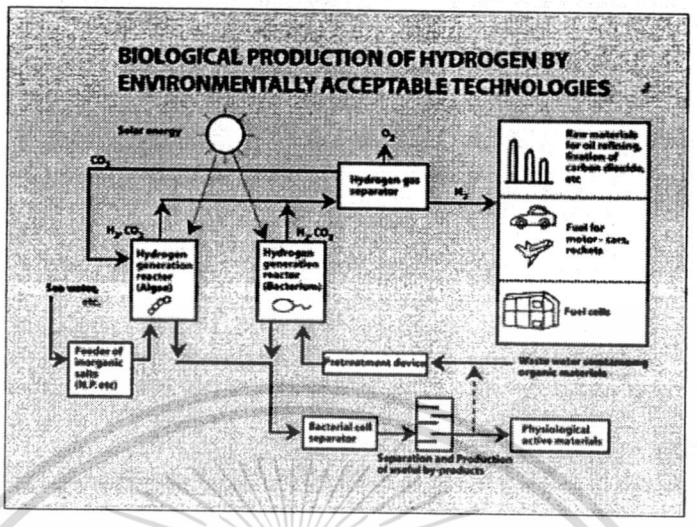
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมิสทรีเป็นกระบวนการที่มีการพัฒนาการผลิตโดยการใช้สารประกอบปรอทโบรไมด์ และแคลเซียมอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียสในกระบวนการผลิต ขั้นตอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนดังกล่าวเรียกว่า เทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry) ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ สามารถใช้ความร้อนในช่วงที่ถังปฏิกรณ์นิวเคลียร์ทำงานและที่พลังงานที่ได้จะถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ เกิดปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนักอันได้แก่ ปรอท และโบรไมด์

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen)

นอกจากวิธีการข้างต้นที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเรียกไฮโดรเจนที่ผลิตได้ว่าเป็นไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) (รูปที่ 2.3) จุลินทรีย์หลายชนิดมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน หรือรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นไฮโดรเจน จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนปลดปล่อยสู่บรรยากาศ ประมาณการณ์กันว่ามีก๊าซไฮโดรเจนหมุนเวียนในระบบนิเวศปีละ 200 ล้านตัน ข้อดีของกระบวนการนี้คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้เป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าวิธีอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ภาพรวมของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ
ที่มา: http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.3.1 กลุ่มโฟโตโทรฟิคยูคาริโอต (Phototrophic eukaryote)

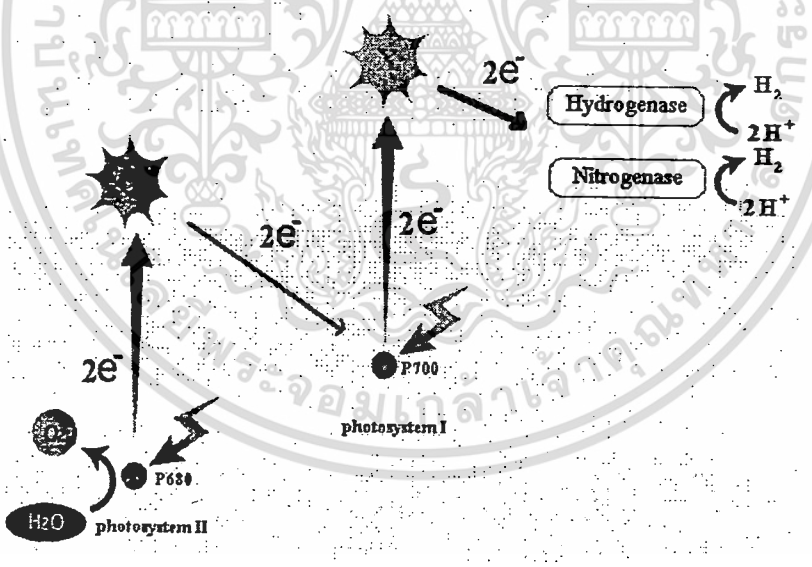
2.3.1.1 สาหร่าย (algae)

สาหร่ายบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายเกิดขึ้นเมื่อมีการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ไม่ออกซิเจน ซึ่งระยะ เวลาในการปรับตัวนั้นจะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 30 นาทีจนถึง 4 ชั่วโมง ซึ่งในระหว่างที่มีการปรับตัวนั้นจะมีการกระตุ้นหรือสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) โดยอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านจากเฟอร์รี-ดอกซิน (ferredoxin) เพื่อไปใช้ในการรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยปฏิกิริยาดังกล่าวถูกเร่งการทำงานด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

ภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน สำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย อิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านระบบแสง (photosystem) 2 ระบบ คือ ระบบแสงที่ 1 (photosystem I : PSI) ที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (P700) และระบบแสงที่ 2 (photosystem II : PSII) ที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร (P680) ไปยังตัวพาอิเล็กตรอน (electron carrier) ตัวพาอิเล็กตรอนจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับเฟอร์รีดอกซิน จากนั้นจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (ferredoxin oxidoreductase) ในกระบวนการตรึงหรือให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แก่เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (nitrate reductase) และไทโอซัลโฟเนตรีดักเทส (thiosulfonate reductase) สำหรับปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนเทรตและซัลเฟต ส่วนก๊าซไฮโดรเจนจะถูกผลิตผ่านทางเอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส อิเล็กตรอนที่ถูกใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นได้มาจากกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำในระบบแสงที่ 2 และการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์โดยอิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงที่ 1 (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 วิถีของการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย (ไซยาโนแบคทีเรียเท่านั้นที่มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส)
ที่มา: http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรายงานของ Graffron และ Rubin (1942) พบว่า *Scenedesmus* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่ไม่เพียงแต่สามารถผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่มีแสงเท่านั้น แต่ยังสามารถผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจนอีกด้วย โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งปฏิกิริยาการคะตะไลส์ของการผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แสดงดังสมการที่ 2.1

$$2H^{+} + 2X_{reduced} \longrightarrow H_2 + 2X_{oxidized}$$ สมการที่ 2.1

ตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่เพียงแต่จะได้มาจากอิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำ แต่ยังได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่สะสมในเซลล์ เช่น แป้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

2.3.2 กลุ่มโฟโตโทรฟิคโปรคาริโอต (phototrophic prokaryote)

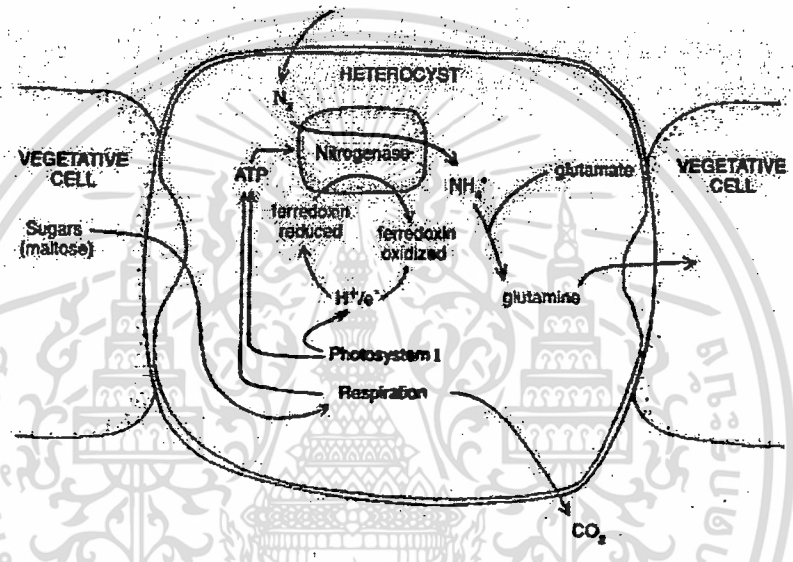
2.3.2.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบมีออกซิเจน

กลุ่มนี้ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green bacteria) ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงแบบมีออกซิเจน (oxygenic phototrophic prokaryote) ที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีชนิดของคลอโรฟิลล์เหมือนสาหร่ายสีเขียวและพืช

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับสาหร่าย(รูปที่ 2.4) แต่ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านทางกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) ไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst cell) นั้นไม่มีระบบแสงสามารถตรึงไนโตรเจนผ่านทางเอนไซม์ไนโตรจีเนสและผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จะมีการตรึงโมเลกุลไนโตรเจนพร้อมกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการผลิตกลูตามีน โดยกลูตามีนที่ผลิตได้จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเซลล์ปกติ (vegetative cells) (รูปที่ 2.5) เนื่องจากเฮเทอโรซิสต์นั้นไม่มีระบบแสงจึงไม่มีกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลน้ำ ดังนั้นจึงไม่มีการสร้างก๊าซออกซิเจนไปยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำงานของเอนไซม์ในโตรจีเนส เซลล์เฮเทอโรซิสต์จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสหรือ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า membrane bound hydrogenase เป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสมิคเมมเบรน (cytoplasmic membrane) หรือไทลาคอยด์เมมเบรน (thylakiod membrane) ของเฮเทอโรซิสต์ซึ่งจะช่วยป้องกันเอนไซม์ในโตรจีเนสด้วยการรีดิวซ์โมเลกุลออกซิเจนไปเป็นน้ำ



รูปที่ 2.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา: http://www.fao.org/.../w7241e0g.htm#chapter%20hydrogenproduction

นอกจากนี้ กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง โดยภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการผลิตก๊าซออกซิเจนและมีการสะสมพอลิแซคคาไรด์ แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีก๊าซออกซิเจนเอนไซม์ในโตรจีเนสจะถูกสร้างขึ้นและกระตุ้นให้ทำงาน และมีการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์เพื่อให้ได้อิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ดังนั้น ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน โดยจะมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้แสดงดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

สายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้
Heterocystous nitrogen fixing	
Nostoc linkia	22 ml / mg dry weight / h
Anabaena cylindrica	1.91 ml / mg dry weight / h
Anabaena cylindrica	1 µmol / mg dry weight / h
Non-heterocystous nitrogen fixing	
Oscillatoria sp.	260 µmol / mg dry weight / h
Oscillatoria sp.	5-6 µmol / mg dry weight / h
Non-nitrogen fixing	
Synechococcus sp.	0.05-1.38 µmol / mg dry weight / h
Microcystis sp.	11.3 nmol µmol / mg dry weight / h
Gloeobacter sp.	1.38 µmol / mg dry weight / h
Synechocystis sp.	0.07 µmol / mg dry weight / h
Aphanocapsa sp.	0.40 µmol / mg dry weight / h

ที่มา : Fernando และคณะ (2002)

2.3.2.2 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบไม่มีออกซิเจน

แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย คือ 1) กลุ่ม Non-sulfur purple bacteria ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. 2) กลุ่ม Sulfur purple bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. และ 3) กลุ่ม Green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเหล่านี้มี รงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชสีเขียว คือมีรงควัตถุเป็นแบคเทอริโอ-คลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ (sulfide) ซัลเฟอร์ (sulfur) ไทโอซัลเฟต (thiosulfate) สารประกอบอินทรีย์ (organic compound) หรือโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเล็กตรอนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย (ลัดดา, 2542)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย คุณสมบัติที่สำคัญของไซยาโนแบคทีเรียคือ มีรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป

ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ 5 ประการ คือ

1. มีสารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic pigment) ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน

2. ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram negative) ที่เรียกว่ามิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่า ชีท (sheath) หุ้มอยู่โดยรอบชีทนี้มีความหนาบางต่างกัน อาจมีสีหรือไม่มีสีหรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ

3. ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา ไซยาโนแบคทีเรียทั่วไปมีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)

4. ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารประเภทแป้งชนิดหนึ่งคือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปที่เรียกว่าไซยาโนไฟซิน-แกรนูล (cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน

5. ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอต แตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) คือสารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติดแต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 สาหร่ายสีเขียว (ยุวดี, 2546)

สาหร่ายสีเขียวนี้จะพบได้ทั่วไปแทบทุกหนทุกแห่ง ประมาณกันว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของสาหร่ายทั้งหมดเป็นสาหร่ายทะเล ซึ่งจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสง และความสมบูรณ์ของอาหาร สาหร่ายสีเขียวที่เป็นสาหร่ายทะเลมักจะพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง อาจจะมีบ้างที่พบในระดับความลึกถึง 300 ฟุต ส่วนอีก 90 เปอร์เซ็นต์ ของสาหร่ายทั้งหมดจะเป็นสาหร่ายน้ำจืด หรือสาหร่ายที่ขึ้นอยู่บนภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นอากาศก็ได้ สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดอาจจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นๆ หรือน้ำลึกๆที่แสงส่องถึง และหลายชนิดมีสภาพเป็นแพลงก์ตอนพืช บางชนิดก็ขึ้นอยู่บนก้อนหิน ทราย โคลน เปลือกหอย บนพืช หรือสัตว์อื่น หรืออาจเจริญอยู่ในพืช หรือสัตว์อื่นก็ได้ อาจขึ้นอยู่ในดิน หรือในเปลือกไม้แตก บางชนิดสปอร์ของมันอาจจะปนมากับฝุ่นละออง และบางชนิดอาจจะพบอยู่ในหิมะ หรือน้ำแข็งก็ได้สาหร่ายสีเขียวนี้เป็นดิวิชันที่มีสมาชิกมาก กล่าวคือ มีประมาณ 450 จีนัส 7000 สปีชีส์ แต่ละจีนัสมีความแตกต่างกันมากทั้งรูปร่าง โครงสร้าง และการสืบพันธุ์

2.5.1 ลักษณะทั่วไป

2.5.1.1 รงควัตถุ รงควัตถุของสาหร่ายสีเขียว ประกอบด้วย

2.5.1.1.1 คลอโรฟิลล์ เป็นคลอโรฟิลล์เอ และบี

2.5.1.1.2 แคโรทีนอยด์ ประกอบด้วย

- แอลฟา เบตา และแกมมาแคโรทีน
- แซนโธฟิลล์ มีหลายชนิด ชนิดที่มีมากคือ ลูเทอิน (lutein) ซีแซนธิน (zeaxanthin) ไวโอโลแซนธิน (violoxanthin) และนีโอแซนธิน (neoxanthin)

2.5.1.2 คลอโรพลาสต์

โครงสร้างของคลอโรพลาสต์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเลคตรอนจะมองเห็นลักษณะเป็นแบบกรานา (grana chloroplast) กล่าวคือ ไทลาคอยด์ที่เรียงกันเป็นชั้นๆแบบพืชชั้นสูงทั่วไป โดยมีจำนวนไทลาคอยด์ตั้งแต่ 2-6 อัน แต่ลักษณะของไทลาคอยด์ที่เรียงกันเป็นชั้นไม่สม่ำเสมอ เหมือนพืชชั้นสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างแตกต่างกัน ดังนี้

2.5.1.2.1 คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นเกลียว (helical or spiral chloroplast) พบใน *Spirogyra*

2.5.1.2.2 คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นรูปดาว (stellat chloroplast) พบใน Zygnema

2.5.1.2.3 คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นแบนหนึ่งแผ่น (lamella or flat plate chloroplast) เมื่อมองด้านตรงจะเห็นแผ่นเต็มเซลล์ แต่เมื่อมองด้านข้างจะเห็นเป็นแผ่นแบบบาง มีไพรีนอยด์อยู่เป็นระยะๆ พบใน *Mougeotia*

2.5.1.2.4 คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นร่างแห (reticulate chloroplast) พบใน *Oedogonium*

2.5.1.2.5 คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นกระบอกตวงหัวท้ายปิด (open cylinder chloroplast) หรือคล้ายกำไลข้อมือของชาวเขาที่ทำด้วยเงินเป็นแผ่นแบบกว้างรูปทรงกระบอกมีด้านเปิดอยู่ด้านหนึ่ง (snap on braceiet) พบใน *Ulothrix*

2.5.1.2.6 คลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะเป็นรูปถ้วย (cup shaped chloroplast) พบใน *Chlamydomonas*

ดังได้กล่าวมาแล้วว่าสาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะมีไพรีนอยด์ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการสร้างแป้งโดยจะมีเอนไซม์สร้างแป้ง (amylose synthetase) ซึ่งเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแป้ง แต่สาหร่ายที่สร้างแป้งบางชนิดก็ไม่มีไพรีนอยด์ ลักษณะและจำนวนของไพรีนอยด์ในสาหร่ายแต่ละชนิดจะไม่เท่ากัน ซึ่งใช้เป็นหลักในการจัดจำแนกสาหร่ายได้

2.5.1.3 รูปร่าง

สาหร่ายสีเขียวเป็นดิวิชันที่มีครบทุกรูปร่างของสาหร่ายคือ มีทั้งเซลล์เดียว โคโลนีเส้นสาย หลอด หรือ ท่อติดต่อกันตลอด และแบบทัลลัสที่เป็นเนื้อเยื่อพาเรนไคมา พวกที่เป็นเซลล์เดียว และพวกที่เป็นโคโลนีทั้งพวกที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้มักจะเป็นแพลงก์ตอนพืชในน้ำจืดเป็นส่วนใหญ่ ส่วนพวกที่เป็นเส้นสายก็มักพบอยู่ในน้ำจืดเป็นส่วนมาก มีบ้างที่พบในน้ำทะเล ส่วนพวกที่เป็นหลอดหรือท่อติดต่อกันตลอดและพวกที่มีลักษณะเป็นทัลลัสทั้งเล็กและใหญ่ มักพบในน้ำทะเลเป็นส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

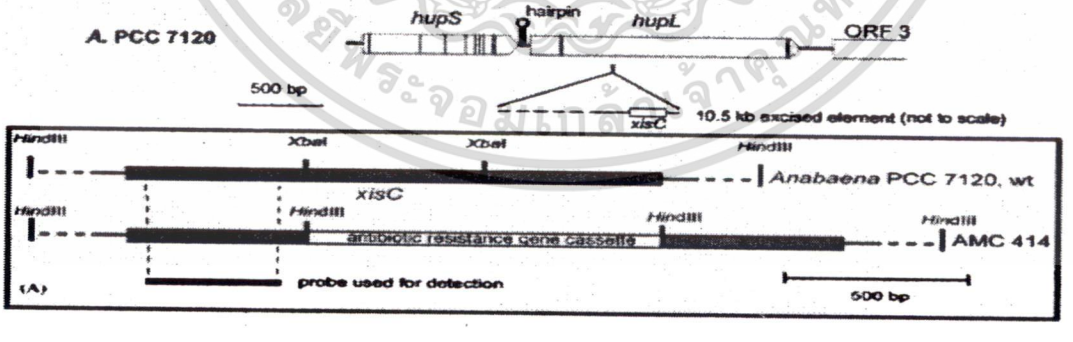
2.5.2 การสืบพันธุ์และวงจรชีวิต

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งแบบการขยายพันธุ์ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ส่วนวงจรชีวิตมีทั้งแบบแฮพลอนติค ดิพลอนติค และดิโพลแฮพลอนติค

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Daday และ Smith (1979) ศึกษาวิธีการวัดการผลิตไฮโดรเจนภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* พบว่าเมื่อเติมเมทิลไวโอโลเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ (1-10 มิลลิโมลาร์) ให้แก่เชื้อที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะทำให้เชื้อมีการผลิตไฮโดรเจน แต่สภาวะนี้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้น ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นใน *A. cylindrica* จึงเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่านั้น นอกจากนี้ ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งโดยคาร์บอนมอนอกไซด์และถูกยับยั้งเพียงเล็กน้อยโดยอะเซทิลีน

Lindblad และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 ชนิดที่เป็นสายพันธุ์ปกติและที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ (mutant AMC 414) โดยการทำให้กลายพันธุ์แสดงได้ในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของยีน *hupSL* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 สายพันธุ์ปกติ (wild type) และมิวแตนท์ (mutant AMC 414)

ที่มา : Lindblad และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
84478

จากรูปจะเห็นได้ว่า โครงสร้างของยีน *hupL* จะมีบริเวณยีน *xisC* อยู่ ซึ่งเป็นยีนที่แทรกอยู่ มีหน้าที่ช่วยทำให้ยีน *hupL* และ *hupS* ที่อยู่ห่างไกลกันอยู่ใกล้กันมากขึ้นและสามารถทำงานร่วมกันได้ดีขึ้นในการถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส การทำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นเกิดจากการตัด *xisC* ออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังรูปและใส่ยีนต้านยาปฏิชีวนะเข้าไปแทนที่ดังรูป จะทำให้ยีน *hupL* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 ไม่สามารถทำงานได้และไม่มีการถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสได้

Gutthann และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยการยับยั้งกระบวนการหายใจและการตรึงไนโตรเจนซึ่งมีส่วนช่วยทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำใน *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ PCC 6803 และพบว่าการยับยั้งด้วยเอนไซม์ในเตรทรีดักเทสในกระบวนการหมักสามารถทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ ดังนี้

3.1.1.1 ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่แยกได้ใหม่จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

3.1.1.2 ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเส้นสายที่แยกได้ใหม่จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

3.1.1.3 *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557
ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.3.4 *Synechococcus* sp. PCC 7942
ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.3.5 *Calothrix agrdh*
ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.3.6 *Synechocystis* sp. PCC 6803
ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.3.7 *Nostoc carneum*
ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.3.8 *Anabaena siamensis*
ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.1.9 *Aphanothece halophytica*
ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 สาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ ดังนี้

3.1.2.1 สาหร่ายสีเขียวรูปร่างรีที่แยกได้ใหม่จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

3.1.2.2 สาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลมที่แยกได้ใหม่จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2.3 *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261
ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.2.4 *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522
ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.2.2 อาหาร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution (ภาคผนวก ข)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV- 50, Japan)

3.3.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)

3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)

3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.3.5 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Delta Laboratory 1375FX, Thailand)

3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z383K, Germany)

3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance) (Scientific Promotion Sartorius BP2215, Thailand)

3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)

3.3.9 เครื่องผสมสาร (vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.3.10 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.11 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3.3.12 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)

3.3.13 แท่งแม่เหล็กคนสาร (magnetic bar)

3.3.14 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (National Scientific, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.15 เข็มฉีดแก๊ส (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.3.16 เครื่อง Gas Chromatograph (SHIMADZU Parasciencetistic) (GC-15A, Japan)

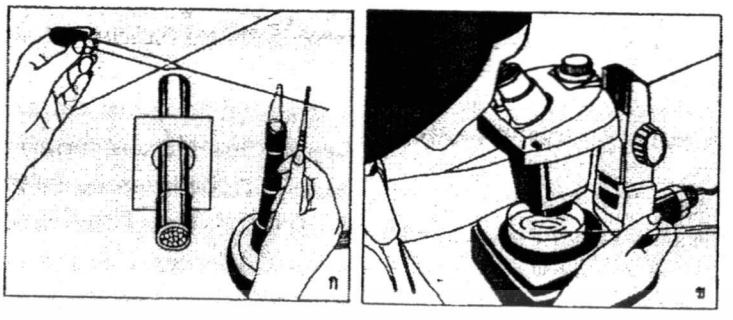
3.3.17 Tissue Culture Plate (Nunc, Denmark)

3.4 วิธีการดำเนินการ

3.4.1 การเก็บตัวอย่างน้ำและคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยใช้ขวด duran ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เปิดฝา จุ่มลงในน้ำจนกระทั่งได้น้ำเต็มขวด นำตัวอย่างน้ำที่มีไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมาทำการแยกเชื้อ โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตเพื่อทำเป็นอุปกรณ์สำหรับดูดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว วิธีทำ ใช้ปากคีบจับปลายด้านหนึ่งของพาสเจอร์ปิเปตแล้วเผาปลายหลอดด้วยตะเกียงบุนเส็นจนกระทั่งพาสเจอร์ปิเปตอ่อนตัว ขณะเดียวกันให้ใช้ปากคีบดึงหลอดแก้วเพื่อให้หลอดยาวขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดจะเล็กลง (รูปที่ 3.1) เมื่อได้ขนาดตามที่ต้องการแล้วใช้ปากคีบดึงส่วนที่ไม่ต้องการทิ้ง ส่วนอีกด้านหนึ่งใส่จุกยางเพื่อใช้ในการดูดเซลล์ นำตัวอย่างที่มีไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวหยดลงบนสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบเซลล์ที่มีไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวให้จุ่มปลายพาสเจอร์ปิเปตกะให้ปลายพาสเจอร์ปิเปตอยู่บนเซลล์พอดี แล้วใช้ปลายปิเปตกดลงบนเซลล์ที่ต้องการ เซลล์นั้นจะถูกดูดขึ้นมาโดยอัตโนมัติ (รูปที่ 3.1) นำเซลล์ที่ถูกดูดขึ้นมาใส่ในหลุม Tissue culture plate ที่บรรจุอาหาร BG11 เรียบร้อยแล้ว ทำการดูดอาหารขึ้นลงอย่างน้อย 3-4 ครั้ง จากนั้นทำการล้างปิเปตโดยทำการดูดขึ้นลงในหลุมที่เตรียมไว้สำหรับการล้างพาสเจอร์ปิเปต วาง Tissue culture plate ที่แต่ละหลุมมีเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแล้ววางในที่มีแสงสว่างเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปต (ก) และการดูดเชื้อภายใต้กล้อง inverted microscope (ข)
ที่มา : ลัดดา (2542)

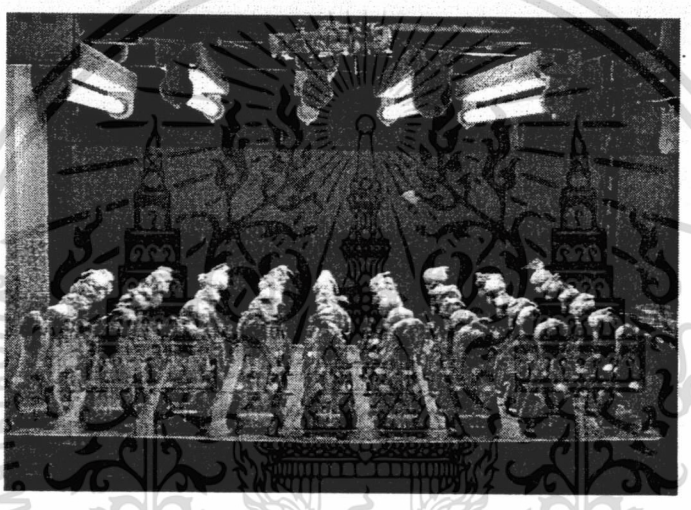
เมื่อไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตใน Tissue culture plate สามารถเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวให้บริสุทธิ์ได้โดยนำลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ไปลนไฟ ทิ้งไว้สักพักให้เย็น แล้วนำลวดเขี่ยเชื้อไปจุ่มในอาหารและนำมาลาก (streak) บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 นำจานเพาะเชื้อวางที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน จะสังเกตพบเซลล์ที่เจริญขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ทำตามขั้นตอนนี้จนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยว (รูปที่ 3.2) แล้วจึงนำเซลล์เดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวต่อไป

รูปที่ 3.2 ไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 (Rippka และคณะ, 1979) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 7 ถึง 10 วัน (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในฟลาสก์

3.4.3 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวไปเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.100 เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ และวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph

นำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลาย จากนั้น ทำการกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 10 มิลลิลิตร แล้วปิเปตใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด ปิดฝาขวด ห่อฟอยล์ แล้วใช้เข็มฉีดยาเข็มที่ 1 เจาะทางด้านบนของขวดเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวด ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซ พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นคว่ำขวด นำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph โดยฉีดก๊าซปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีสภาวะดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph – Thermal conductivity Detector (GC-TCD)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Gas Chromatograph	
Detector	Thermal Conductivity Detector (TID)
Column	Pack column 2 m. ;Molecular sieve 5A mesh 60/80 (Varian, USA)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Oven temperature : 50 °C (initial temperature), holding at 50 °C for 5 min, to 100 °C at 4 °C/min, holding at 100 °C for 2 min Detector temperature : 100 °C
He Carrier gas	Flow rate20 ml/min (99.999 % purity) (Praxair, Korea, Co., Ltd.)

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมาอย่างละ 100 ไมโครลิตร เติมเมทานอล 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (vortex) 45 วินาที ห่อฟอยล์ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำฟอยล์ออก ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารละลายใส่หลอดใหม่แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับเมทานอล 90 เปอร์เซนต์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสมการที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

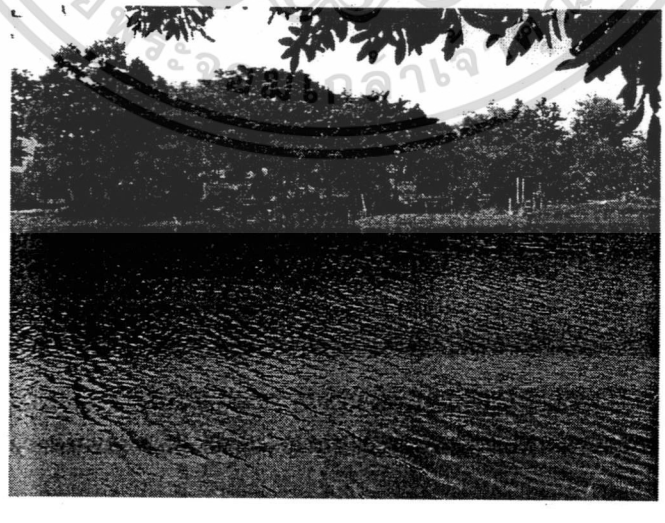
ปริมาณคลอโรฟิลล์ = 12.7 x ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร x 10 สมการที่ 3.1
(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

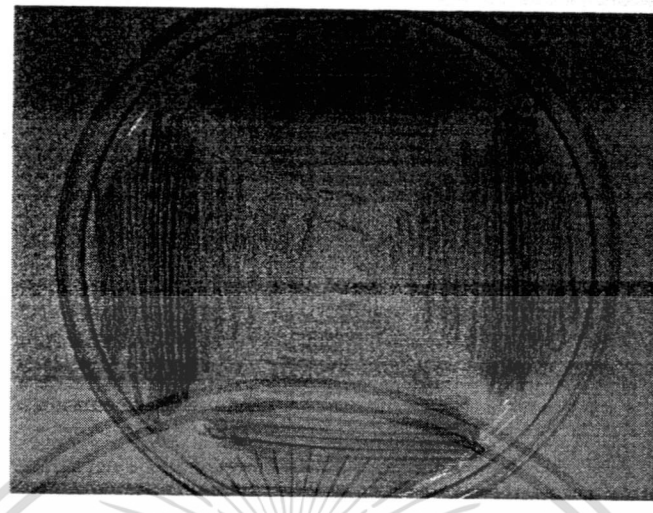
4.1 ผลการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติให้มีความบริสุทธิ์

จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากโครงการแก้มลิงตามแนวพระราชดำริ บึงพังพวย ถนนสุขาภิบาล 1 จังหวัดกรุงเทพมหานคร (รูปที่ 4.1) มาคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียพบว่าบ่อน้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างมีสีเขียวเข้มจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำโดยจุ่มขวด duran ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในบ่อน้ำจนกระทั่งน้ำเต็มขวด นำตัวอย่างน้ำที่มีสาหร่ายมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่ามีไซยาโนแบคทีเรีย 2 ชนิดคือไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมและไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย และพบสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิดคือสาหร่ายสีเขียวที่มีรูปร่างรีและสาหร่ายสีเขียวที่มีรูปร่างกลม จากนั้น ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย 1 เซลล์ไปเพาะเลี้ยงใน Tissue culture plate ที่มีอาหารเหลว BG11จนกระทั่งไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตและมีสีเขียวเข้ม จึงนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate บนอาหารแข็ง BG11 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงที่มีความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้ได้ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่มีความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ดังรูปที่ 4.2



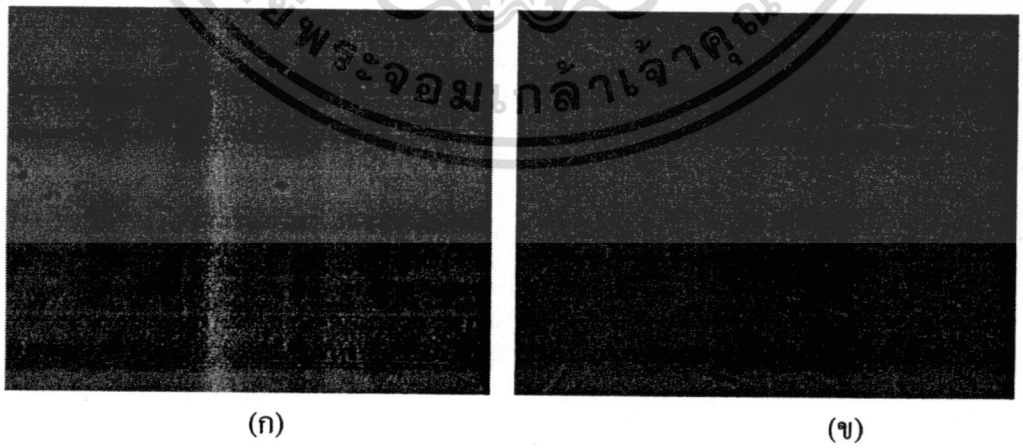
รูปที่ 4.1 บ่อน้ำธรรมชาติที่ใช้ในการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11

หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมเป็นเซลล์เดี่ยว มีสีเขียวแกมน้ำเงินและมีรูปร่างกลม (รูปที่ 4.3ก) และไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสายเป็นเซลล์รูปร่างทรงกระบอกต่อกัน มีสีเขียวแกมน้ำเงินและมีรูปร่างเป็นเส้นสาย (รูปที่ 4.3ข) สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างรีเป็นเซลล์เดี่ยว มีสีเขียวและมีรูปร่างรี (รูปที่ 4.4ก) และสาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลมเป็นเซลล์เดี่ยว มีสีเขียวและมีรูปร่างค่อนข้างกลม (รูปที่ 4.4ข) จากนั้นจึงนำสาหร่ายทั้งหมดมาศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

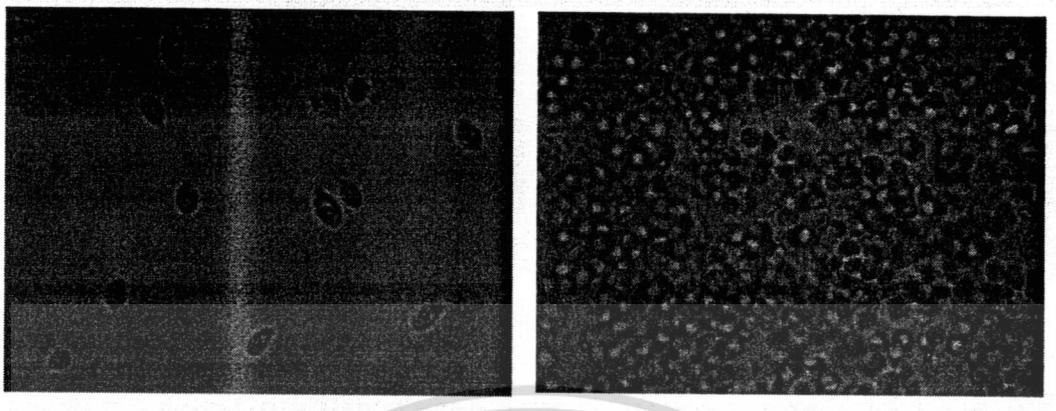


(ก) (ข)

รูปที่ 4.3 ไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

(ก)ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม (ข) ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



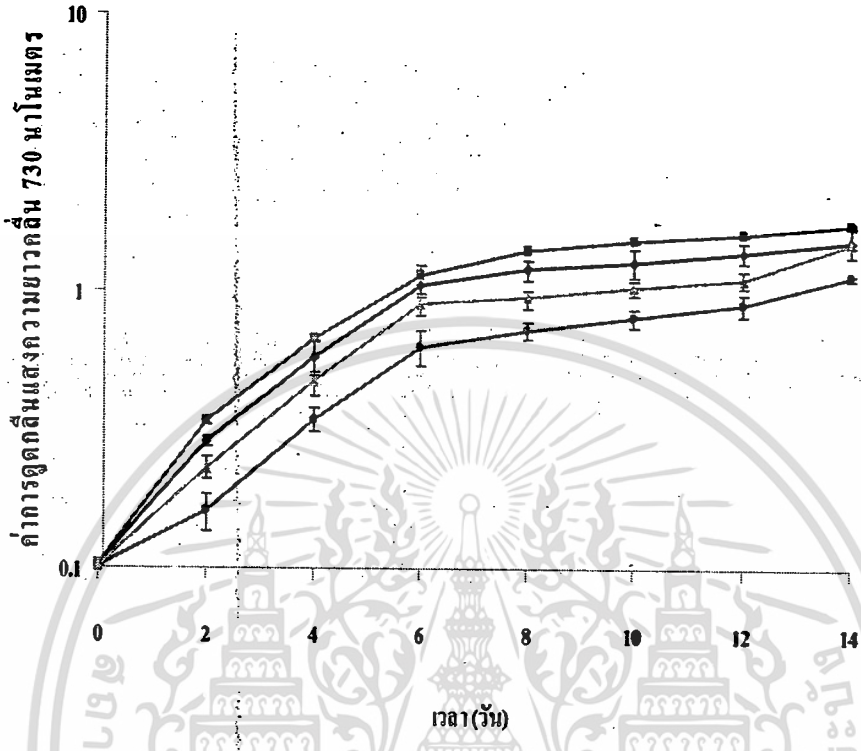
(ก) (ข)

รูปที่ 4.4 สาหร่ายสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า
(ก) สาหร่ายสีเขียวรูปร่างรี (ข) สาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลม

4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีอัตราการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกัน โดยมีระยะการเจริญเติบโตเร็วที่สุด (log phase) เหมือนกันคือในวันที่ 2 ถึงวันที่ 6 แต่สาหร่ายสีเขียวที่มีรูปร่างรีจะมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าเชื้ออื่นๆเล็กน้อย (รูปที่ 4.5)

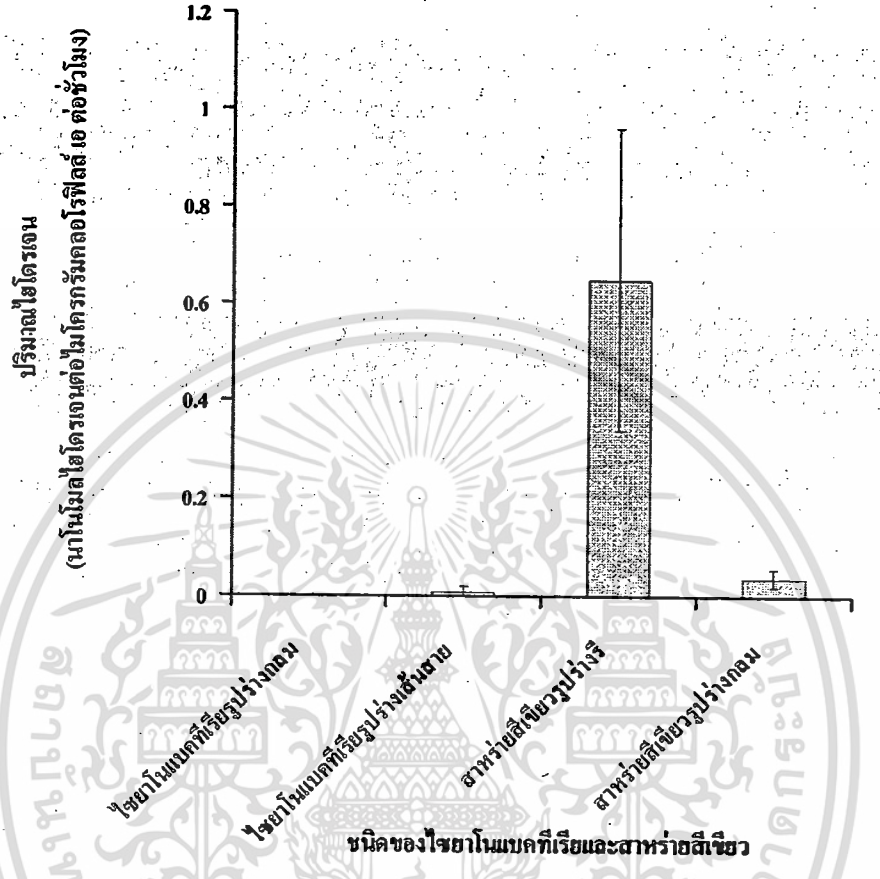
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม (◆) ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย (■) สาหร่ายสีเขียวรูปร่างรี(▲) และสาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลม (✕)

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลาย จากนั้น ทำการกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 10 มิลลิลิตร แล้วปิเปตใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด ปิดฝาขวด ห่อฟอยล์ แล้วใช้เข็มฉีดยาเข็มที่ 1 เจาะทางด้านบนของขวดเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวด ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซ พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที ดว่ำขวด นำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph พบว่าในไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมและไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายเมื่อนำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนชั่วโมงที่ 4 มีปริมาณไฮโดรเจน 0.0005 และ 0.0085 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนในสาหร่ายสีเขียวรูปร่างรีและสาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลมเมื่อนำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนชั่วโมงที่ 4 มีปริมาณไฮโดรเจน 0.6490 และ 0.0370 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

4.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (ว.ว.)

สาหร่ายสีเขียวที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (ว.ว.) มีทั้งหมด 2 ชนิด คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261

เซลล์ของ *Chlorella* sp.มีขนาดเล็กมากประมาณ 2-12 ไมโครเมตร รูปร่างทรงกลม หรือเป็นรูปไข่หรือเป็นรูปถ้วย มีไพรีนอยด์ ผนังเซลล์ค่อนข้างบางAtkinson, et al.(1970) อ้างโดย Bold และ Wynne (1978) ศึกษาผนังเซลล์ของ *Chlorella* sp. พบว่าประกอบด้วยสารพวก sporopollenin มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออโดสปอร์ ซึ่งมีจำนวน 4 ,8 หรือ 16 เซลล์ (พบได้น้อยมาก) *Chlorella* เป็นสาหร่ายที่พบได้ทั่วไป โดยเฉพาะในดิน แม้กระทั่งในขวดน้ำ หรือถังบรรจุน้ำที่ไม่ค่อยได้ล้างก็จะพบเสมอ และมักจะพบอาศัยอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิส (Symbiosis) กับสัตว์ เช่น พารามีเซียม ไฮดรา ฟองน้ำ เป็นต้น เมื่อส่อง *Chlorella vulgaris* ภายใต้กล้องจุลทรรศ์กำลังขยาย 400 เท่า (รูปที่ 4.7)

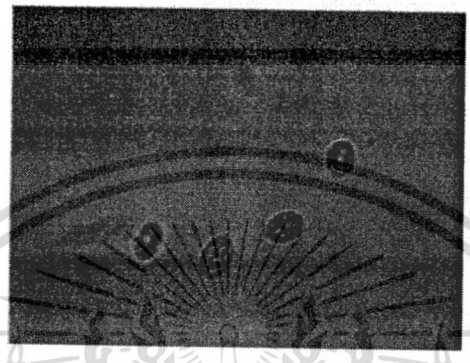
รูปที่ 4.7 *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

2. *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522

Scenedesmus เป็นโคโลนีที่ประกอบด้วยเซลล์จำนวน 4 หรือ 8 หรือ 16 เซลล์ มาเรียงต่อกันด้านข้างตาม ความยาวของเซลล์ แต่ละเซลล์มีลักษณะเป็นรูปไข่ หรือทรงกระบอก หรือพระจันทร์ครึ่งซีก เซลล์ที่อยู่ด้านรินสุดทั้งสองด้านอาจมีหนาม (spine) ยื่นออกมา บางชนิดก็ไม่มี คลอโรพลาสต์ เป็นแผ่นเต็มเซลล์ มีไพรีนอยด์และนิวเคลียสเซลล์ละ 1 อัน สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโดสปอร์ ซึ่งในแต่ละเซลล์จะสร้างออโดสปอร์เท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* ชนิดนั้น เมื่อแก่ก็จะหลุดออกมาจากผนังเซลล์ของแม่จับกันเป็นโคโลนีใหม่ ส่วนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

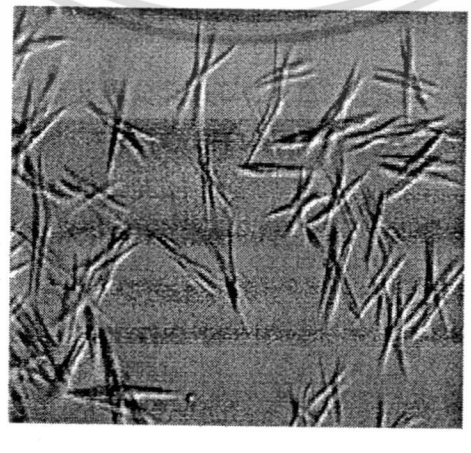
สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแกมมีทที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้นมีการรวมกันแบบไอโซแกมมี **อาจพบในน้ำจืด หรืออาจพบในดินบ้าง** ถ้านำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายมักจะไม่จับกันเป็นโคโลนี แต่มักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

3. *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557

Ankistodesmus **เป็นสาหร่ายที่มีรูปร่างยาวเรียว แหลมหัวแหลมท้าย โค้งเล็กน้อย หรือรูปแบบพระจันทร์เสี้ยวมีชื่อสามัญว่า สาหร่ายคิ้วนาง หรือสาหร่ายพระจันทร์เสี้ยว บางชนิดอาจโค้งงอคล้ายจะเป็นเกลียว บางครั้งอาจพบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ บางครั้งอาจอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเล็กๆ มีนิวเคลียสตรงกลาง มีคลอ-โรพลาสต์อยู่ด้านข้าง ไม่มีไพรีนอยด์ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโคสปอร์ 2-16 เซลล์ ซึ่งจะอยู่ในเซลล์ของแม่และจะหลุดออกมาภายหลัง (รูปที่ 4.9)**



รูปที่ 4.9 *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. *Synechococcus* sp. PCC 7942

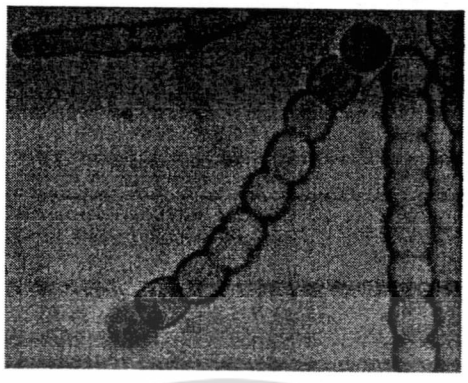
เซลล์มีรูปร่างแบบรูปไข่ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไม่มีชีทหุ้มเมื่อแบ่งเซลล์แล้วเซลล์อาจไม่หลุดแต่จะติดกันเป็นคู่ เซลล์มักมีขนาดใหญ่สีเขียวน้ำเงินสด พบมากในน้ำพุร้อนและสามารถแยกออกมาให้บริสุทธิ์ได้ง่าย (รูปที่ 4.10)

รูปที่ 4.10 *Synechococcus* sp. PCC 7942 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

5. *Calothrix agardh*

Calothrix เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายที่มักอยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่รวมกัน 34 เส้นสาย แต่ส่วนใหญ่จะอยู่เดี่ยวๆ เซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่ เรียวเล็กทางปลายไม่แตกแขนง แต่บางชนิดอาจมีการแตกแขนงไม่แท้จริง ซึ่งแขนงที่แตกใหม่จะเป็นอิสระหลุดจากเส้นสายเดิม มีชีทหุ้ม ชีทจะใสมีสีหรือไม่มีสี ความยาวของชีทมักจะเลยเซลล์ส่วนปลายไตรโคมออกไปเล็กน้อย เฮเทอโรซิสต์จะอยู่ปลายฐาน มีขนาดเล็ก บางชนิดอาจจะอยู่ระหว่างไตรโคม อะคินีทอยู่ติดกับเฮเทอโรซิสต์ สาหร่ายชนิดนี้พบอยู่ในน้ำจืดและน้ำเค็ม มักขึ้นอยู่บนพืชน้ำอื่นๆ หรือขึ้นบนก้อนหินกิ่งไม้ ใบไม้ (รูปที่ 4.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 *Calothrix agardh* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

6. *Synechocystis* sp. PCC 6803

เซลล์มีรูปร่างกลม หรือรีเล็กน้อย อาจจะอยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่เป็นคู่ ไม่มีเมือกหุ้ม ตรงกลางเซลล์จะเห็นเป็นจุดสีเข้มๆ (รูปที่ 4.12)

รูปที่ 4.12 *Synechocystis* sp. PCC 6803 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

7. *Nostoc carneum*

Nostoc มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้าย *Anabaena* มาก แต่เส้นสายจะบิดงอไปมากกว่าและอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก โดยฝังตัวอยู่ในสารเมือกที่มีลักษณะเป็นวุ้นหนา มองดูเป็นก้อน ต้องขยี้เมือกออกก่อน จึงจะเห็นเส้นสายจำนวนมาก เซลล์มีลักษณะกลม หรือค่อนข้างกลม เฮเทอโรซิสต์และอะคินีทจะอยู่ติดกัน หรือใกล้เคียงกัน และอยู่ในเส้นสาย ลักษณะที่แตกต่างจาก *Anabaena* อีกประการหนึ่งคือ ชีทที่หุ้มไตรโคมจะหนามากกว่า *Anabaena* สาหร่ายชนิดนี้มักอยู่ตามพื้นที่ชื้น

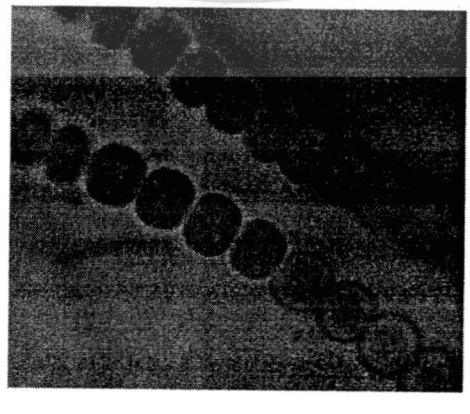
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แฉะหรือตามหน้าผาชื้นๆ นำมารับประทานได้โดยเฉพาะ *Nostoc commune Vauchec.* มีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2 เซนติเมตร บางชนิดมีลักษณะเหมือนเส้นผม ทางใต้เรียกว่าผักผม นำมารับประทานได้เช่นกัน (รูปที่ 4.13)

รูปที่ 4.13 *Nostoc carneum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

8. ***Anabaena siamensis***

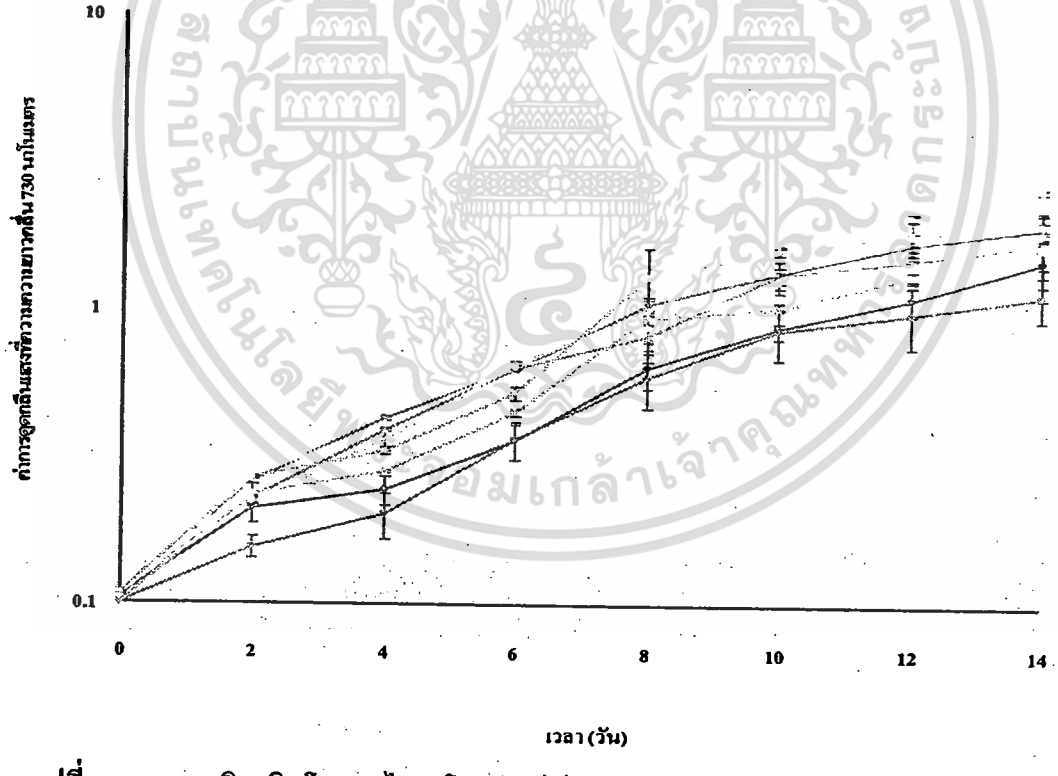
Anabaena siamensis มีลักษณะเป็นเส้นสาย ไตรโคมมักอยู่เดี่ยวๆ ไม่รวมเป็นกลุ่มก้อนเหมือน *Nostoc* ส่วนมากแล้วไตรโคมมักจะมีลักษณะตรง หรือโค้งงอเล็กน้อย ชีทที่หุ้มไม่หนา เซลล์แต่มีลักษณะกลมคล้ายลูกปัด บางชนิดมีลักษณะคล้างถังเบียร์ (barrel shape) คือตรงกลางเซลล์ป่อง บางชนิดเป็นรูปเหลี่ยม สร้างเฮเทอโรซิสต์ และอะคินีทตรงตำแหน่งปลาย หรือภายในเส้นสาย ทั้งเฮเทอโรซิสต์และอะคินีทสามารถงอกเป็นไตรโคมใหม่ได้ สาหร่ายชนิดนี้อาจจะเป็นแพลงตอนพืช หรืออยู่ตามพื้นดิน และอาจจะอยู่ในลักษณะซิมไบโอซิสกับพืชอื่น (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.14 *Anabaena siamensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

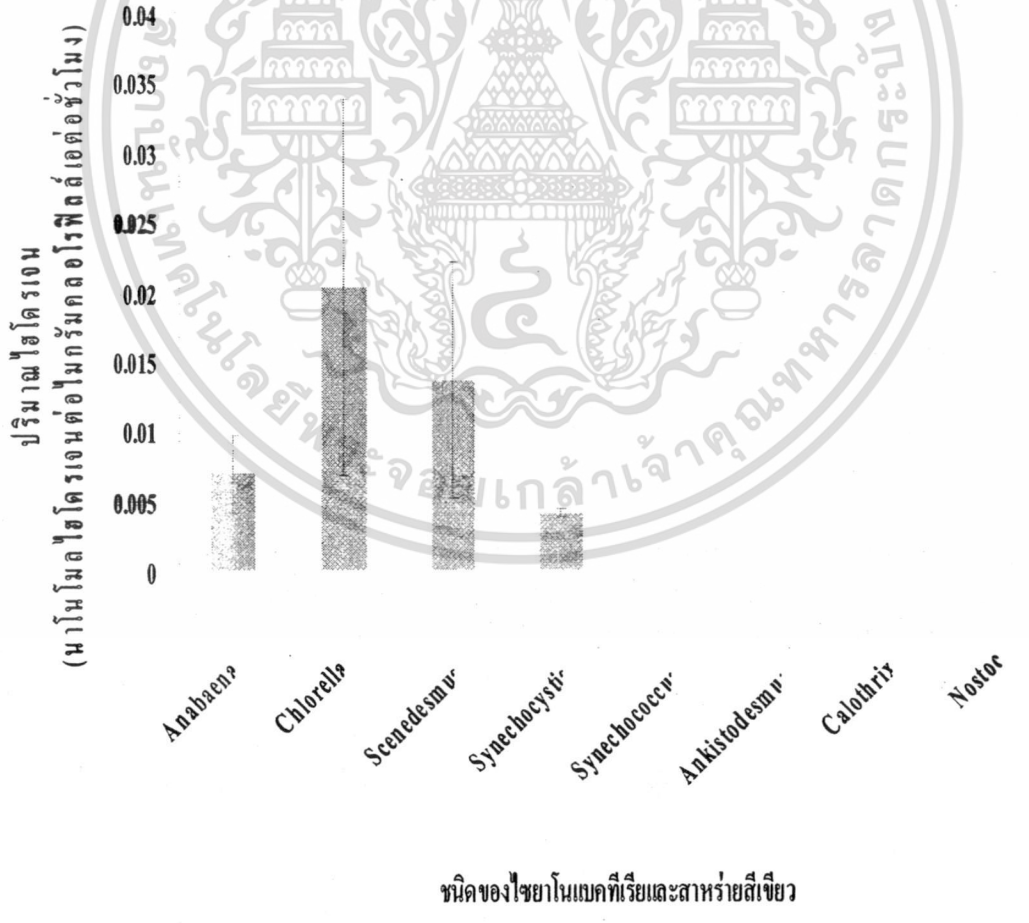
ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวทั้ง 8 ชนิดในอาหาร BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้นวัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรทุก 2 วันเป็นเวลา 14 วันไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 14 *Synechocystis* sp. PCC 6803 มีอัตราการเจริญสูงสุด รองลงมาคือ *Anabaena siamensis* *Synechococcus* sp. PCC 7942 *Nostoc carneum* *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557 *Calothrix agardh* *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 ตามลำดับ โดยมีการเติบโตใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.15) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจนครบ 2 สัปดาห์จึงนำเซลล์นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนโดยเครื่องGas Chromatograph (GC)



รูปที่ 4.15 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในอาหาร BG11 (●) *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 (●) *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 (◎) *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557(●) *Synechococcus* sp. PCC 7942 (◎) *Calothrix agardh* (◎) *Synechocystis* sp. PCC 6803 (◎) *Nostoc carneum* 6803 (◎) *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวัดปริมาณไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวทั้ง 8 ชนิด โดยวัดการผลิตไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น ภายหลังจากการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลาประมาณ 15 นาทีและภายใต้สภาวะที่มืดเพื่อป้องกันการเกิดการสังเคราะห์แสงพบว่า *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด 0.0069 nmol H_2 /µg Chl a / h (ภาคผนวก ค)รองลงมาคือ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 *Anabaena siamensis* *Synechocystis* sp. PCC 6803 โดยผลิตได้ 0.0202 0.0136 0.004 nmol H_2 /µg Chl a / h ตามลำดับ ส่วน *Synechococcus* sp. PCC 7942 *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557 *Calothrix agardh* และ *Nostoc carneum* ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น การทดลองนี้ยังเป็นเพียงการทดลองขั้นต้นยังต้องมีการศึกษาพัฒนาขั้นตอนการปรับสภาวะ เพื่อให้ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น

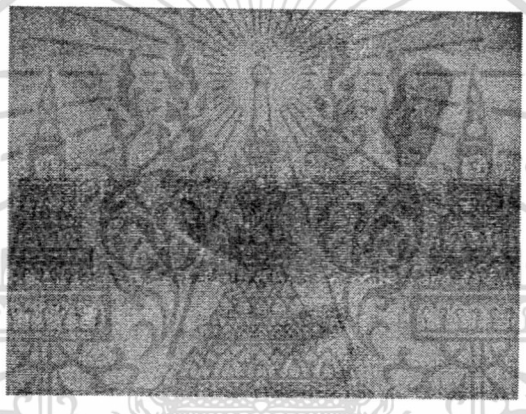


รูปที่ 4.16 ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

Aphanothece sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดียว มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก แบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีเยื่อหุ้มเซลล์หนา (รูปที่ 4.17) ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญ คือ ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถทนเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ถึง 4.0 โมลาร์

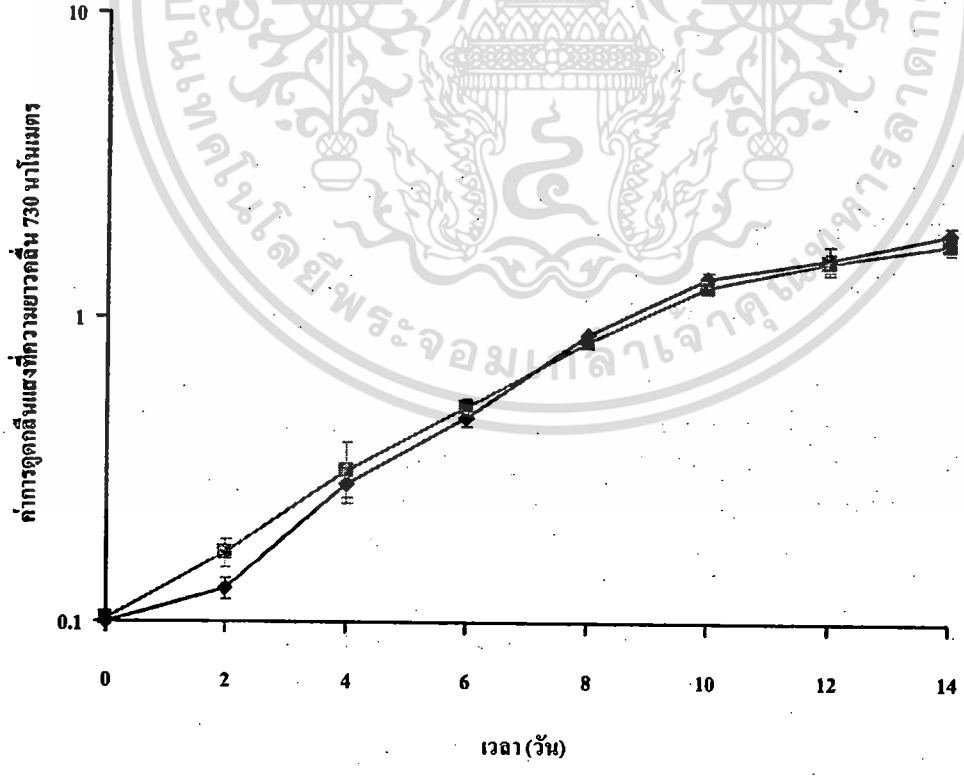


รูปที่ 4.17 *Aphanothece halophytica* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและมีการตรึงไนโตรเจน โดยเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยในขั้นแรกนั้นให้ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้นวัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* มีการเจริญเติบโตช้าในระยะ 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นการเจริญของเซลล์จะค่อยๆสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่วันที่ 2-10 ซึ่งอยู่ในช่วง log phase (รูปที่ 4.18) แสดงว่าอาหาร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution เป็นอาหารที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม เนื่องจากในอาหารมีธาตุอาหารต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

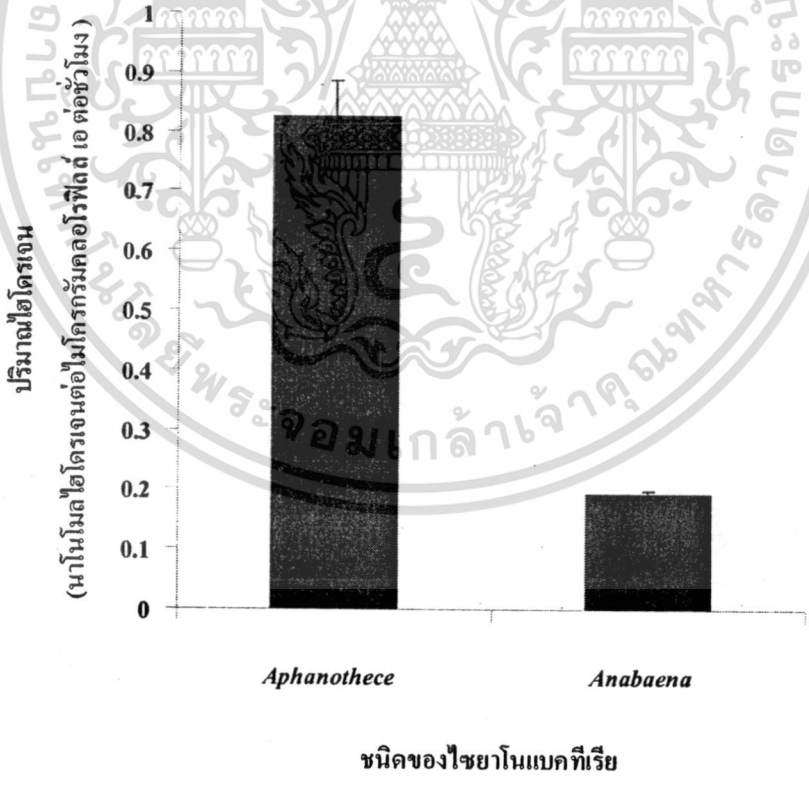
ที่ไซยาโนแบคทีเรียต้องใช้ในการเจริญเติบโตนอกเหนือจากธาตุอาหารหลักที่สิ่งมีชีวิตนำไปใช้ในการเจริญ แต่เมื่อผ่านไปประมาณ 14 วัน เซลล์จะเริ่มมีการเจริญเติบโตคงที่ ซึ่งอยู่ในช่วง stationary phase (รูปที่ 4.18) นั่นอาจจะเป็นเพราะว่าสารอาหารเริ่มหมดจึงทำให้เซลล์มีการเจริญน้อยลง ส่วนไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* มีการเจริญเติบโตในอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งแตกต่างจาก *Aphanothece halophytica* กล่าวคือการเจริญเติบโตจะเป็นไปอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกจนถึงวันวันที่ 10 ซึ่งอยู่ในช่วง log phase (รูปที่ 4.18) แสดงว่า อาหาร BG11 เป็นอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Anabaena siamensis* แต่เมื่อผ่านไปประมาณ 14 วัน เซลล์จะเริ่มมีการเจริญเติบโตคงที่ ซึ่งอยู่ในช่วง stationary phase ซึ่งคล้ายกับ *Aphanothece halophytica* แค่การเพาะเลี้ยง *Aphanothece halophytica* ใช้อาหาร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ซึ่งอาหารสูตรดังกล่าวมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ค่อนข้างสูง ซึ่งเลียนแบบธรรมชาติของน้ำทะเล โดยในอนาคตสามารถปรับปรุงอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* เป็นน้ำทะเลเพื่อเป็นการนำทรัพยากรธรรมชาติที่มีอย่างไม่จำกัดมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปได้



รูปที่ 4.18 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* (◆)ในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution และ *Anabaena siamensis* (■)ในอาหาร BG11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution จนครบ 2 สัปดาห์แล้ว นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนโดยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ซึ่งได้เปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนกับไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* พบว่าการผลิตไฮโดรเจนของ *Aphanothece halophytica* และ *Anabaena siamensis* ภายหลัง 4 ชั่วโมงของการปรับสภาวะให้ปราศจากออกซิเจนในที่มืด ได้ปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 0.824 และ 0.193 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.19) ตามลำดับ ซึ่งจากค่าดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการผลิตการไฮโดรเจนจาก *Aphanothece halophytica* จะให้ค่าสูงกว่า *Anabaena siamensis* ประมาณ 4 เท่า ซึ่งเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแตกต่างกันตรงอาหารที่ใช้เลี้ยงคือ *Aphanothece halophytica* เลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ส่วน *Anabaena siamensis* เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11



รูปที่ 4.19 ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* เปรียบเทียบกับ *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยปกติแล้ว *Anabaena siamensis* เป็นไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่มีการตรึงไนโตรเจน จึงพบปริมาณการผลิตไฮโดรเจน ค่อนข้างสูง เนื่องจากในกระบวนการตรึงไนโตรเจน เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะเร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียและได้ผลิตผลพลอยได้เป็นไฮโดรเจน นอกจากนี้ ไฮโดรเจนยังสามารถถูกผลิตขึ้นจากเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสอีกด้วย จากการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* มีการผลิตไฮโดรเจนมากกว่า *Anabaena siamensis* ประมาณ 4 เท่า อาจเป็นผลเนื่องมาจากความเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อาจส่งผลให้เกิดความเครียดและนำไปสู่การผลิตไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม ยังคงจำเป็นต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน จากไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำธรรมชาติให้มีความบริสุทธิ์และศึกษาปริมาณไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้

จากการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากบ่อน้ำธรรมชาติ โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำมาคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวพบว่าสามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวได้ 4 ชนิด โดยเป็นไซยาโนแบคทีเรีย 2 ชนิด คือไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างกลมเป็นเซลล์เดี่ยว มีสีเขียวแกมน้ำเงิน และไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นเส้นสาย มีสีเขียวแกมน้ำเงินและเป็นสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด คือ สาหร่ายสีเขียวที่มีรูปร่างรี มีสีเขียวและสาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลม มีสีเขียว จากนั้น นำเซลล์ทั้งหมดมาศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด มีการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกัน โดยมีการเจริญเติบโตเร็วที่สุด ในวันที่ 2 ถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงแต่สาหร่ายสีเขียวที่มีรูปร่างรีจะมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าเชื้ออื่นๆ เล็กน้อย และเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph พบว่าในไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมและไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย มีปริมาณไฮโดรเจน 0.0005 และ 0.0085 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนในสาหร่ายสีเขียวรูปร่างรีและสาหร่ายสีเขียวรูปร่างกลม พบว่ามีปริมาณไฮโดรเจน 0.6490 และ 0.0370 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยสาหร่ายสีเขียวรูปร่างรีมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่า *Synechocystis* sp. PCC 6803 มีการเจริญสูงสุด รองลงมาคือ *Anabaena siamensi* *Synechococcus* sp. PCC 7942 *Nostoc carneum* *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557 *Calothrix agardh* *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 ตามลำดับ *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด จากการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด 0.0202 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง รองลงมาคือ *Anabaena siamensis* *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 *Synechocystis* sp. PCC 6803 มีปริมาณไฮโดรเจน 0.0137 0.0135 0.0041 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วน *Synechococcus* sp. PCC 7942 *Ankistodesmus falcatus* TISTR 8557 *Calothrix agardh* และ *Nostoc carneum* ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น

5.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน และวัดการเจริญเติบโตทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร พบว่าเซลล์ของ *Aphanothece halophytica* มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นและเข้าสู่ระยะ log phase ตั้งแต่วันที่ 2 หลังจากวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์จะเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตคงที่ หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อายุครบ 2 สัปดาห์มาวิเคราะห์ผลการผลิตไฮโดรเจนโดยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ซึ่งในการทดลองได้มีการเปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Aphanothece halophytica* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มกับไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่พบได้ในดินนา พบว่า *Aphanothece halophytica* มีการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก๊าซไฮโดรเจนจาก เท่ากับ 0.825 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก *Anabaena siamensis* มีค่าเท่ากับ 0.193 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ซึ่งจากค่าดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก *Aphanothece halophytica* จะให้ค่าสูงกว่า *Anabaena siamensis* ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน แตกต่างกันตรงอาหารที่ใช้เลี้ยงคือ *Aphanothece halophytica* เลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ส่วน *Anabaena siamensis* จะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เพราะฉะนั้นจึงสามารถนำไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* มาปรับประยุกต์ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารหรือสภาวะต่างๆ เช่น ปรับสูตรอาหารเป็นการใช้น้ำทะเลที่เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดโดยเลี้ยงในสภาวะใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด เพื่อที่จะให้มีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงและประหยัดต้นทุนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร. 2547. พลังงานชีวมวลกับศักยภาพในประเทศไทย. **โลกพลังงาน.** 7, 22-29.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. **แพลงก์ตอนพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุวดี พีรพรพิศาล 2546 **สาหร่ายวิทยา** พิมพ์ครั้งที่ 2 เชียงใหม่: ภาวิชาชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Daday, A.and Smith, D. (1979). The hydrogenase-nitrogenase relationship in a symbiotic cyanobacterium isolation from *Macrozamia communis* L. Johnson. **Aust. J. Plant Physiol.** 131 : 231-238.

Fernando, J ., Hundeshagen , B., and Bothe, H. (2002). Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **FEMS Microbiol Lett.** 51 : 19-24.

Gaffron, H. and Rubin, J. (1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. **J Gen Physiol** 26 : 219–240.

Gutthann, F., Egert, M., Marques, A. and Appel, J . (2006). Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogene evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1767 : 161–169.

Happe, T., Schütz, K. and Böhme, H. (2000). Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **J Bacteriol.** 182 : 1624–1631.

Lindblad, P. Christensson, K. Lindberg, P. Pinto, F. and Tsygankov, A. (2002). Photoproduction of H_2 by wildtype *Anabaena* PCC 7120 and a hydrogen uptake deficient mutant: from laboratory experiments to outdoor culture. **International Journal of Hydrogen Energy** 27 : 1271- 1281.

Schulz, R. 1996. Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria. **J. Mar. Biotechnol.** 4 : 16–22.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tamagnini, P., Troshina, O., Oxelfelt, F., Salema, R. and Lindblad, P. (1997). Hydrogenases in *Nostoc* sp. strain PCC 73102, a strain lacking a bidirectional enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 63(5) : 1801-1807.

Tamagnini, P., Costa, J-L., Almeida, L, Oliveira, M-J., Salema, R., and Lindblad, P. (2000). Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. **Curr Microbiol**, 40 : 356-361.

http://www.enaa.or.jp/WE-NET/suiso/suiso1_e.html .

http://www.fao.org/.../w7241e0g.htm#chapter%20hydrogenproduction

http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

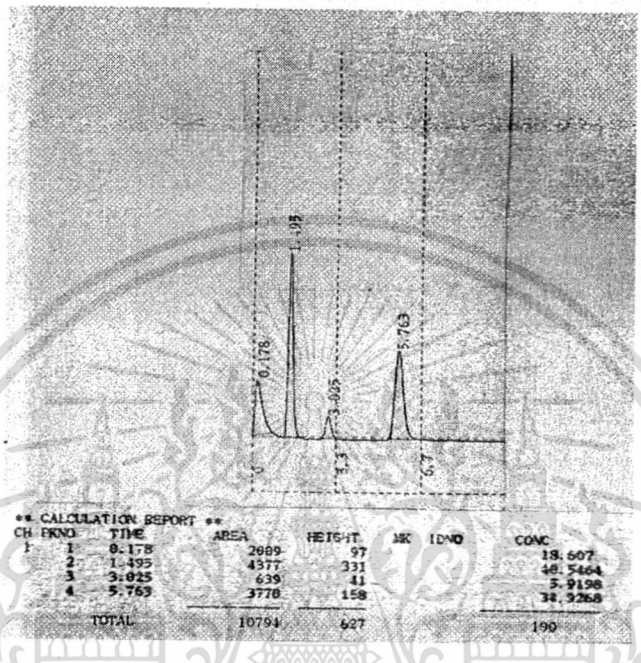
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Turk Island Salt Solution

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
ส่วนประกอบอาหารสต็อค A		
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	89.40	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$)	27.05	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	99.73	มิลลิโมลาร์
ส่วนประกอบอาหารสต็อค B		
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	30.37	มิลลิโมลาร์
ส่วนประกอบอาหารโซเดียมคลอไรด์		
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	43.01	มิลลิโมลาร์

ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับปริมาตรโดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร Turk Island Salt Solution ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

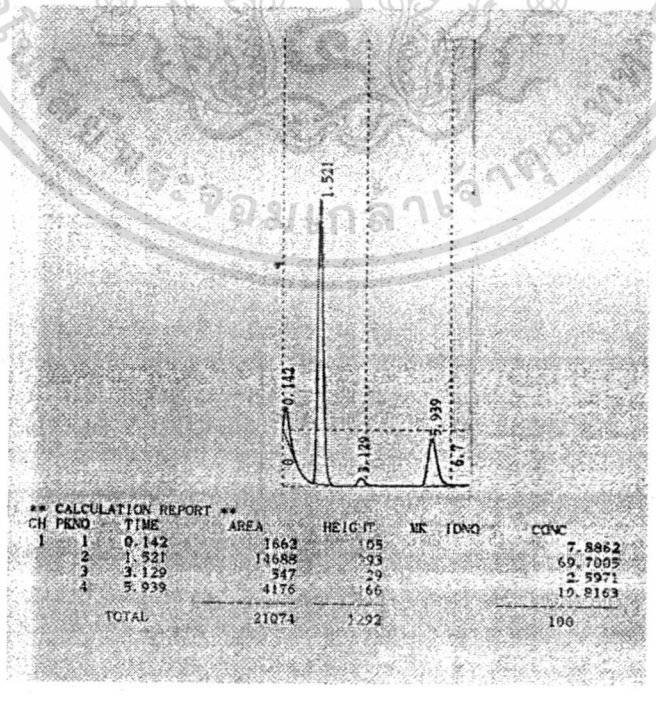
ภาคผนวก ค



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC
1	1	0.178	2009	97			18.607
	2	1.495	4377	331			48.5464
	3	3.025	639	41			5.9198
	4	5.763	3770	158			34.9268
	TOTAL		10794	627			100

รูปที่ 1 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนของ *Anabaena siamensis*



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC
1	1	0.142	1662	105			7.8862
	2	1.521	14688	93			69.7005
	3	3.129	547	29			2.5971
	4	5.939	4176	66			19.8163
	TOTAL		21074	1292			100

รูปที่ 2 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนของ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522

เอกสารนี้ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้