

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่แยกได้จากโรงงานปลาป่น
HYDROGEN PRODUCTION OF A CYANOBACTERIUM *SPIRULINA* SP.
ISOLATED FROM POWDERED FISH FACTORY



T117178



เลขหมู่... 117178
ลงทะเบียน... 117178
วัน, เดือน, ปี... 19 ก.ค. 2554

b. 123A2014
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**HYDROGEN PRODUCTION OF A CYANOBACTERIUM
SPIRULINA SP. ISOLATED FROM POWDERED FISH FACTORY**



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE

REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่แยกได้จาก โรงงานปลาป่น		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐพัชร์	แก้วภู	รหัสประจำตัว 50050814
	นางสาวรุ่งทิพย์	ดิษยาภิรมย์	รหัสประจำตัว 50050858
	นางสาวลักขณา	เสริมเจริญกิจ	รหัสประจำตัว 50050861
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม		
ปีการศึกษา	2553		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สรัญญา	พันธุ์พุกภัย	

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจในปัจจุบัน ไฮโดรเจนมีข้อได้เปรียบพลังงานอื่นๆ เนื่องจากให้พลังงานสูงระหว่างกระบวนการเผาไหม้ และเป็นพลังงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Spirulina* sp. ที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นในประเทศไทย จากผลการทดลองพบว่า *Spirulina* sp. เจริญเติบโตได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นที่เติมโซเดียมไนเตรท 0.15 โมลในโตรเจนต่อลิตร และซูโครส 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทิ้งสูตรที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ชักนำให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในน้ำทิ้งปกติเป็นเวลา 1 วัน นำไปพ่นอาร์กอนและบ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง *Spirulina* sp. ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เท่ากับ 0.42 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

คำสำคัญ: สไปรูลิना , การผลิตก๊าซไฮโดรเจน , น้ำทิ้ง

Title	Hydrogen Production of a Cyanobacterium <i>Spirulina</i> sp. Isolated from Powdered Fish Factory	
Students	Natthaphat	Kaewpoo
	Rungthip	Disapirom
	Lakkana	Sermcharoenkit
Degree	Bachelor of Science	
Major Program	Industrial Microbiology	
Academic Year	2010	
Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch	

ABSTRACT

Hydrogen is an alternative interesting energy nowadays. Its advantages are providing high energy during combustion process and being environmental friendly fuel. The aim of this project is to study the H₂ production of a non-N₂ fixing cyanobacterium *Spirulina* sp. isolated from the powdered fish factory in Thailand. It was found that *Spirulina* sp. showed the highest growth when cultivated in 0.15 molN/L of NaNO₃ and 0.188 mmolC/L of sucrose containing wastewater obtained from the powdered fish factory. When cultivated cells in optimal growth medium for 1 week, induced H₂ production in normal wastewater for 1 day, purged Argon to the cells and incubated in anaerobic condition for 2 hours, *Spirulina* sp. showed the highest H₂ production at 0.42 μmol H₂/mg Chl a /h.

Keywords : *Spirulina* sp. , Hydrogen production , Wastewater

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมาจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย รวมทั้งคณะกรรมการโครงการพิเศษ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ตลอดจนอาจารย์ท่านอื่นๆ ที่ได้ให้ความรู้ข้อเสนอแนะและประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่คอยอำนวยความสะดวกเอื้อเพื่อให้ความรู้และข้อเสนอแนะต่างๆ ในระหว่างการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณพี่มารด พี่อ้อ พี่แนน พี่ปุ๋ย พี่ปาล์ม ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดีในการปฏิบัติงาน รวมทั้งข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในระหว่างการดำเนินงาน โครงการพิเศษนี้จนเสร็จสิ้น ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมดไว้ ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนโครงการพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ณัฐพัชร แก้วภู
รุ่งทิพย์ ดิษยาภิรมย์
ลักขณา เสริมเจริญกิจ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของ โครงการงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของ โครงการงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของ โครงการงานพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ไฮโดรเจน	4
2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน	6
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตไฮโดรเจน	9
2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย	12
2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน	14
2.6 ไซยาโนแบคทีเรีย	16
2.7 สไปรูลินา (<i>Spirulina</i> sp.)	21
2.8 น้ำทิ้ง	31
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	32
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการงานพิเศษ	32
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	32
3.3 ก๊าซที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	32
3.4 สารเคมี	32
3.5 อุปกรณ์	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6 วิธีการทดลอง	
3.6.1 วิธีการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น	33
3.6.2 การแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน	34
3.6.3 การแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอน	34
3.6.4 การแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน	34
3.6.5 การแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจน	34
3.6.6 การแปรผันสูตรของน้ำทิ้งที่ทำการคัดเลือกโดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบ 2 เฟส	35
3.6.7 การแปรผันระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ	35
3.6.8 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์	35
3.6.9 วิธีการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน	36
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	37
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น	37
4.2 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น	38
4.3 ผลของการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการแปรผันสภาวะต่างๆ	
4.3.1 ผลของการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน	39
4.3.2 ผลของการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่แปรผันปริมาณไนโตรเจน	40
4.3.3 ผลของการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน	43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.4 ผลของการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่แปรผันปริมาณคาร์บอน	44
4.3.5 ผลของการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือก	47
4.3.6 ผลการผลิตไฮโดรเจนจากการแปรผันระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ	50
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	52
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	56



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน	19
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห่อค้ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC-TCD	36
4.1 ผลการวิเคราะห์ห่อค้ประกอบของน้ำทิ้ง	38



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงอย่างง่าย	6
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	8
2.3 ตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ <i>Chlorella</i> sp. และ <i>Chlamydomonas</i> sp.	10
2.4 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงแบบไม่มีออกซิเจน	11
2.5 ตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรีย	12
2.6 วิธีการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรีย	14
2.7 การทำงานของเอนไซม์ในโตรจีนีเนสร่วมกับเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส	15
2.8 การทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส	16
2.9 ชนิดของเซลล์ต่างๆ ในไซยาโนแบคทีเรีย	17
2.10 ตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่เป็นเส้นสาย	18
2.11 ตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นเส้นสาย	19
2.12 ไซยาโนแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระ	20
2.13 ไซยาโนแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	20
2.14 ลักษณะของสาหร่ายสไปรูลินา	22
4.1 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบนอาหารแข็ง	37
4.2 ผลการเจริญของ <i>Spirulina</i> sp. จากการแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยมีปริมาณ โมลไนโตรเจนเท่ากับ 0.03 โมลไนโตรเจนต่อลิตร	39
4.3 ผลการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ มีการแปรผันปริมาณของโซเดียมไนเตรท	41
4.4 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ในน้ำทิ้งที่แปรผันปริมาณโซเดียมไนเตรท	42
4.5 ผลการเจริญเติบโตของ <i>Spirulina</i> sp. จากการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณ โมลคาร์บอนเท่ากับ 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร	43

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 ผลการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้ง ที่มีการแปรผันปริมาณของซูโครส	45
4.7 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ในน้ำทิ้งที่แปรผันปริมาณซูโครส	46
4.8 ผลการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้ง สูตรคัดเลือก	47
4.9 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย <i>Spirulina</i> sp. ในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือกและภายใต้การชักนำในน้ำทิ้งปกติ (2 phase)	49
4.10 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัว ในสภาวะไร้อากาศ	50



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ

ปัญหาสิ่งแวดล้อมและวิกฤตการณ์ด้านพลังงานในปัจจุบันได้ส่งผลกระทบต่อประชากรโลก จากการลดลงของปริมาณน้ำมันดิบและราคาน้ำมันที่มีความผันผวนและพุ่งสูงขึ้น ซึ่งคาดว่าราคาน้ำมันจะสูงขึ้นอีกในอนาคตอันใกล้ การใช้ทรัพยากรพลังงานโดยรวมของประเทศไทยนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นการใช้ น้ำมันดิบและก๊าซธรรมชาติอยู่ที่ประมาณร้อยละ 80 ซึ่งยังต้องพึ่งพาการนำเข้า น้ำมันดิบจากต่างประเทศเป็นหลัก ดังนั้น หากไม่มีการจัดหาพลังงานรูปแบบอื่นมาทดแทนให้เหมาะสมกับความต้องการใช้พลังงาน ก็จะก่อให้เกิดปัญหาการขาดแคลนพลังงานได้ ด้วยเหตุนี้ จึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อเสาะแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เพื่อลดอัตราการนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงและเป็นพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรสและไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เมื่อทำการเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในบรรยากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ ปัจจุบันมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงและเสี่ยงต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen)

สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว ไชยาโนแบคทีเรีย และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง ไชยาโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ใน Division Cyanophyta จัดเป็นโพรคาริโอต สามารถสังเคราะห์แสงได้เนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายกับคลอโรพลาสต์ กระบวนการสังเคราะห์แสงของไชยาโนแบคทีเรียนั้นประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเริ่มจากระบบแสงที่สองรับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เพื่อกระตุ้นให้มีการแตกตัวของน้ำกลายเป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูกส่งผ่านไปยังไซโทโครม และส่งต่อไปยังระบบแสงที่หนึ่ง ระบบแสงที่หนึ่งรับพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังเฟอร์รีดอกซิน กระบวนการรีดิวซ์ NADP^+ ให้กลายเป็น NADPH และ H^+ อีกทั้งโปรตอนที่สะสมไว้ในเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ส่งถ่ายออกไปนอกเซลล์จากการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase และได้ ATP เป็นผลิตภัณฑ์ พลังงานที่ได้จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อผลิตสารประกอบอินทรีย์ ในสภาวะที่ไม่มีแสงและออกซิเจน เซลล์จะกระตุ้นให้สังเคราะห์เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส เพื่อออกซิไดซ์โปรตอนและอิเล็กตรอนที่มีมากมายในเซลล์ไปเป็นไฮโดรเจนและขับออกมานอกเซลล์ นอกจากการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงแล้ว ไชยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้อีกด้วย

สาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina* sp.) เป็นไชยาโนแบคทีเรียที่มีขนาดเล็กมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า จัดอยู่ใน Family Oscillatoriaceae ไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จะมีลักษณะเป็นเส้นสาย ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เรียงกัน ไม่แตกแขนง เรียกเส้นสายนี้ว่า ทริคโอม สาหร่ายสไปรูลินาสามารถพบได้ในน้ำที่ค่อนข้างเสียและน้ำที่มีความเป็นกรดต่ำสูง โดยเฉพาะในบ่อน้ำบาดน้ำเสีย เช่น จะพบในบ่อน้ำบาดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรมต่างๆ โดยทั่วไปแล้วจะพบไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้เจริญอยู่ได้ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม แต่ส่วนใหญ่จะพบในน้ำจืด สาหร่ายสไปรูลินานั้นมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนของ *Spirulina* sp. นั้นจะไม่สามารถผลิตผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้ เนื่องจากภายในเซลล์ไม่มียีนไนโตรจีเนส (*nif* gene) ที่ผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนสซึ่งทำหน้าที่รีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียและได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ แต่จะเกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเพียงเท่านั้น เนื่องจากในเซลล์มียีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (*hox* gene) ที่สามารถผลิตเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส ซึ่งช่วยในการออกซิไดซ์โปรตอนและอิเล็กตรอนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน

น้ำทิ้ง คือ น้ำเสียที่เกิดจากการประกอบกิจการ โรงงานอุตสาหกรรมหรือนิคมอุตสาหกรรมที่จะระบายลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือออกสู่สิ่งแวดล้อมและให้หมายความรวมถึงน้ำเสียจากการใช้น้ำของคนงาน รวมทั้งจากกิจกรรมอื่นในโรงงานอุตสาหกรรมหรือนิคมอุตสาหกรรมด้วย โดยน้ำทิ้งต้องเป็นไปตามมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งที่กำหนดไว้ ในน้ำทิ้งนั้นจะมีองค์ประกอบต่างๆ มากมาย เช่น สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ธาตุอาหาร โลหะต่างๆ เป็นต้น ซึ่งองค์ประกอบของน้ำทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหล่านี้ นับว่าเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อการเจริญของสาหร่ายสไปรูลินาที่ได้นำมาทำการทดลองในครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1.2.1 คัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นให้บริสุทธิ์
- 1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

คัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นนำมาทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้น เพาะเลี้ยง *Spirulina* sp. ในน้ำทิ้งจากโรงงานปลาป่นที่มีการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตไฮโดรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นให้บริสุทธิ์
- 1.4.2 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

ปัจจุบันการดำรงชีวิตของมนุษย์ จำเป็นต้องพึ่งพาพลังงานในการผลิตสินค้าสำหรับอุปโภค และบริโภค การคมนาคมขนส่ง การประกอบธุรกิจ ฯลฯ พลังงานที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพลังงานที่ได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) อันได้แก่ น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน เป็นต้น ซึ่งเชื้อเพลิงเหล่านี้ นอกจากจะมีอย่างจำกัดแล้ว การเปลี่ยนรูปเชื้อเพลิงเหล่านี้ไปเป็นพลังงาน ยังก่อให้เกิดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก ด้วยเหตุนี้ จึงจำเป็นต้องมีการแสวงหาเชื้อเพลิงใหม่เพื่อทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลที่กำลังจะหมดไป โดยพลังงานทดแทนนี้จะต้องไม่ก่อให้เกิดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงชนิดหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการพลังงานในอนาคตของมนุษย์ได้ แต่การผลิตและการใช้ประโยชน์จากไฮโดรเจนยังจำเป็นต้องมีการวิจัยและพัฒนาในด้านต่างๆ ก่อนที่จะสามารถนำมาใช้ในชีวิตประจำวันได้

ไฮโดรเจนถูกรับรองว่ามีอยู่จริงครั้งแรกโดย เฮนรี คาวอนดิช (Henry Cavendish) ในปี ค.ศ. 1766 คาวอนดิช ค้นพบระหว่างทำการทดลองกรดกับปรอท เขาสันนิษฐานคิดว่าไฮโดรเจนนั้นเป็นสารประกอบของปรอท แต่เขาก็ยังสามารถบรรยายคุณสมบัติต่างๆ ของไฮโดรเจนได้อย่างถูกต้อง ต่อมา อองตวน ลาวัวซิเย (Étienne Lavoisier) ได้ตั้งชื่อให้กับธาตุนี้ว่าไฮโดรเจน และพิสูจน์ว่าไฮโดรเจนและออกซิเจน เป็นส่วนประกอบของน้ำ ไฮโดรเจนถูกนำไปใช้ประโยชน์ครั้งแรกในการบรรจุในบอลลูน ไฮโดรเจนสามารถเตรียมได้จากการผสมกรดซัลฟิวริกกับเหล็ก ดิวเทอเรียมซึ่งเป็นไอโซโทปของไฮโดรเจน ถูกค้นพบโดยแฮโรลด์ ซี.ยูเรย์ (Harold C. Urey) โดยการกลั่นน้ำหลายๆ ครั้ง ทำให้ยูเรย์ได้รับรางวัลโนเบลจากการค้นพบนี้ในปี ค.ศ. 1934 ในปีเดียวกันนั้น มีการค้นพบตรีเทียม ไอโซโทปชนิดที่สามของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำที่เป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดของสิ่งมีชีวิตบนโลก ไฮโดรเจนที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลเท่ากับ 104 กิโลคาลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้โมเลกุลไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิ หรือใช้สารเร่งปฏิกิริยา เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

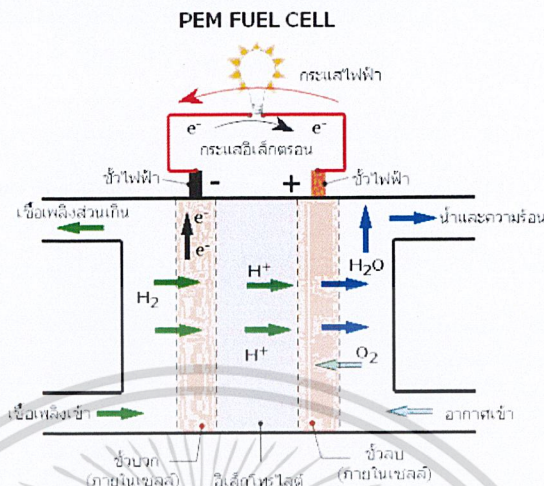
เป็นต้น ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยนิวเคลียสอยู่กลาง ภายในนิวเคลียสประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และมีอิเล็กตรอนวิ่งรอบนอกเหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทป ขึ้นกับจำนวนโปรตอนและจำนวนนิวตรอนที่ต่างกัน ดังนี้

1. ไฮโดรเจน (hydrogen) มีจำนวนโปรตอน 1 ตัว จำนวนนิวตรอน 1 ตัว มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 1.0078
2. ดิวเทอเรียม (deuterium) มีจำนวนโปรตอน 2 ตัว จำนวนนิวตรอน 1 ตัว มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 2.0141
3. ทริเทียม (tritium) มีจำนวนโปรตอน 3 ตัว จำนวนนิวตรอน 1 ตัว มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 3.0161

พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนแตกต่างจากพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือ ไม่ได้เป็นแหล่งปฏิกิริยา กล่าวคือก๊าซไฮโดรเจนต้องนำไปผ่านกระบวนการที่ก่อให้เกิดการผลิตพลังงานขึ้นมา เซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจนเป็นกลไกที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสันดาปพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน และไม่ก่อให้เกิดมลพิษ เซลล์เชื้อเพลิงถูกคิดค้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1891 โดย วิลเลียม กรูฟ (William Grove) ผู้พิพากษาชาวเวลส์ที่มีความสนใจด้านวิทยาศาสตร์อย่างจริงจัง โดยเริ่มทำการทดลองจากการให้กระแสไฟฟ้าอย่างเฉียบพลันแก่น้ำ ก่อให้เกิดการแตกตัวของน้ำเป็นก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจน และเมื่อทำการรวมก๊าซออกซิเจนและไฮโดรเจนจะก่อให้เกิดกระแสไฟฟ้าอย่างเฉียบพลันกลับมาเช่นกัน นอกจากนี้ ยังมีนักวิทยาศาสตร์ท่านอื่นๆ ที่ให้ความสนใจศึกษาวิจัยเซลล์เชื้อเพลิงตลอดช่วงศตวรรษที่ 19 ในระหว่างปี ค.ศ. 1930-1950 ฟรานซิส โทมัส เบคอน (Francis Thomas Bacon) นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษได้ทำการพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงอัลคาไลน์ ที่ถูกนำมาประยุกต์เป็นแบตเตอรี่ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ต่อมา แพรท (Pratt) และ วิทนี (Whitney) ได้จดสิทธิบัตรเทคโนโลยีเซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจนเพื่อนำไปใช้ในยานอวกาศ Apollo

เซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจนทำงานโดย เต็มเซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจนที่ขั้วบวก (anode) ของเซลล์เชื้อเพลิง ส่วนก๊าซออกซิเจนหรืออากาศจะเข้าสู่เซลล์เชื้อเพลิงที่ขั้วลบ (cathode) การเกิดพลังงานจะเกิดจากไฮโดรเจนโมเลกุลแตกตัวเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน โดยโปรตอนและอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบด้วยทิศทางที่แตกต่างกัน โปรตอนจะเคลื่อนที่ผ่านสารนำไฟฟ้า (electrolyte) ส่วนอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณขั้วไฟฟ้าเพื่อข้ามไปยังขั้วลบ ก่อให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้า เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไปรวมตัวกันกับโปรตอนและออกซิเจนทันที กลายเป็นน้ำและความร้อน ดังนั้นการทำงานของ เซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจนจึงให้ทั้งพลังงานความร้อนและพลังงานไฟฟ้า (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 การทำงานของเซลล์เชื้อเพลิงอย่างง่าย

ที่มา : <http://enghome.eng.psu.ac.th/mne/knowledge/student/Fuel%20cell49/Type.html>

จากความจำเป็นที่ต้องแสวงหาเชื้อเพลิงใหม่มาแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลที่กำลังจะหมดไป ไฮโดรเจนจึงเป็นเชื้อเพลิงเหมาะสมที่นำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนพลังงานแบบเดิมที่มีการใช้อยู่จากการที่ประเทศอุตสาหกรรมได้ลงทุนกับเทคโนโลยีต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกัไฮโดรเจน ทั้งการนำส่ง การจัดเก็บ การเปลี่ยนรูป การใช้งาน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การผลิตที่สามารถนำเอาพลังงานที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ให้เกิดประสิทธิภาพ ในอนาคตไฮโดรเจนน่าจะเป็นเชื้อเพลิงที่จะได้ใช้งานในชีวิตประจำวัน ทั้งนี้ทุกระบวนการในการนำเอาพลังงานไฮโดรเจนมาใช้ ต้องมีการผลักดันให้เกิดการพัฒนาไปพร้อมๆ กัน

2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิล เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยกระบวนการสตีมีฟอร์มมิงของน้ำ (steam reforming) ซึ่งแบ่งออกได้เป็นอีกหลายกระบวนการย่อย ขึ้นอยู่กับสารที่ใช้ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.1 กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (steam reforming)

เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูง แต่เสียค่าใช้จ่ายน้อย จึงถูกนำมาใช้ในทางการค้าแล้ว หลักการของกระบวนการนี้คือ การป้อนไอน้ำ (steam) เข้าสู่ระบบเพื่อทำปฏิกิริยากับสารไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในสถานะก๊าซ เช่น ก๊าซธรรมชาติ ก๊าซชีวภาพ และเอทานอล เป็นต้น โดยไฮโดรเจนจะถูกดึงออกจากไอน้ำ (H_2O) สารไฮโดรคาร์บอน (CH) ส่วนออกซิเจนที่เหลือจากน้ำและคาร์บอนที่เหลือจากไฮโดรคาร์บอนจะรวมตัวกันเป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ข้อเสียของกระบวนการดังกล่าว คือ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากมีสารพิษตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ คาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ เป็นต้น

2.2.1.2 กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide reforming)

เป็นกระบวนการที่คล้ายคลึงกับกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ แต่จะต่างกันตรงที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นวัตถุดิบ ข้อดีของกระบวนการนี้คือ ช่วยลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจกในบรรยากาศ อีกทั้งยังควบคุมระบบการทำงานได้ง่ายกว่ากระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ แต่มีข้อเสียคือ สัดส่วนของไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการนี้จะต่ำกว่ากระบวนการแรกและตัวเร่งปฏิกิริยาจะเสื่อมสภาพเร็วกว่าเนื่องจากจะมีคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ไปเกาะอยู่ที่บริเวณผิวของตัวเร่งปฏิกิริยา

2.2.1.3 กระบวนการออกซิเดชันบางส่วน (partial oxidation)

เป็นกระบวนการระหว่างสารไฮโดรคาร์บอนกับออกซิเจน กระบวนการนี้มีข้อได้เปรียบกว่าสองกระบวนการแรก ตรงที่ไม่จำเป็นต้องป้อนพลังงานจากภายนอก เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบคายความร้อน ทำให้เกิดพลังงานขึ้นภายในระบบ แต่ข้อจำกัดของกระบวนการนี้คือ ปริมาณออกซิเจนที่ป้อนเข้าสู่ระบบต้องไม่สูงจนเกินไป เนื่องจากออกซิเจนที่เหลือจากกระบวนการจะกลับมาทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนที่ผลิตได้กลายเป็นน้ำทำให้สูญเสียผลผลิตไฮโดรเจน

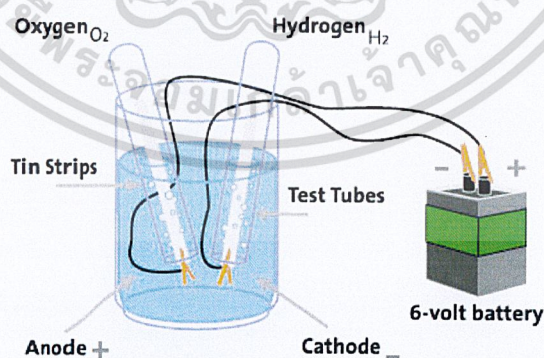
นอกจากนั้น ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการของการใช้กระบวนการนี้ในเชิงพาณิชย์คือ ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการจะสูงกว่ากระบวนการรีฟอร์มมิงปกติ เนื่องจากต้องมีระบบแยกออกซิเจนจากอากาศก่อนป้อนเข้าสู่ระบบ เพราะหากไม่แยกออกซิเจนออกจะทำให้ปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนที่ผลิตได้ลดลง เนื่องจากอากาศมีปริมาณไนโตรเจนสูง

2.2.1.4 กระบวนการร่วมระหว่างกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำกับออกซิเดชันบางส่วน หรือ ออโตเทอร์มัลรีฟอร์มมิง (autothermal reforming)

เป็นกระบวนการใหม่ที่มีการนำข้อดีของกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำและกระบวนการออกซิเดชันบางส่วนมารวมกัน โดยการป้อนทั้งน้ำและออกซิเจนเพื่อทำปฏิกิริยากับสารไฮโดรคาร์บอน ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราส่วนที่มากกว่ากระบวนการออกซิเดชันบางส่วน และใช้พลังงานน้อยกว่ากระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ ในปัจจุบัน กระบวนการดังกล่าวกำลังเป็นที่นิยมและเริ่มมีการใช้งานจริงในเชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลาย

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า เป็นวิธีการที่ใช้แยกโมเลกุลของน้ำโดยใช้กระแสไฟฟ้า (water electrolysis) โดยตรง ทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอม ทั้งนี้อาศัยขั้วอิเล็กโทรด (electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวกและอิเล็กโทรดขั้วลบ วิธีการคือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้ความเป็นตัวนำมากขึ้น โดยการเติมสารพวกอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไป ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบ ส่วนออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะที่ขั้วบวก (รูปที่ 2.2) วิธีการนี้ต้องใช้กระแสไฟฟ้ามากถึง 90 กิโลวัตต์ และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต โดยจะได้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

ที่มา : www.gearmag.info/topic_detail.ph...lue%3D21

ข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำและกระบวนการนี้ต้องทำในสภาวะอุณหภูมิสูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยก โมเลกุลของน้ำให้เป็นออกซิเจนอะตอมและไฮโดรเจนอะตอม

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (thermochemistry)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (thermochemistry) เป็นกระบวนการที่มีการพัฒนาการผลิตโดยใช้สารประกอบปรอทโบรมไนด์และแคลเซียมในการผลิต ซึ่งสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส

ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ สามารถใช้ความร้อนในช่วงที่ถึงปฏิกรณ์นิวเคลียร์ที่ใช้ผลิตได้พลังงานทั้งหมดถูกนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่มีข้อเสีย คือ ปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบ โลหะหนักอันได้แก่ ปรอท และโบรมไนด์ ฯลฯ

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต

นอกจากวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีกระบวนการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ไฮโดรเจนที่ผลิตได้ถูกเรียกว่าไบโอไฮโดรเจน จุลินทรีย์หลายชนิดมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งทำหน้าที่ออกซิไดซ์โมเลกุลของไฮโดรเจนเป็นอะตอมของโปรตอนและอิเล็กตรอน หรือรีดิวซ์โปรตอนและปลดปล่อยไฮโดรเจน จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสารอินทรีย์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนซึ่งจะถูกปลดปล่อยสู่บรรยากาศ มีการคาดการณ์กันว่ามีก๊าซไฮโดรเจนหมุนเวียนในระบบนิเวศประมาณปีละ 200 ล้านตัน

ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้เป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) และไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตไฮโดรเจน

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน มีทั้งพวกโปรคาริโอต (prokaryote) และยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

2.3.1 สาหร่ายสีเขียว

เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มโฟโตโทรฟิคยูคาริโอต (phototrophic eukaryote) ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ตัวอย่างเช่น *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Codium* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น (รูปที่ 2.3) กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งคล้ายกับไซยาโนแบคทีเรีย ภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการกระตุ้นให้มีการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่ได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) โดยออกซิเจนจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ สภาวะที่ใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนคือภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจนซึ่งระยะเวลาในการปรับตัวนั้นแตกต่างกันไป ในระหว่างที่มีการปรับตัวจะมีกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรจีเนส อิเล็กตรอนที่ได้มาจากการแตกตัวของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จะถูกส่งผ่านเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) เพื่อไปใช้ในการรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนโมเลกุลผ่านการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส



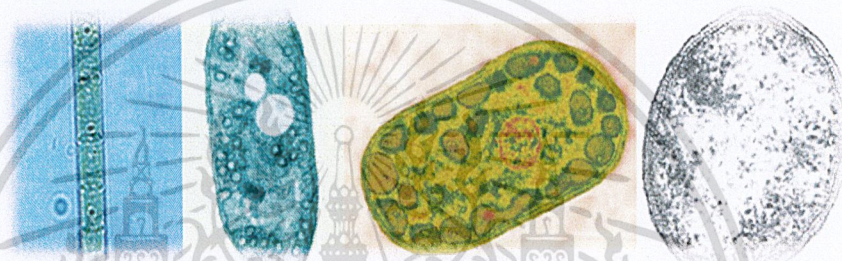
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlorella* sp. (ก) และ *Chlamydomonas* sp. (ข)

ที่มา : <http://thaigoodview.com/library/contest1551/science04/17/2/ThaiGoodView/cyanophyta.html>

2.3.2 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงแบบไม่มีออกซิเจน

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง พบกระจายทั่วไปในธรรมชาติ ตามแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม ทะเลสาบน้ำเค็ม น้ำทะเลสาบที่มีความเป็นด่าง น้ำที่มีความเป็นกรด น้ำพุร้อน น้ำทะเลบริเวณขั้วโลกเหนือ นอกจากนี้ยังพบตามแหล่งน้ำเสีย บ่อบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น แบคทีเรียพวกนี้จัดเป็น anoxygenic phototrophic bacteria ประกอบด้วย 3 กลุ่มคือ (1) แบคทีเรียสีม่วงที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ (Non-sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. (2) แบคทีเรียสีม่วงที่ใช้ซัลเฟอร์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. (3) แบคทีเรียสีเขียวที่ใช้ซัลเฟอร์ (green sulfur bacteria) ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. (รูปที่ 2.4) จุลินทรีย์เหล่านี้ใช้สารประกอบอนินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงมีรงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว และพืช คือ มีรงควัตถุเป็นแบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และคาโรทีนอยด์ (carotenoid) กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ใช้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้อาหารประกอบซัลไฟด์ (sulfide) ซัลเฟอร์ (sulfur) ไทโอซัลเฟต (thiosulfate) สารประกอบอินทรีย์ (organic compound) หรือไฮโดรเจนโมเลกุลเป็นสารให้อิเล็กตรอน

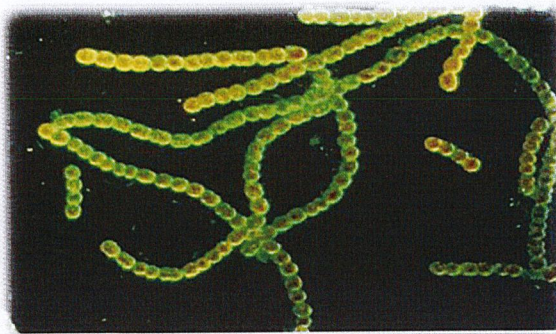


รูปที่ 2.4 ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงแบบไม่มีออกซิเจน

ที่มา : <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/oec/motmc.htm>

2.3.3 ไซยาโนแบคทีเรีย

เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม phototropic prokaryote ที่มีกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน โดยมีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) เป็นรงควัตถุเหมือนในสาหร่ายสีเขียวและพืช (รูปที่ 2.5) โดยทั่วไปแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้เหมือนกับในสาหร่ายสีเขียว อีกทั้งยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านกระบวนการหมักพอลิแซคคาไรด์ที่สะสมได้จากกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้สภาวะไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจน ได้ผลพลอยได้เป็นตัวรีดิวซ์ภายในเซลล์ (reducing power) ซึ่งจะถูกรีดด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (diazotrophic cyanobacteria) ยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน



รูปที่ 2.5 ตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : <http://thaigoodview.com/library/contest1551/science04/17/2/ThaiGoodView/cyanophyta.html>

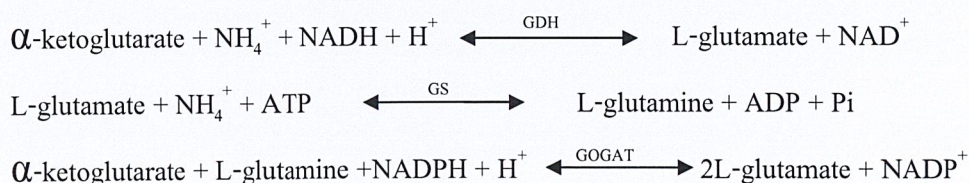
2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 2 กระบวนการ คือ กระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย ดังนี้

2.4.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน

ก๊าซไนโตรเจนในอากาศมีค่าความดันเป็น 0 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการดูดซึมเข้าเซลล์ จึงจำเป็นต้องถูกรีดิวซ์เป็นแอมโมเนียก่อน และถูกนำไปรวมเป็นสารประกอบไนโตรเจนภายในเซลล์ กระบวนการนี้ถูกเรียกว่า กระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) โดยเริ่มจากรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียด้วยการกระตุ้นจากเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยอาศัยพลังงานจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง พร้อมทั้งมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้

แอมโมเนียที่ได้มาจากการตรึงก๊าซไนโตรเจนจะถูกนำไปใช้ในการผลิตกลูตามेट ด้วยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กลูตามีนดีไฮโดรจีเนส (glutamine dehydrogenase, GDH) และยังนำไปใช้ในการผลิตกลูตามีน ด้วยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กลูตามีนซินเทส (glutamine synthase, GS) หรือกลูตามีนซินเทส (glutamate synthase, GOGAT) ดังสมการต่อไปนี้



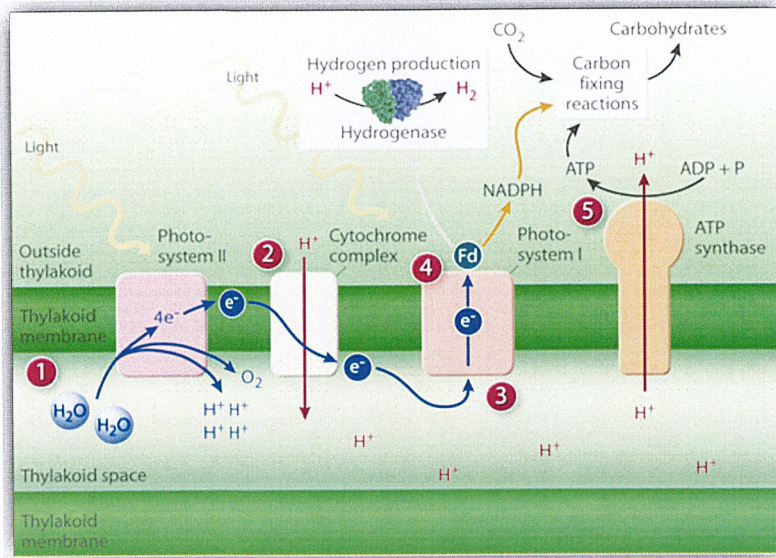
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาวะที่มีออกซิเจน เอนไซม์ในโตรจีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานจากออกซิเจน ดังนั้น เอนไซม์ในโตรจีเนสจึงทำงานเฉพาะในสภาวะที่ไม่มีอากาศและไม่มีแสงเท่านั้น เนื่องด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมีออกซิเจนเป็นผลพลอยได้ ไชยาโนแบคทีเรียจึงได้พัฒนากลไกที่ป้องกันการทำงานของเอนไซม์จากการยับยั้งของออกซิเจน 2 แบบคือ สร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ขึ้นมาแยกออกจากเซลล์ปกติ โดยภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์จะไม่มีระบบแสงที่สอง และมีเอนไซม์ในโตรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาตรึงไนโตรเจนภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์และสังเคราะห์ประกอบไนโตรเจนไปสู่เซลล์ข้างเคียง และในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์ในโตรจีเนสจะอยู่ในเซลล์ปกติ (vegetative cell)

2.4.2 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

เป็นที่ทราบกันดีว่า กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญที่สุดในโลก โดยเป็นกระบวนการสำคัญที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในน้ำเป็นแหล่งโปรตอนและอิเล็กตรอน ซึ่งพลังงานที่ได้จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารประกอบอินทรีย์

กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน (รูปที่ 2.6) ประกอบไปด้วยระบบแสง 2 ระบบ ในกรณีสิ่งมีชีวิตที่ไม่ต้องการออกซิเจน จะมีเฉพาะระบบแสงที่หนึ่งเท่านั้น ในไซยาโนแบคทีเรียกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเริ่มจากระบบแสงที่สองรับพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เพื่อกระตุ้นให้มีการแตกตัวของน้ำเป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งผ่านไปยังไซโตโครม (cytochrome complex) และส่งต่อไปยังระบบแสงที่หนึ่ง ระบบแสงที่หนึ่งรับพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังเฟอร์รีดอกซินกระตุ้นให้เกิดการรีดิวซ์ NADP^+ ให้กลายเป็น NADPH และ H^+ อีกทั้งโปรตอนที่สะสมไว้ในเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ส่งถ่ายออกไปภายนอกเซลล์จากการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase และได้ ATP เป็นผลิตภัณฑ์ พลังงานที่ได้จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ผ่านวิถี Calvin-Benson เพื่อผลิตสารประกอบอินทรีย์ ในสภาวะที่ไม่มีแสงและออกซิเจน เซลล์จะกระตุ้นให้สังเคราะห์เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส เพื่อออกซิไดซ์โปรตอนและอิเล็กตรอนที่มีมากในเซลล์ไปเป็นไฮโดรเจนและขับออกนอกเซลล์ โดยอาศัยพลังงานจากเฟอร์รีดอกซินกระตุ้นการทำงาน โดยปฏิกิริยานี้สามารถย้อนกลับได้



รูปที่ 2.6 วิธีการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : <http://genomicsgsl.energy.gov/benefits/hfromh2o.shtml>

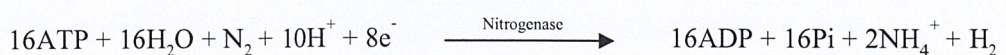
กระบวนการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต จะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และได้ตัวรีดิวซ์ภายในเซลล์เป็นผลพลอยได้ ตัวรีดิวซ์ภายในเซลล์ที่ได้มาสามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (ferredoxin oxidoreductase) ได้ เหมือนกับตัวรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่นกัน

2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย มีเอนไซม์ 3 ชนิดที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เอนไซม์ไนโตรจีเนส เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส และเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส ดังต่อไปนี้

2.5.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส

เอนไซม์ไนโตรจีเนสพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย หรือเมื่อเจริญในสภาวะที่มีไนโตรเจนน้อย ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนมีการใช้พลังงาน ATP ในการเร่งปฏิกิริยาอย่างน้อย 16 โมเลกุล เพื่อรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ ดังสมการดังต่อไปนี้

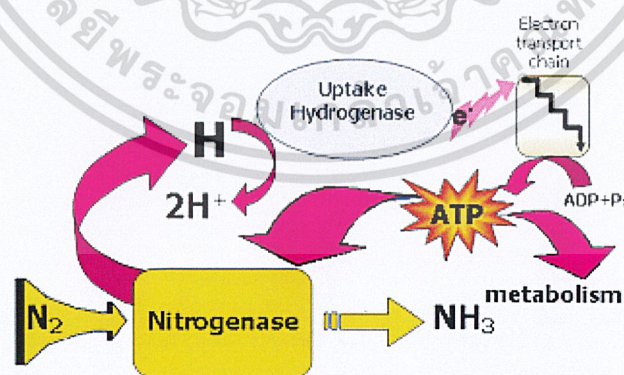


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบไปด้วย 2 ส่วน โดยทำหน้าที่ต่างกัน ซึ่งส่วนแรกคือเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) หรือ heterotetramer MoFe protein ประกอบด้วย α 2 หน่วยย่อยที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ β 2 หน่วยย่อยที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifK* ซึ่งทำหน้าที่แตกตัวโมเลกุลไนโตรเจน ส่วนที่สองคือ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส (dinitrogenase reductase) หรือ homodimer Fe protein ซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการขนส่งอิเล็กตรอนจากภายนอกที่ได้จากเฟอร์รีดอกซินและฟลาโวนดอกซิน (flavodoxin) จากการสลาย ATP อย่างน้อย 16 โมเลกุล แล้วส่งต่อไปยังเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสเพื่อรีดิวซ์ไนโตรเจนโมเลกุลและโปรตอนไปเป็นแอมโมเนียม

2.5.2 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส พบในไทลาคอยด์เมมเบรนของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส ประกอบด้วย 2 หน่วยคือโปรตีน *HupL* ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *HupL* ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายโมเลกุลไฮโดรเจนที่ได้ กระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน และโปรตีน *HupL* ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *HupS* ทำหน้าที่ส่งเสริมการทำงานของโปรตีน *HupL* โมเลกุลไฮโดรเจนที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกออกซิไดซ์ทันทีด้วยเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (รูปที่ 2.7) ปฏิกิริยานี้เรียกว่า Knallgas reaction ดังนั้น จึงไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

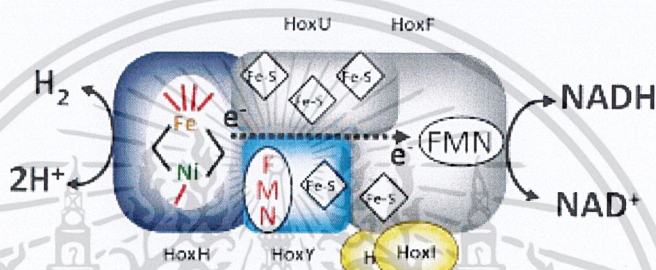


รูปที่ 2.7 การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสร่วมกับเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

ที่มา : <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/yield/>

2.5.3 เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส หรือ เอนไซม์ไบไดเรกชันนัลไฮโดรจีเนส (bidirectional hydrogenase) ทำหน้าที่ในการควบคุมระดับไฮโดรเจนในเซลล์ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากทั้ง NADH และโมเลกุลไฮโดรเจน (รูปที่ 2.8) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ได้โดยอาศัยหน่วยย่อย 4 หน่วยที่ต่างกัน (heterotetrameric enzyme) โดย 2 หน่วยย่อยรวมเรียกกันว่าไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยไฮโดรจีเนส δ และ β ถูกลอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* ตามลำดับ อีก 2 หน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่าไดอะฟอเรส (diaphorase) หน่วยย่อยของไดอะฟอเรส α และ γ ถูกลอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* ตามลำดับ โดยทั้งสองส่วนทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ หรือ NADH



รูปที่ 2.8 การทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส

ที่มา : http://www2.hu-berlin.de/biologie/microbio/structure/sm_structure.htm

2.6 ไชยาโนแบคทีเรีย

ไชยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ใน Division Cyanophyta พบว่ามีชีวิตอยู่ประมาณ 3×10^9 ปีมาแล้ว จัดเป็นพวกโปรคาริโอตชนิดแกรมลบ (Rassussen และ Svenning, 1998) สามารถสังเคราะห์แสงได้และบางชนิดมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายคลอโรพลาสต์ ซึ่งได้รับมาจากการอยู่ร่วมกันของไชยาโนแบคทีเรียกับพืชและการมีเอนไซม์ในโตรจีเนสตามลำดับ จากการศึกษาที่มีความหลากหลายทาง

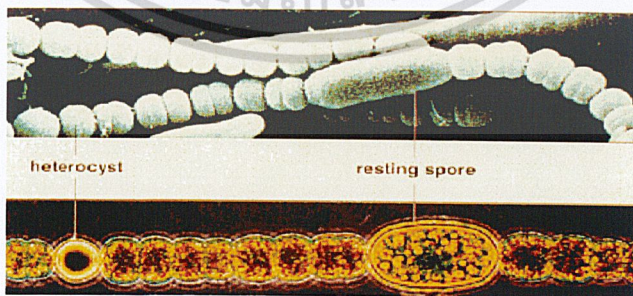
สรีรวิทยา สัณฐานวิทยาและการพัฒนารูปร่างต่างๆ ทำให้ไชยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ อย่างหลากหลาย ได้แก่ หิน ดิน ทะเลทราย น้ำพุร้อน น้ำจืด น้ำทะเลและ

ทะเลสาบ เป็นต้น (Mazel และคณะ, 1990) โดยปกติเซลล์ของไชยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วยผนังเซลล์ (cell wall) หุ้มด้วย gelatinous sheath ภายในเซลล์มีไทลาคอยด์ ไรโบโซม นิวเคลียส และ

เม็ดสีซึ่งอยู่ในส่วนที่เรียกว่า chromoplasm มีคลอโรฟิลล์เอใช้ในการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้

ไซยาโนแบคทีเรียจะมีสีเขียวแกมน้ำเงิน แต่บางชนิดมีสีแดง สีม่วง สีเขียว สีเขียวมะกอก สีน้ำตาล และสีดำ ไม่มีอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนที่ แต่จะสามารถเคลื่อนที่ไปด้านหน้าหลังได้ เช่น *Oscillatoria* อาหารจะเก็บสะสมในรูป cyanophycean starch ซึ่งได้แก่ ไกลโคเจนและโพรตีน มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยจะมีการสร้างสปอร์เป็น โครงสร้างที่เรียกว่าเซลล์อะคินีท (akinetete cell) โดยจะสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นของเซลล์พื้นฐาน (vegetative cell) และสามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ บางครั้งอาจสร้างสปอร์แรงจิโอสปอร์จากการแบ่งตัวหลายๆครั้งของโปรโตพลาสต์ทำให้ผนังเซลล์ทำหน้าที่เป็นสปอร์แรงเจียมซึ่งมีสปอร์บรรจุอยู่ โดยทั้งอะคินีทและสปอร์แรงจิโอสปอร์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างอื่น เช่น เซลล์เฮเทอโรซิสต์ ซึ่งนอกจากจะเป็นที่อยู่ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสแล้วยังเป็นส่วนที่ทำให้มีการแบ่งไซยาโนแบคทีเรียเป็นท่อนสั้นๆ ที่เรียกว่า โฮโมโกเนีย(hormogonia)อีกด้วย ตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรียได้แก่ สกุล *Gloeocapsa*, *Merismoperdia*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Gloeotrichia*, *Rivularia* และ *Microcystis* เป็นต้น

เซลล์ต่างๆ ของไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยเซลล์พื้นฐาน เป็นเซลล์ทั่วไปที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ เป็นแหล่งเก็บธาตุอาหารจำพวกแร่ธาตุและสามารถสร้างอาหารได้เอง โดยการสังเคราะห์แสง ส่วนเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst cell) เป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์หนา (รูปที่ 2.9) มักพบในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายบางชนิดและเป็นเซลล์ที่มีการตรึงไนโตรเจนและเซลล์อะคินีทเป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์หนา มีคุณสมบัติคล้ายกับสปอร์ของแบคทีเรียและเชื้อราและ hormogonia เป็นเซลล์ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย โดยจะทำหน้าที่เป็นอวัยวะในการสืบพันธุ์

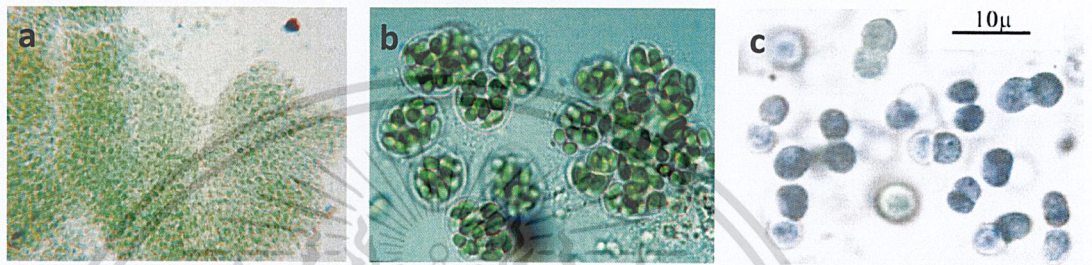


รูปที่ 2.9 ชนิดของเซลล์ต่างๆในไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : http://syscrashbackup.blogspot.com/2005_11_01_archive.html

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งไซยาโนแบคทีเรียได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

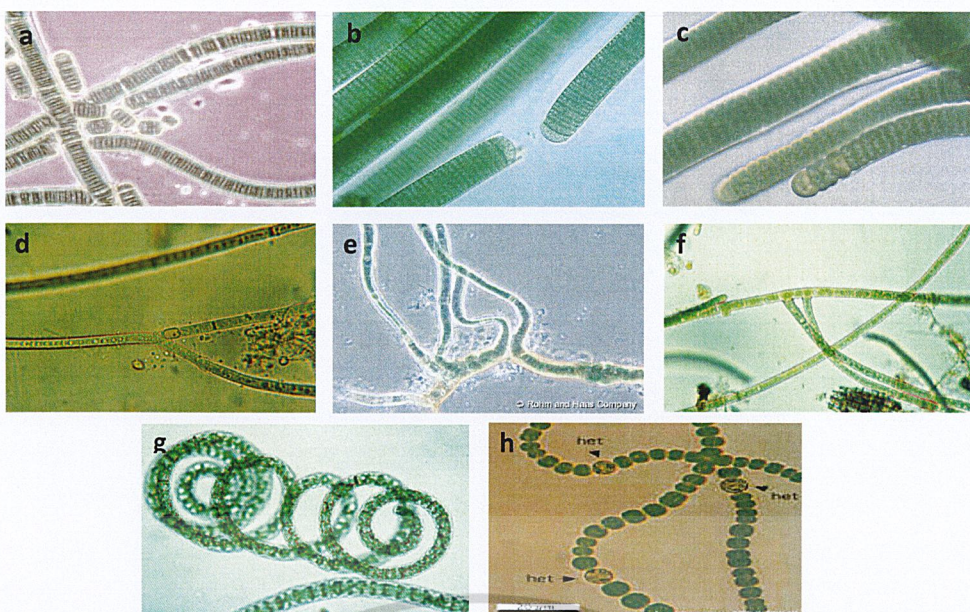
1. ไซยาโนแบคทีเรีย หรือ ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว (Non-filamentous form หรือ unicellular cyanobacteria) ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นทรงกลม (coccoïd form) พบทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและอยู่กันเป็นกลุ่มแบบ palmelloid colonies ที่มีเมือกหุ้มอยู่ (firm mucilaginous envelope) มีการแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 จาก 2 เป็น 3,... (amitotic) ตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Microcystis* sp. *Gloeocapsa* sp. และ *Synechococcus* sp. เป็นต้น (รูปที่ 2.10)



รูปที่ 2.10 ตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่เป็นเส้นสาย : a; *Microcystis* sp. b; *Gloeocapsa* sp. และ c; *Synechococcus* sp.

ที่มา :<http://student.sut.ac.th/b5176571/newcsu/images/doc/knowledge/bio/greenblue.doc>

2. ไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นเส้นสาย (Filamentous cyanobacteria) กลุ่มนี้เซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสายเรียกว่าตรัยโคม (trichome) พบได้หลายลักษณะ เช่น สกุล *Oscillatoria* จัดเป็นกลุ่มที่มีเส้นสายอย่างง่ายมีเซลล์ชนิดเดียวกัน (vegetative cell) มาเรียงต่อกัน เช่นเดียวกับ *Lyngbya* เรียกว่า homocystous form (รูปที่ 2.11) ส่วนกลุ่มเส้นสายที่มีเซลล์มากกว่า 1 ชนิด มาเรียงต่อกัน โดยนอกจากจะมี vegetative cell แล้วยังมี heterocyst cell ซึ่งมีหนึ่งเซลล์หนา 2 ชั้น ชั้นนอกเป็นโพลิแซคคาไรด์ ส่วนชั้นในเป็นไกลโคลิพิด เพื่อจำกัดการเข้าของออกซิเจน เรียงสลับหรืออยู่ปลายสุดของเส้นสาย ตรัยโคมเรียกว่า heterocystous form เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. เป็นต้น (รูปที่ 2.11) บางชนิดมีลักษณะเป็น spirally coiled ได้แก่ *Arthrospira* sp. และ *Spirulina* sp. บางชนิดมีลักษณะเป็น tube-like ที่มีเมือกหุ้ม (mucilaginous sheath) ได้แก่ *Lyngbya* sp. และยิ่งไปกว่านั้น ยังแบ่งเป็นลักษณะที่ไม่มีกิ่งก้าน (unbranched group) เช่น *Oscillatoria* sp. และ *Lyngbya* sp. และมีกิ่งก้าน (branched group) เช่น *Scytonema* sp. และ *Tolypothrix* sp. เป็นต้น



รูปที่ 2.11 ตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นเส้นสาย: a; *Lyngbya* sp. b; *Oscillatoria* sp. c; *Plectonema* sp. d; *Tolypothrix* sp. e; *Scytonema* sp. f; *Hapalosiphon* sp. g; *Spirulina* sp. และ h; *Anabaena* sp.

ที่มา :<http://student.sut.ac.th/b5176571/newcsu/images/doc/knowledge/bio/greenblue.doc>

ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยส่วนใหญ่เกิดในส่วนที่เป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์ Sprent (1990) รายงานว่าไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มี 26 สกุล ส่วนใหญ่เป็น aerobic cyanobacteria ดังตารางที่ 2.1

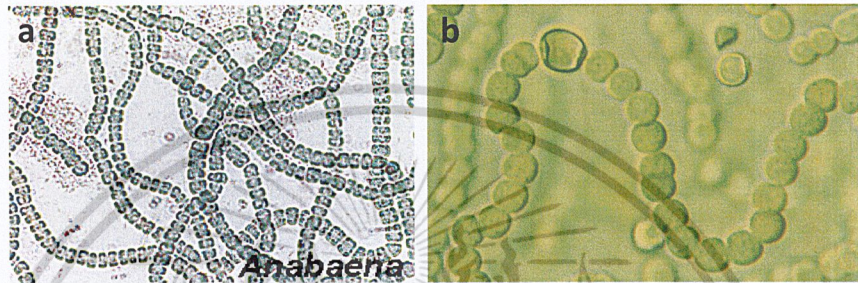
ตารางที่ 2.1 ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน

วงศ์	สกุล
Chroococaceae	<i>Chlorogloea</i> , <i>Chroococidiopsis</i> , <i>Gleotheca</i> , <i>Synechococcus</i>
Mastidocladaceae	<i>Mastidocladus</i> , <i>Michraete</i>
Nostocaceae	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Aulosira</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Pseudoanabaena</i>
Oscillatoria	<i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> (<i>Trichodesmium</i>), <i>Phormidium</i> , <i>Plectonema</i>
Rivulariaceae	<i>Calothrix</i> , <i>Dichothrix</i> , <i>Gleotrichia</i>
Scytonemataceae	<i>Scytonema</i> , <i>Tolypothrix</i>
Stigonemataceae	<i>Fischerella</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Stigonema</i>

ที่มา : Sprent (1990)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ ยังอาจจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามลักษณะการดำรงชีวิตได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. ไซยาโนแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระ (Free-living cyanobacteria) กลุ่มนี้จะตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแอมโมเนียและมีเอนไซม์ที่ช่วยในการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็น กลูตามेटคือ glutamate dehydrogenase (GDH) และ glutamine synthase (GS)-glutamate synthase (GOGAT) จากนั้น เปลี่ยนให้เป็นกลูตามีนแล้วจึงส่งไปยังเซลล์ข้างเคียง (vegetative cell) เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. เป็นต้น (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 ไซยาโนแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระ : a; *Anabaena* sp. และ b; *Nostoc* sp.

ที่มา : <http://student.sut.ac.th/b5176571/newcsu/images/doc/knowledge/bio/greenblue.doc>

2. ไซยาโนแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Symbiotic cyanobacteria) กลุ่มนี้จะสามารถอยู่ร่วมกันได้กับพืช สัตว์และเชื้อรา มีทั้งที่เป็น endophytic และ ectophytic cyanobacteria เช่น *Anabaena azollae* กับแห่นางดำ *Nostoc* sp. กับ ปรง และ lichens เป็นต้น (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 ไซยาโนแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น : a; *Anabaena azollae*

กับ *Azolla* b; *Nostoc* sp. กับต้นปรง และ c; lichens

ที่มา : <http://student.sut.ac.th/b5176571/newcsu/images/doc/knowledge/bio/greenblue.doc>

2.7 สไปรูลินา (*Spirulina* sp.)

2.7.1 ลักษณะทั่วไปและสัณฐานวิทยา

สไปรูลินา (*Spirulina*) มีความหมายว่า “เกลียว” เนื่องจากมีเส้นสายที่ขดกันเป็นเกลียว (รูปที่ 2.14) ไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง หรืออาจเรียกได้ว่าเป็นไชยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอท (Prokaryote) คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส บางครั้งการมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง ทำให้หลายคนคิดว่าเป็นพืช ซึ่งโดยแท้จริงแล้วไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีคุณสมบัติทางไกลความเป็นพืชอยู่มาก สไปรูลินามีเยื่อหุ้มเซลล์เป็นสารพอลิแซคคาไรด์ สามารถย่อยง่ายต่างกับพืชชั้นสูงหรือแม้กระทั่งสาหร่ายสีเขียว เช่น สาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella* sp.) ใน Division Chlorophyta ซึ่งมีผนังเซลล์เป็นเซลลูโลส ยกแก่การย่อยคุณสมบัติที่เด่นอีกอย่างหนึ่งของไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้คือ จะพบในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีความเป็นด่างสูง โดยมีพีเอช 10-11 ซึ่งสิ่งมีชีวิตอื่นที่เจริญอยู่ได้ค่อนข้างยาก จึงเท่ากับว่าเกือบจะเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวในแหล่งน้ำที่พบไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ หรือถ้านำไปเพาะเลี้ยงก็จะมีการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่นได้น้อย ไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในประเทศไทยรู้จักกันในชื่อสาหร่ายเกลียวทอง สไปรูลินาพบได้ในน้ำที่ค่อนข้างเสียและมีความเป็นด่างสูง โดยเฉพาะในบ่อบำบัดน้ำเสีย เช่น จะพบในบ่อน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรมต่างๆ โดยทั่วไปแล้วเจริญอยู่ได้ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม แต่ส่วนใหญ่จะพบในน้ำจืด อาจพบปะปนได้กับสาหร่าย สีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่น เช่น *Oscillatoria* sp. หรือ *Microcystis* sp. เป็นต้น สไปรูลินามีอยู่ด้วยกันประมาณ 35 ชนิด เช่น *S. platensis*, *S. prince*, *S. major* และ *S. subtilissima* เป็นต้น ซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งขนาด ความยาวและลักษณะของเกลียว มีลักษณะเป็นเส้นสายประกอไปด้วยเซลล์ที่เรียงต่อกัน ไม่แตกแขนง เรียกเส้นสายนี้ว่า ตรีโคม เส้นสายนี้บิดเป็นเกลียว ลักษณะของเกลียวแตกต่างกันไปตามสปีชีส์ ขนาดความยาวประมาณ 300-500 ไมโครเมตร ความกว้างประมาณ 8 ไมโครเมตร เดิมทีนักวิทยาศาสตร์จัดให้เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว เนื่องจากมองเห็นผนังเซลล์ของแต่ละเซลล์ที่มา รวมตัวกันเป็นเส้นสายไม่ขาด ต่อมาด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชันสามารถเห็นชัดว่า ตรีโคมของไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ประกอไปด้วยเซลล์หลายเซลล์ต่อกัน

ผนังเซลล์ของสไปรูลินาเป็นผนังหลายชั้นประกอบด้วยสารมิวโคโปรตีนและเพคติน ชั้นนอกเป็นสารพอลแซคคาไรด์ มีแวกคิวโอล (vacuole) ขนาดใหญ่ทำให้ลอยน้ำได้ นิเวศวิทยามีเยื่อหุ้ม กรดนิวคลีอิกกระจายอยู่ทั่วเซลล์ ตัวเซลล์ไม่ได้ปกคลุมด้วยเยื่อเมือก (mucous membrane) เหมือนไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป ผิวของเซลล์ไม่มีจุลินทรีย์เกาะ มีความสามารถในการต้านทาน จุลินทรีย์สูงและยังต้านต่อรังสีอัลตราไวโอเลตสูง การเคลื่อนที่จะเป็นแบบควงส่ววนและเป็นคลื่น

การสืบพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จะมีเฉพาะแบบไม่อาศัยเพศ โดยการขาดออกเป็น ท่อน (fragmentation) และท่อนที่ขาดนี้สามารถแบ่งเซลล์ใหม่ ทำให้ทรีย์โคมียืดยาวออกได้ เส้นสายของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้อาจยาวบ้างสั้นบ้าง ขึ้นกับอายุและความอุดมสมบูรณ์ แม้แต่ความเป็นเกลียวบางครั้งก็ไม่คงที่ เกลียวบิดซัดจนสวยงาม หรือบางครั้งจะคลายออกคล้ายเส้นตรง ขึ้นกับปัจจัยการเพาะเลี้ยง อาจเป็นความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร แสง อุณหภูมิ หรือ พีเอช (ยูดี, 2544)

สไปรูลินาจัดอยู่ใน

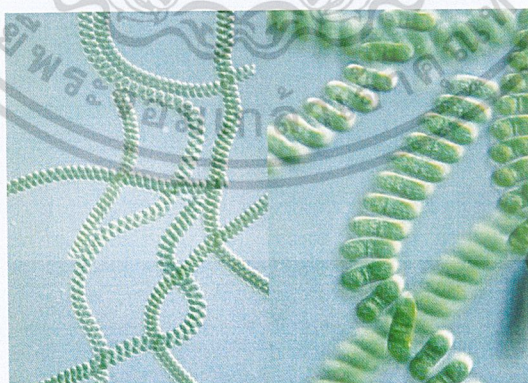
Division : Cyanophyta

Class : Cyanophyceae

Order : Oscillatoriales

Family : Oscillatoriaceae

Genus : *Spirulina*



รูปที่ 2.14 ลักษณะของสาหร่ายสไปรูลินา

ที่มา : <http://www.phhp.co.th/Q-A.html>

2.7.2 สารเคมีที่สำคัญในสไปรูลินา

2.7.2.1 โปรตีน (protein)

สไปรูลินามีสารเคมีที่สำคัญหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะโปรตีน พบในปริมาณสูงซึ่งแตกต่างจากจุลินทรีย์โดยทั่วไป การหาปริมาณโปรตีนในไซยาโนแบคทีเรียนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน งานวิจัยส่วนใหญ่มักหาปริมาณโปรตีนที่เป็นกากโปรตีน โดยใช้วิธีการย่อยเซลล์ด้วยกรด แล้วหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้จากการย่อยด้วยวิธีเจลดดาห์ล (kjeldahl) แล้วคูณด้วยค่าคงที่ 6.25 แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนที่ได้จะมีค่าคลาดเคลื่อนได้มากกว่าความเป็นจริง เนื่องจากในเซลล์มีองค์ประกอบอื่นที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบด้วยเช่นกัน แต่ไม่ได้เป็นโปรตีน เพื่อหลีกเลี่ยงและทำให้ค่าที่ได้ถูก ต้องหักออกด้วย 1.4 จากปริมาณกากโปรตีนไนโตรเจน (crude protein nitrogen) และยังสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสาหร่ายด้วยวิธีอื่น ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบไนโตรเจนอื่นเช่นวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

โปรตีนภายในเซลล์สาหร่ายอยู่ในรูปของไฟโคบิลิน โปรตีนและกรดอะมิโน ซึ่งไฟโคบิลิน โปรตีน เป็นรงควัตถุสำคัญในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งประกอบไปด้วย ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอีทริน ซึ่งมีประโยชน์และความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ในอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นสีผสมอาหาร เครื่องสำอาง นอกจากนี้ยังมีความสำคัญใช้เป็นสารเรืองแสงในงานติดตามตรวจสอบทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาจึงกล่าวได้ว่ามีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ

กรดอะมิโนที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาเป็นชนิดที่จำเป็นและไม่จำเป็นซึ่งร่างกายสามารถสร้างขึ้นได้ กรดอะมิโนที่จำเป็นซึ่งมีรายงานพบในสาหร่ายชนิดนี้คือ ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมทไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทรีโอนีน ทริปโตเฟน และวาเลอีน ส่วนกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นที่พบมีดังนี้ อะลานีน อาร์จินีน แอสปาดิก ซีสเทอีน กรดกลูตามิก ไกลซีน ฮิสทีดีน โพรลีน ซีรีน ไทโรซีน จากการนำสาหร่ายสไปรูลินาที่กลายพันธุ์มากระตุ้นเลี้ยงในอาหารที่มีกรดอะมิโนเทียมทำให้สาหร่ายสร้างกรด อะมิโนชนิดนั้นออกมามาก จึงคาดว่า การสร้างกรดอะมิโนอาจสามารถกระตุ้นให้สร้างปริมาณมากในสายพันธุ์ปกติได้ สำหรับปริมาณโปรตีนในสาหร่ายนั้นขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายรวมทั้งปริมาณที่ให้ต้องเพียงพอ ถ้ามีน้อยจะทำให้ปริมาณโปรตีนในเซลล์ลดลงได้ (ยูวดีและคณะ, 2545)

2.7.2.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)

คาร์โบไฮเดรตหรือแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบสำคัญของสิ่งมีชีวิต โดยพบคาร์โบไฮเดรตที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาร้อยละ 13 เป็นพอลิแซคคาไรด์ คาร์โบไฮเดรตที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาอยู่ในรูปต่างๆ ดังนี้ กรดพอลิไฮดรอกซีบิวทีริก (Polyhydroxybutyric acid: PHB) ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียทั้งที่สามารถสังเคราะห์แสงได้และไม่ได้ โดยจะเก็บไว้เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำรอง ในสาหร่าย *S. platensis* พบกรดพอลิไฮดรอกซีบิวทีริกสูงถึงประมาณร้อยละ 6 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยสาหร่ายจะสร้าง PHB ปริมาณต่ำภายใต้สภาวะการเจริญแบบมีแสงและใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศเป็นแหล่งคาร์บอน (photoautotrophic condition) แต่เมื่อเจริญภายใต้สภาวะไม่มีแสงและใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากสารอินทรีย์ (mixotrophic) รูปแบบต่างๆ เช่น อะซิเตท (acetate) มีผลทำให้ปริมาณกรดพอลิไฮดรอกซีบิวทีริก ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 3 สิ่งมีชีวิตต่างชนิดสามารถสร้างสารประกอบ พอลิแซคคาไรด์ได้ในปริมาณและชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต พอลิแซคคาไรด์สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ตามตำแหน่งที่พบในเซลล์คือ กลุ่มแรกได้แก่ พวกที่มีพอลิแซคคาไรด์อยู่ในเซลล์ (intercellular polysaccharide) พอลิแซคคาไรด์ชนิดนี้ อยู่ภายในเซลล์หรือบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะ เป็นพวกแป้ง (starch) หรือไกลโคเจน (glycogen) กลุ่มที่สอง พอลิแซคคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall polysaccharide) และกลุ่มสุดท้ายคือพอลิแซคคาไรด์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide หรือ exopolysaccharide (EPS)) พบอยู่ภายในเซลล์มี 2 ลักษณะด้วยกันคือพอลิแซคคาไรด์ ที่เป็นเมือก (slime polysaccharide) ไม่เกาะติดกับเซลล์ สังเกตเห็น โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง และเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเมือกจะกระจายแพร่ออกมาทำให้อาหารที่เลี้ยงมีความหนืดเพิ่มขึ้น และพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นแคปซูล (capsular polysaccharides) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ติดกับผนังเซลล์ โดยยึดกับผนังเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ พอลิแซคคาไรด์ในสาหร่ายสไปรูลินามีประมาณ ร้อยละ 12-20 ซึ่งส่วนใหญ่สามารถละลายน้ำได้และมักละลายได้ดีที่พีเอช 8 แต่เมื่อพีเอชต่ำลงทำให้ความสามารถในการละลายลดลง

2.7.2.3 ลิพิด (lipid)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีปริมาณลิพิดน้อย ในสาหร่ายสไปรูลินาพบปริมาณร้อยละ 6-13 ซึ่งครึ่งหนึ่งนั้นเป็นกรดไขมัน โดยที่กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากคือกรดไลโนเลนิก (linolenic acid) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 35 ของปริมาณลิพิดทั้งหมด กระบวนการสังเคราะห์ลิพิดเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากขึ้นเมื่อกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง อย่างเช่นการสร้างเอซิวกลีเซอรอลในสาหร่ายที่ให้ น้ำมันมีอยู่ 2 ขั้นตอน ขั้นแรกคือการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ขั้นที่สอง เพาะเลี้ยงในสภาวะกดดันด้วย ปัจจัยอื่นเพื่อให้สาหร่ายสร้างลิปิดเพิ่มขึ้น ซึ่งทั้งสารอาหารและสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงล้วน มีผลต่อปริมาณลิปิดและสัดส่วนของกรดไขมันด้วย ภายใต้อุณหภูมิที่สาหร่ายขาดไนโตรเจนทำให้มี ปริมาณลิปิดเพิ่มขึ้น และการเพิ่มขึ้นของแสงจะกระตุ้นการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) (PUFA) สำหรับการสกัดลิปิดทั้งหมดทำได้โดยใช้สารละลายพวก lipophilic organic solvent เช่น อีเทอร์ ปีโตรเลียมอีเทอร์และคลอโรฟอร์ม (ยูวดี และคณะ, 2545)

2.7.2.4 กรดแกมมาลิโนเลนิก (Gamma-linolenic acid) หรือ GLA

กรดแกมมาลิโนเลนิกมีความสำคัญต่อร่างกาย เนื่องจากเป็นกรดไขมันจำเป็นตัวหนึ่งที่ใช้ เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพรอสตาแกรนดิน (PGE) ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุม กลไกของแรงดันโลหิต การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลและการอักเสบของเซลล์

สาหร่ายสไปรูลินาเป็นหนึ่งในจำนวนสิ่งมีชีวิตน้อยชนิดที่สามารถผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิก ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายได้ปริมาณสูง ซึ่งสาหร่ายชนิดนี้ให้ผลผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิก มากที่สุดประมาณร้อยละ 8-32 ของกรดไขมันทั้งหมดหรือร้อยละ 0.3-1.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิกของสาหร่ายสไปรูลินาขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่เจริญโดยผลิตได้ ปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ในระยะการเจริญช่วง log phase และเมื่อความเข้มแสง เพิ่มขึ้นปริมาณกรดแกมมาลิโนเลนิกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ถ้าทำการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาภายใต้อุณหภูมิ มืดสลัดกับภาวะสว่างทั้งในห้องปฏิบัติการและในที่กลางแจ้ง จะทำให้ปริมาณกรดแกมมาลิโนเลนิก ในสาหร่ายเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.2 เป็น 1.6 จึงกล่าวได้ว่าความเข้มแสง อุณหภูมิ และปริมาณสารอาหารมี ผลต่อการเจริญ การสร้างกรดไขมัน รวมทั้งปริมาณรงควัตถุด้วย (ยูวดี และคณะ, 2545)

2.7.2.5 รงควัตถุ (Pigment)

ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสไปรูลินาจะอาศัยรงควัตถุที่สำคัญ คือ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิโปรตีน ที่ประกอบไปด้วยไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทริน ช่วยดูดกลืนพลังงานแสงในช่วงความคลื่นต่างๆ กันมาใช้ในการสร้าง อาหารของสาหร่าย นอกจากความสำคัญในกระบวนการดังกล่าวแล้ว รงควัตถุยังมีศักยภาพนำมา ใช้เป็นสารสีธรรมชาติในกระบวนการผลิตอาหาร เครื่องสำอาง และเครื่องสำอางค์ได้เป็นอย่างดี

ความสามารถในการสร้างรงควัตถุจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมในการเจริญ รวมทั้งความเข้มแสง ความสามารถในการสังเคราะห์รงควัตถุจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมในการเจริญ รวมทั้งความเข้มแสง ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ ชนิดและปริมาณสารอาหาร สำหรับทุกชนิดจะมีคลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุหลักในกระบวนการสังเคราะห์แสง ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะพบเฉพาะคลอโรฟิลล์ เอ เท่านั้น ในขณะที่สาหร่ายกลุ่มอื่นๆ อาจพบคลอโรฟิลล์ที่แตกต่างกันออกไป ในสาหร่ายสไปรูลินาพบปริมาณตั้งแต่ร้อยละ 0.8-1.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปัจจุบันมีการนำคลอโรฟิลล์จากสาหร่ายสไปรูลินามาเพิ่มสีลงในอาหาร ยา และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Danesi, 2002)

2.7.3 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา

2.7.3.1 แสงแดด

แสงแดดมีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญ การสังเคราะห์แสงของสาหร่าย สำหรับสาหร่ายสไปรูลินาต่างสายพันธุ์ก็มีความทนต่อความเข้มแสงได้แตกต่างกัน ความเข้มแสงที่ต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสไปรูลินาอยู่ในช่วง 30-35 กิโลลักซ์ สำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมในระบบเปิดอาศัยแสงจากธรรมชาติโดยตรง ซึ่งความเข้มแสงในแต่ละฤดูกาลมีความผันแปรค่อนข้างสูงขึ้นอยู่กับลักษณะภูมิประเทศที่ต่างกันด้วย (ยุวดีและคณะ, 2545) ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนปริมาณแสงมากตลอดปี เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายชนิดนี้

อย่างไรก็ตาม เมื่อสาหร่ายเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ทำให้เกิดการบดบังแสงระหว่างเซลล์ขึ้นสาหร่ายที่อยู่ด้านล่างได้รับแสงน้อยกว่าสาหร่ายที่อยู่ด้านบน ปริมาณแสงที่ได้รับจึงมีข้อจำกัดส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย ดังนั้น ในการออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงต้องคำนึงถึงการกระจายของแสงสู่อาหารที่เลี้ยงเพื่อให้เซลล์สาหร่ายได้รับแสงอย่างทั่วถึง ระดับความลึกของอาหารเลี้ยงในบ่อจึงมีความสำคัญ ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์ด้วย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ว่าจะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อต้องการสารอะไรมากก็จำเป็นต้องจัดองค์ประกอบที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือการกวนซึ่งจะช่วยให้สาหร่ายได้รับแสงอย่างทั่วถึงอีกทางหนึ่ง

สำหรับความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสไปรูลินาอยู่ในช่วง 150-200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตร ซึ่งเป็นปริมาณแสงอาทิตย์ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร ประมาณร้อยละ 10-15 ค่านี้จะขึ้นอยู่กับสถานะในการเจริญและอัตราส่วนระหว่าง

คลอโรฟิลล์และน้ำหนักรวม ซึ่งสาหร่ายมีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่ความเข้มแสงอ่อนตัวแต่ เมื่อความเข้มแสงสูงมากกว่าความเข้มแสงอ่อนตัวของสาหร่ายทำให้เกิดปฏิกิริยาฟิโตออกซิเดชัน(Photooxidation) ซึ่งทำให้ออกซิเจนของสาหร่ายนั้นเสื่อมเสียไป อัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายลดลงทำให้ผลผลิตลดลงต่ำด้วย ซึ่งปัญหานี้สามารถเกิดได้เมื่อเลี้ยงในที่กลางแจ้ง จากปัญหาดังกล่าวประกอบกับการเลี้ยงในที่กลางแจ้งประสบปัญหาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกมากจึงแก้ปัญหาโดยการเลี้ยงสาหร่ายระบบปิด เช่น เลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อ (tubular bioreactor) และถังปฏิกรณ์แบบเพลทเพลท (flat plate reactors) ซึ่งง่ายต่อการควบคุมอีกทั้งยังให้ผลผลิตปริมาณสูงและมีความปลอดภัยจากการปนเปื้อน แต่มีข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงดังกล่าวคือใช้ต้นทุนสูงและสำหรับเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อนั้นมักจะประสบปัญหาการสะสมออกซิเจนและอุณหภูมิอาหารสูงเกินไป จึงต้องควบคุมอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงในระบบดังกล่าวโดยใช้น้ำพ่นลงบนท่อเลี้ยงซึ่งมีผลให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น ได้อีก (ยูวดีและคณะ, 2545)

2.7.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของสาหร่าย โดยตรงรวมไปถึงการสังเคราะห์แสงและการหายใจของสาหร่ายด้วย แหล่งที่พบการเจริญของสาหร่ายมักมีอุณหภูมิก่อนข้างสูง ซึ่งเป็นสภาพภูมิอากาศในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน โดยสามารถพบสาหร่ายสไปรูลินาในน้ำพุร้อนและสามารถทนอุณหภูมิในช่วง 33-35 องศาเซลเซียสได้ (Seshadri และคณะ , 1980) สไปรูลินาเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15-50 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 32-42 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิสูงถึง 44 องศาเซลเซียส ทำให้สาหร่ายเกิดความเสียหายและเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส ทำให้สาหร่ายสไปรูลินาตายได้ ต่อมาเมื่อมีการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสหรือเกิน 37 องศาเซลเซียสนั้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายชนิดนี้ซึ่งภายใต้อุณหภูมิที่สูง ความเข้มแสงเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ สาหร่ายสไปรูลินา แต่เมื่ออุณหภูมิต่ำการเลี้ยงสาหร่ายโดยมีการบังแสงร้อยละ 25 ให้ผลผลิตสูงกว่าสภาวะกลางแจ้ง แสดงว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายและผลผลิตสูงกว่าสภาวะกลางแจ้ง ซึ่งในฤดูร้อนที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียสทำให้เกิดการสูญเสียอาหารไปประมาณ 10 ลิตรต่อตารางเมตร โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสไปรูลินาอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ดังนั้นในฤดูร้อน แสงเป็นปัจจัยจำกัดหลักและอุณหภูมิเป็นปัจจัยรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3.3 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่สำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และสร้างพลังงานของสิ่งมีชีวิตจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะมีอากาศสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์เซลล์มักใช้แหล่งคาร์บอนเป็นคาร์โบไฮเดรต ธาตุคาร์บอนเป็นธาตุที่มีปริมาณการใส่ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายมากเป็นอันดับหนึ่ง ในน้ำหนักแห้งของสาหร่ายจึงมีธาตุคาร์บอนอยู่ประมาณร้อยละ 50 โดยสาหร่ายสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากการเติมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) ซึ่งรู้จักกันดีในชื่อของ เบคกิงโซดา โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตนั้นเป็นผลึกสีขาวที่ละลายน้ำได้ดีและมีความเป็นด่างเล็กน้อย พบในจีเอ็มของพืชหลายชนิดและสาหร่ายทะเล ส่วนอีกทางเลือกหนึ่งที่สาหร่ายสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีคือ การใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ร้อยละ 1) ในอากาศที่ละลายสู่น้ำซึ่งมีราคาถูกกว่า ทั้งสองรูปแบบเมื่อละลายน้ำจะอยู่ในรูป H_2CO_3 , HCO_3^{2-} หรือ CO_3^{2-} ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดต่างของอาหารด้วย แต่การเลี้ยงในระบบเปิด คาร์บอนไดออกไซด์อาจมีการสูญเสียไปในอากาศได้ง่ายและอาจทำให้อาหารเป็นกรดจึงต้องควบคุมค่าความเป็นกรดค้างให้อยู่ระหว่าง 8.5-10.0 จากการวิจัยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินากกลางแจ้ง พบว่าสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ได้ในขั้นตอนเริ่มแรกต้องเติมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) ลงไปปริมาณหนึ่งก่อนเพื่อช่วยเป็นบัฟเฟอร์ในระบบและทำให้อาหารเจริญได้ดี ที่สำคัญยังช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ร้อยละ 30 สำหรับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วงประมาณ 4.5-8.5 กรัมต่อลิตร (ยูวดีและคณะ, 2545)

2.7.3.4 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน โคเอนไซม์ กรดนิวคลีอิกและคลอโรฟิลล์ ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีปริมาณการใส่ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายมากเป็นอันดับสองรองจากธาตุคาร์บอน แหล่งของธาตุไนโตรเจนสำหรับสาหร่ายโดยทั่วไปมีทั้งสารประกอบอนินทรีย์และสารประกอบอินทรีย์ สาหร่ายบางชนิดในกลุ่มของโปรคาริโอตยังสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศได้ แต่สาหร่ายสไปรูลินาอยู่ในประเภทที่ไม่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศได้ จึงต้องมีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหาร สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนที่สาหร่ายโดยทั่วไปสามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ รูปไนเตรท (NO_3^-) ไนไตรท์ (NO_2^-) และแอมโมเนียม (NH_4^+) ส่วนสารประกอบกรดอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย กลูตามีน แอสพาราจีนและกรดอะมิโน เป็นต้น เมื่อสาหร่ายใช้ในโตรเจนในรูปแอมโมเนียมเป็นอาหาร ค่าพีเอชของน้ำเลี้ยงจะลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งทำ

ให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่ดี สำหรับบางชนิดยังมีความไวต่อความเข้มข้นที่สูงของแอมโมเนียมและการเจริญของสาหร่ายเหล่านี้จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 1 มิลลิโมลาร์ ส่วนไนโตรที่ จะต้องใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำ คือ ปริมาณ 1 มิลลิโมลาร์ เพราะความเข้มข้นที่สูงจะยับยั้งการเจริญ ของสาหร่าย ธาตุไนโตรเจนที่สาหร่ายดูดซึมเข้าไปในเซลล์ในรูปของออกซิไดซ์ (oxidized form) เช่น ไนเตรท ไนโตรที่ จะต้องถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอมโมเนียมก่อน แล้วจึงนำไปสร้างเป็นสารอินทรีย์ซึ่ง เป็นส่วนประกอบของเซลล์สาหร่าย เมื่อในอาหารมีทั้งแอมโมเนียและไนเตรท สาหร่ายจะใช้ แอมโมเนียก่อนจนหมดจึงจะใช้ไนเตรท (สุมาลี, 2535) Chu (1943) ได้รายงานถึงช่วงความเข้มข้น ของ $\text{NO}_3\text{-N}$ (ไนเตรท-ไนโตรเจน) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายพวกแพลงก์ตอนว่าช่วงความ เข้มข้นที่เป็นระดับต่ำของช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม (lower limit) คือ 0.3-0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้า ต่ำจากระดับนี้ อัตราการเจริญจะลดลง ส่วนช่วงความเข้มข้นที่เป็นระดับสูงของช่วงความเข้มข้นที่ เหมาะสม (upper limit) คือ 3.5-17 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าเลยจากระดับนี้มีผลต่อการยับยั้งการ เจริญเติบโตและช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.9-3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.7.3.5 ความเป็นกรดด่าง (pH)

สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดด่างสูง จึงจัดเป็น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็น "Obligate alkaliphile" ระดับความเป็นกรดด่างของอาหารที่ใช้ เพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยง โดยมีผลกระทบต่อกระบวนการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแร่ธาตุในอาหาร รวมทั้งผลกระทบโดยตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมภายใน เซลล์ของสาหร่าย ความเป็นกรดด่างที่สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญได้ดีคือในช่วง 9-11 แต่เมื่อ ความเป็นกรดด่างเพิ่มสูงขึ้นเกิน 0.5 แล้วมีผลกระทบทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงและเมื่อ ความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้นถึง 1.5 อัตราการเจริญจะลดลงร้อยละ 20 ของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม โดยความเป็นกรดด่างในโปรโตพลาสซึมจะต่ำกว่าความเป็นกรดด่างในอาหาร เช่น ความเป็นกรด ด่างในโปรโตพลาสซึมเท่ากับ 8 แต่ในอาหารเท่ากับ 10 ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่ชอบความเป็นด่างต้องการ โซเดียมเพื่อรักษา ระดับความเป็นกรดด่างให้ต่ำกว่าในอาหาร ดังนั้นการขาดโซเดียมมีผลทำให้เซลล์ ถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว (ยูวดีและคณะ, 2545)

2.7.4 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิด (closed system) อาจเรียกว่าเป็นการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (batch culture) โดยนำเชื้อสาหร่ายมาใส่ในอาหารใหม่ สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่อัตราการเจริญจะลดลงจนกลายเป็นศูนย์ในที่สุด เนื่องจากสาหร่ายไม่สามารถทนต่อสารที่สาหร่ายปล่อยออกมาเป็นจำนวนมากหรือเนื่องจากการมีแร่ธาตุอาหาร แสงสว่างไม่เพียงพอ สาหร่ายขนาดเล็กที่มีเพิ่มจำนวนเซลล์แบบง่าย ๆ โดยการแบ่งเซลล์จะมีช่วงการเจริญในการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวอยู่ 4 ช่วง เหมือนพวกแบคทีเรีย ดังนี้

1.Lag phase เป็นช่วงที่สาหร่ายมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ระยะนี้จะไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์

2.Acceleration phase หรือ Log phase ระยะนี้มวลสาหร่ายมีการเปลี่ยนแปลงเป็นลำดับดังนี้ RNA เป็นองค์ประกอบแรกที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ต่อมาโปรตีน และน้ำหนักรวมจึงมีการเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นเป็นอันดับสุดท้าย Log phase เป็นช่วงที่สาหร่ายมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว มีเมตาบอลิซึมสูง จึงมีอัตราการเจริญสูงสุด และเป็นอัตราการเจริญที่คงที่ Deceleration phase เป็นช่วงที่การเจริญของสาหร่ายเริ่มมีการเพิ่มขึ้นน้อยลง เนื่องจากมวลสาหร่ายมีความหนาแน่นมากขึ้น ทำให้บังแสงกันเอง แต่ละเซลล์ได้รับแสงน้อยลง อัตราการสังเคราะห์แสงจึงลดลง ทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง

3.Stationary phase เป็นช่วงที่มวลหรือจำนวนสาหร่ายมีปริมาณคงที่ แต่องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์บางอย่างอาจมีปริมาณเพิ่มขึ้น บางอย่างอาจมีปริมาณลดลง ช่วงการเจริญนี้จะเกิดการขาดแคลนแร่ธาตุที่สำคัญ การขาดแคลนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การยับยั้งการเจริญโดยสารที่สาหร่ายปล่อยออกมา การเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหาร การได้รับแสงไม่เพียงพอเนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย ในแบคทีเรียในช่วงนี้จะมีการใช้อาหารที่สะสมไว้ภายในเซลล์

4.Death phase มวลสาหร่ายเริ่มลดลงเนื่องจากอัตราส่วนของการหายใจต่อการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้นจนมีค่ามากกว่า 1 หรือเนื่องจากการตายของเซลล์สาหร่าย

2.8 น้ำทิ้ง

น้ำทิ้ง หมายความว่า น้ำเสียที่เกิดจากการประกอบกิจการ โรงงานอุตสาหกรรมหรือนิคมอุตสาหกรรมที่จะระบายลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะหรือออกสู่สิ่งแวดล้อม และให้หมายความรวมถึงน้ำเสียจากการใช้น้ำของคนงาน รวมทั้งจากกิจกรรมอื่นใน โรงงานอุตสาหกรรมหรือในนิคมอุตสาหกรรมด้วย โดยน้ำทิ้งต้องเป็นไปตามมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งที่กำหนดไว้ ซึ่งในน้ำทิ้งนั้นจะมีองค์ประกอบต่างๆ มากมาย เช่น สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ธาตุอาหาร โลหะต่างๆ จุลินทรีย์ เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นของบริษัทรุ่งสิ โภคภัณฑ์ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.2.2 น้ำทิ้งโรงงานปลาป่น

3.3 ก๊าซที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

3.3.1 ก๊าซอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co., Ltd., Thailand)

3.3.2 ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co., Ltd., Thailand)

3.4 สารเคมี

3.4.1 แหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตท และ โซเดียมซิเตรท

3.4.2 โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย

3.5 อุปกรณ์

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

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

3.5.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)

3.5.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.5.5 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Delta Laboratory, 137FX, Thailand)

3.5.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Z383K, Germany)

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

3.5.8 เครื่องวัดความเป็นกรดค่า (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)

3.5.9 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply) (Amersham Pharmacia Biotech EPS30, Sweden)

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

3.5.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermablock) (Biosan TDB-120, Thailand)

3.5.12 เครื่องวิเคราะห์ห้องค้ำประกอบก๊าซ (Perichrom, USA)

3.5.13 ไมโครปิเปต (micropipette)

3.5.14 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (glasswares)

3.5.15 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)

3.5.16 แท่งแม่เหล็กคนสาร (magnetic bar)

3.5.17 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด (National Scientific, USA)

3.5.18 เช็มนิดก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 วิธีการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานปลาป่นด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำมากรองด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์ที่พบในน้ำทิ้ง นำตัวอย่างน้ำทิ้งปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำการแยกตะกอนเซลล์ออกมา นำตะกอนเซลล์ไปทำการกระจายลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำพลาสติกไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ปิเปตสารละลายเซลล์ 100 ไมโครลิตร มาทำการ spread plate ลงบนอาหารแข็ง BG11 ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate ต่อไป เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3.6.2 การแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำทิ้ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ดังนี้ กลูโคส ซูโครส โซเดียม คาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตท และโซเดียมซิเตรท โดยให้มีปริมาณโมลคาร์บอนเท่ากัน คือ 0.188 มิลลิ โมลคาร์บอนต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ (18 ชั่วโมงต่อวัน) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ทุกๆ 2 วัน

3.6.3 การแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอน

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำทิ้ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันปริมาณโมลคาร์บอนของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.2 ดังนี้ 0 , 0.188 , 0.940 และ 1.88 มิลลิโมลคาร์บอน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ (18 ชั่วโมงต่อวัน) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกๆ 2 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงครบ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วย เครื่อง GC-TCD ตามวิธีในข้อ 3.6.9

3.6.4 การแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำทิ้ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ดังนี้ โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียม ไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย ความเข้มข้น 0.03 โมลไนโตรเจนต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ (18 ชั่วโมงต่อวัน) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการ วัดการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ทุกๆ 2 วัน

3.6.5 การแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำทิ้ง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันปริมาณ โมลของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 ดังนี้ 0 , 0.03 , 0.15 และ 0.30 โมลไนโตรเจน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ (18 ชั่วโมงต่อวัน) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกๆ 2 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงครบ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วย เครื่อง GC-TCD ตามวิธีในข้อ 3.6.9

3.6.6 การแปรผันสูตรของน้ำทิ้งที่ทำการคัดเลือกโดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบ 2 เฟส

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำทิ้งสูตรคัดเลือก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความแสง 1,000 ลักซ์ (18 ชั่วโมงต่อวัน) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ทุกวัน หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ไปปรับตัวในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 2 วัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเครื่อง GC-TCD และทำการเพาะเลี้ยงแบบ 2 เฟส โดยเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำทิ้งสูตรคัดเลือก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความแสง 1,000 ลักซ์ (18 ชั่วโมงต่อวัน) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์มากระจายลงในน้ำทิ้งปกติเพื่อชักนำให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นเวลา 1 วัน และเก็บเกี่ยวเซลล์ไปปรับตัวในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 2 วัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเครื่อง GC-TCD

3.6.7 การแปรผันระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำทิ้งสูตรคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.6.6 (ที่มีการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ (18 ชั่วโมงต่อวัน) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ไปปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมง วัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเครื่อง GC-TCD ตามวิธีการในข้อ 3.6.9

3.6.8 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์

นำสารละลายเซลล์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติพีลส์ จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 900 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน หุ้มด้วยแผ่นฟอยล์อลูมิเนียม ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสารละลายสีเขียวใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ (Meek and Castenholz., 1974) ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อมิลลิลิตร)} = 12.6 \times A_{665} \times 10$$

3.6.9 วิธีการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

นำไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ส่วนของสารละลาย จากนั้นทำการกระจายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรคัดเลือก ปริมาตร 6 มิลลิลิตร แล้วเปิดสารละลายใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด จากนั้นไล่อากาศในขวดออกโดยใช้เข็มที่ 1 เจาะทางด้านบนของขวดเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวด ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดก๊าซปริมาตร 400 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC-TCD

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Detector	Thermal Conductivity Detector
Colume	Pack column 2 mm , Molecular sieve 5 ^o A mesh 60/80
Temperature Program	Detector temperature : 100 °C Column temperature : 50 °C Injector temperator : 100 °C
Argon carrier gas	Flow rate 20 ml/min

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น

จากการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นและสังเกตลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่พบในน้ำทิ้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่พบนั้นมีลักษณะเป็นเส้นสายขดกันเป็นเกลียว ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เรียงต่อกัน ไม่แตกแขนง ซึ่งพบอยู่ในปริมาณมาก (รูปที่ 4.1 ก) นำตัวอย่างของน้ำทิ้งที่มีไซยาโนแบคทีเรียมาทำการปั่นเหวี่ยง จนได้ตะกอนเซลล์และนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปกระจายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.1(ข)



รูปที่ 4.1 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ก) และบนอาหารแข็ง (ข)

จากผลการทดลอง พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่พบนั้น ลักษณะเป็นเส้นสาย (filament) ขดเป็นเกลียว ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เรียงต่อกัน ไม่แตกแขนง เรียกเส้นสายนี้ว่า ทริโคม (trichome) ตัวเซลล์ไม่ได้ปกคลุมด้วยเยื่อเมือก และไม่พบเซลล์พิเศษอย่างเฮเทอโรซิสต์ โดยไซยาโนแบคทีเรียที่พบนั้นมีลักษณะคล้ายไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Spirulina* ของอันดับ Oscillatoriales ซึ่งอธิบายไว้ในคู่มือการจัดลำดับอนุกรมวิธาน Bergey's manual (2005) โดยไซยาโนแบคทีเรียในสกุลนี้สามารถทำการคัดแยกได้จากน้ำที่ค่อนข้างเสียและมีความเป็นด่างสูง พีเอชประมาณ 10-11 โดยเฉพาะในบ่อบำบัดน้ำเสีย เช่น จะพบในบ่อน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรมต่างๆ โดยทั่วไปเจริญอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกร่อยและน้ำเค็ม แต่ส่วนใหญ่จะพบในน้ำจืด อาจพบอยู่ปะปนกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Oscillatoria* sp. หรือ *Microcystis* sp. เป็นต้น

4.2 ผลของการวิเคราะห์หองค์ประกอบต่างๆ ของน้ำทิ้งโรงงานปลาป่น

จากการนำตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นมาทำการวิเคราะห์หองค์ประกอบต่างๆ ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์หองค์ประกอบของน้ำทิ้ง

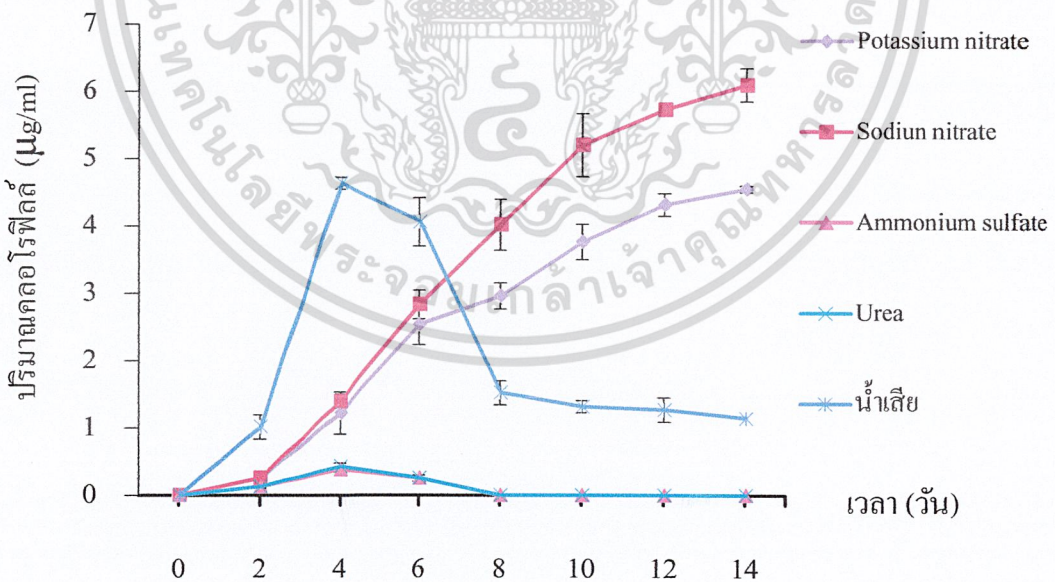
พารามิเตอร์	ค่าที่วัดได้
พีเอช (pH)	7.69
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solids)	3,246 mg/l
ปริมาณของแข็งละลายน้ำ (Dissolved solids)	3,190 mg/l
ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended solids)	14 mg/l
บีโอดี (Biochemical oxygen demand)	13.3 mg/l
ซีโอดี (Chemical oxygen demand)	100 mg/l

ค่าซีโอดี บีโอดีและปริมาณของแข็งนั้นเป็นค่าที่สามารถบ่งบอกถึงปริมาณของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทิ้งได้ โดยค่าซีโอดีนั้นเป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณออกซิเจนของน้ำที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ทั้งหมดที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้และไม่ได้ โดยถ้าวัดค่าซีโอดีนั้นมีค่ามากก็จะแสดงว่ามีปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งอยู่มาก ในทำนองเดียวกันค่าบีโอดีก็มีลักษณะเช่นนี้ แต่ค่าบีโอดีนั้นจะแสดงเฉพาะค่าที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้เพียงเท่านั้น ส่วนปริมาณของแข็งนั้นก็เป็ค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่เจือปนอยู่ในน้ำทิ้ง โดยส่วนใหญ่แล้วการวิเคราะห์ค่าต่างๆ เหล่านี้จะนิยมใช้ในการพิจารณาคุณภาพของแหล่งน้ำ

4.3 ผลของการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการแปรผันสถานะต่างๆ

4.3.1 ผลของการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนด้วยการเติมสารต่างๆ ดังนี้ โพแทสเซียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย โดยให้มีปริมาณโมลไนโตรเจนเท่ากับ 0.03 โมลไนโตรเจนต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทุก 2 วัน พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไป เซลล์จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นได้ในช่วงแรกจนถึงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณคลอโรฟิลล์จะลดลง ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมโซเดียมไนเตรทและน้ำทิ้งที่เติมโพแทสเซียมไนเตรทที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงและใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.2) ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำทิ้งที่เติมยูเรียนั้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์น้อยมากเนื่องจากเซลล์ไม่สามารถเจริญได้



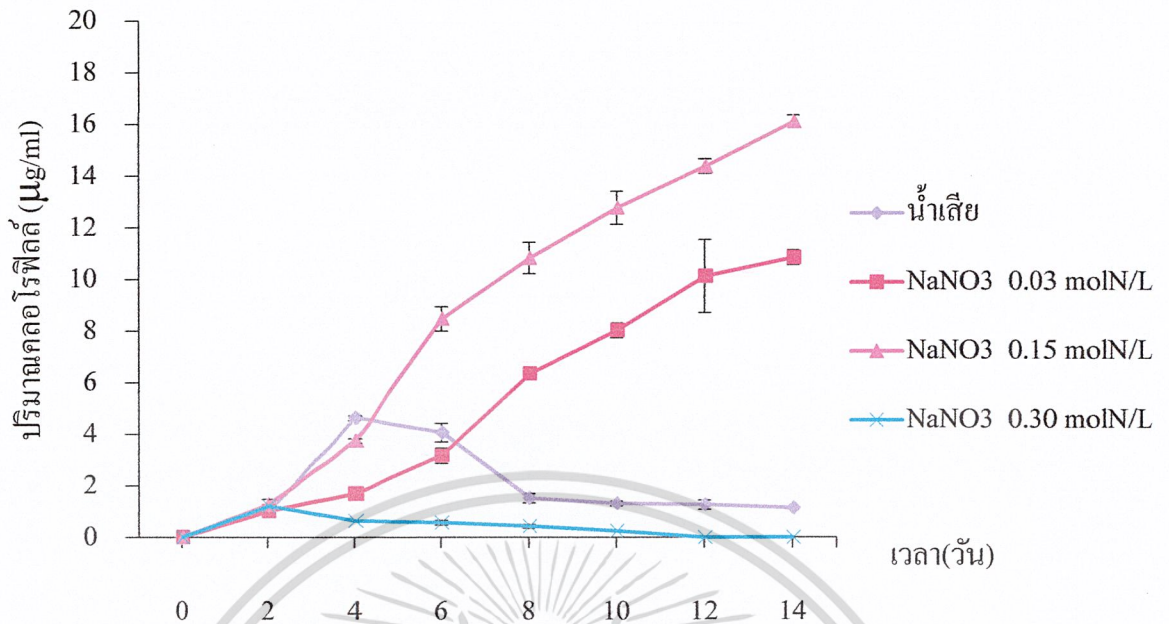
รูปที่ 4.2 ผลการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. จากการแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยมีปริมาณโมลไนโตรเจนเท่ากับ 0.03 โมลไนโตรเจนต่อลิตร

จากการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมโซเดียมไนเตรท มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดเท่ากับ 6.096 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิเมตร ซึ่งพบว่ามีสารเจริญเติบโตมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น (รูปที่ 4.2) ดังนั้นจึงเลือกโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการทดลองครั้งต่อไป รองลงมาคือน้ำทิ้งที่เติมโพแทสเซียมไนเตรท โดยมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดเท่ากับ 4.549 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิเมตร ซึ่งจากการทดลองพบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Luis และคณะ (2004) ที่พบว่าการเติมโซเดียมไนเตรทและโพแทสเซียมไนเตรทลงไปในการเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารมีสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำทิ้งที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปที่ไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ดีแต่ก็มีผลข้างเคียงเช่นกัน ดังนั้นเมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตใช้ไปจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (สุมาลี, 2535) ซึ่งไม่เหมาะสมแก่การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ค่าความเป็นกรด - ด่างสูง

4.3.2 ผลของการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่แปรผันปริมาณไนโตรเจน

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่เติมโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ตั้งแต่ 0 , 0.03 , 0.15 และ 0.30 โมลไนโตรเจนต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทุก 2 วัน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์น้ำทิ้งที่มีการเติมโซเดียมไนเตรท 0.03 และ 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตร เซลล์มีการเจริญเติบโตหรือมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการเติมโซเดียมไนเตรท 0.30 โมลไนโตรเจนต่อลิตรและน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมโซเดียมไนเตรท ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ผลการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการแปรผันปริมาณของโซเดียมไนเตรท

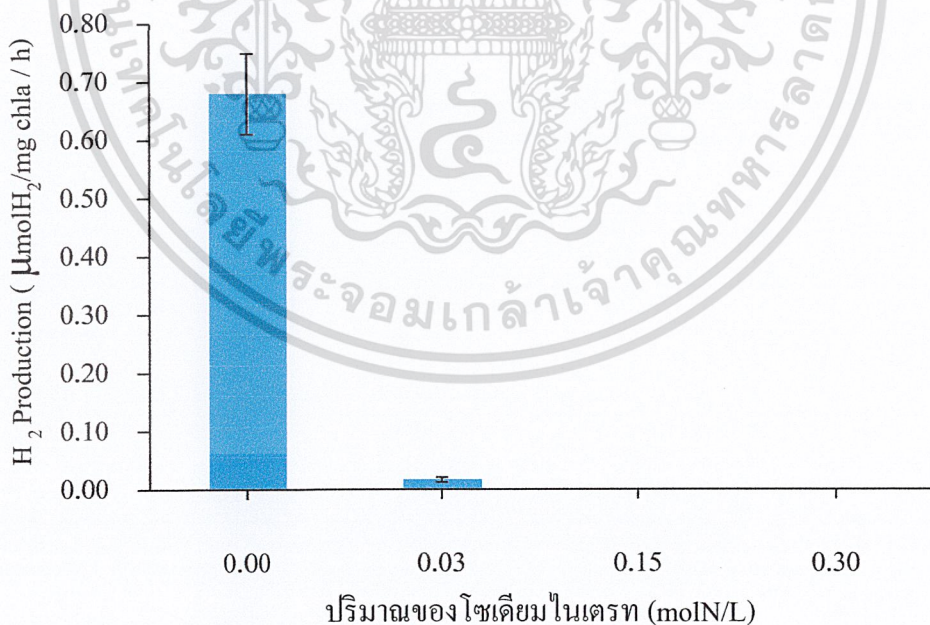
จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเติมโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตร เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงที่สุดเท่ากับ 16.105 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งปกติและน้ำทิ้งที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.03 โมลไนโตรเจนต่อลิตรที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงที่สุดเท่ากับ 1.143 และ 10.840 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่ในการทดลองเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเป็น 0.30 โมลไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าเซลล์ไม่สามารถเจริญในความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทนี้ได้

เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ จึงจำเป็นต้องได้รับแหล่งไนโตรเจนจากภายนอก เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน สร้างสารประกอบโปรตีน (Doberman และ Fairhurst ,2006) ช่วยในกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด และสร้างคลอโรฟิลล์ (Xin *et al.*, 2010) จากการทดลองการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตร ในน้ำทิ้งส่งผลให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทในน้ำทิ้งเป็น 0.30 โมลไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าไซยาโนแบคทีเรียไม่

เจริญ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุมาลี (2535) ที่พบว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียได้ จากนั้นจึงนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่ปกติ น้ำที่เติมโซเดียมไนเตรท 0.03 และ 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตรที่เชื้อสามารถเจริญได้ไปศึกษาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารน้ำที่ปกติ น้ำที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.03 โมลไนโตรเจนต่อลิตร และน้ำที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน จะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลาย 5 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วที่บ่มแสง ฉีดพ่นโล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาทีและบ่มในสภาวะไร้อากาศอีก 2 ชั่วโมง จากนั้น นำส่วน head space ปริมาตร 400 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์หองค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่ปกติสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 0.680 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง แต่ไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่เติมโซเดียมไนเตรท 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตรสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.017 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในน้ำที่เติมโซเดียมไนเตรท 0.30 โมลไนโตรเจนต่อลิตร ไม่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ (รูปที่ 4.4)

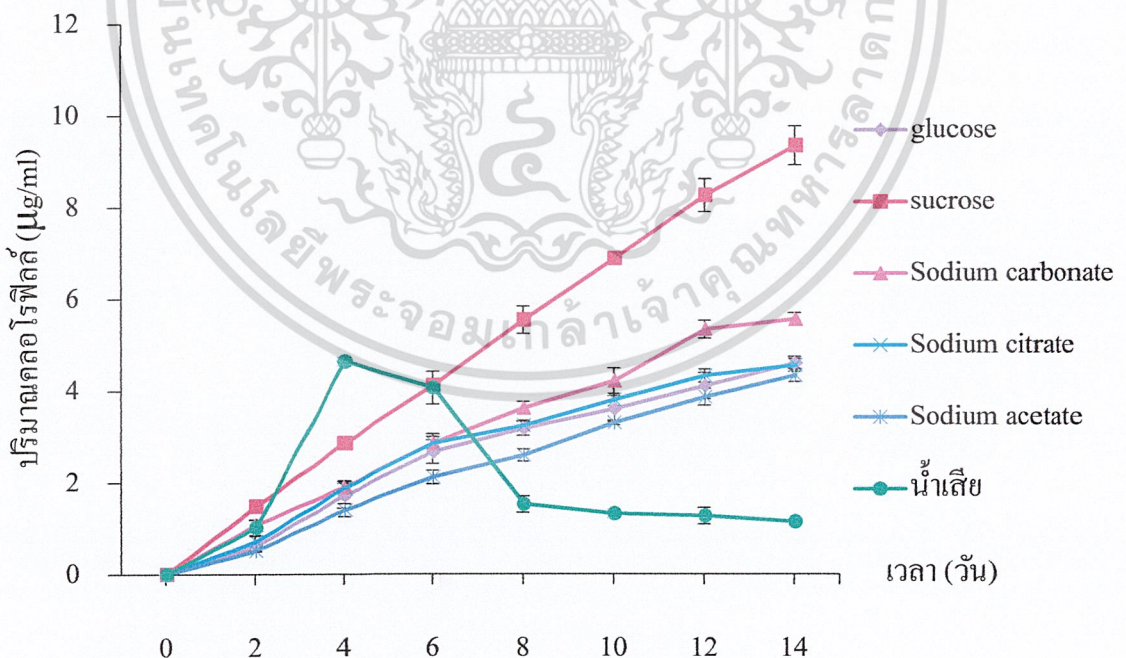


รูปที่ 4.4 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในน้ำที่ที่แปรผันปริมาณโซเดียมไนเตรท

จากผลการทดลองพบว่าน้ำทิ้งที่มีการเติมโซเดียมไนเตรท 0.03 โมลาร์ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญที่ดี มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง ซึ่งทำให้สามารถรับพลังงานจากระบวนการสังเคราะห์แสงได้ดี (ยงยุทธ, 2550) และผลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงคือก๊าซออกซิเจนปริมาณมาก เมื่อนำมาใส่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน ออกซิเจนอาจจะยังคงหลงเหลืออยู่ ซึ่งออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้ไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้

4.3.3 ผลของการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina sp.* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนด้วยการเติมสารต่างๆ ดังนี้ โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตท โซเดียมซิเตรต กลูโคส และซูโครส โดยให้มีปริมาณโมลคาร์บอนเท่ากับ 0.188 มิลลิโมลคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทุก 2 วัน พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมซูโครสมีการเจริญสูงสุดซึ่งต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่มีการเจริญใกล้เคียงกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.5

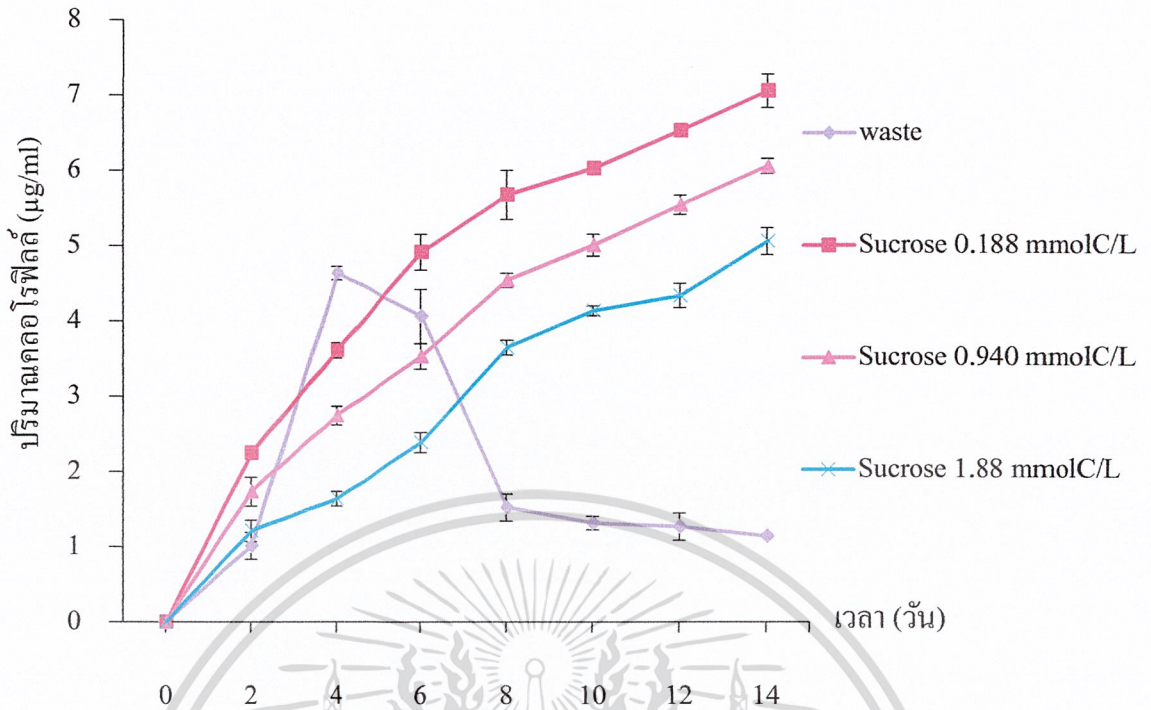


รูปที่ 4.5 ผลการเจริญเติบโตของ *Spirulina sp.* จากการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณโมลคาร์บอนเท่ากับ 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร

จากการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมแหล่งคาร์บอนทุกชนิดมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียปกติ แต่พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่มีการเจริญมากที่สุดคือไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมซูโครส โดยมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดเท่ากับ 9.341 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.5) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น รองลงมาคือไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมโซเดียมคาร์บอเนต น้ำทิ้งที่เติมกลูโคส น้ำทิ้งที่เติมโซเดียมซเตรต น้ำทิ้งที่เติมโซเดียมอะซีเตท และน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ซึ่งวัดปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดได้เท่ากับ 5.555 , 4.598 , 4.556 , 4.323 และ 1.143 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกน้ำทิ้งที่เติมซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการทดลองครั้งต่อไป

4.3.4 ผลของการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่แปรผันปริมาณคาร์บอน

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทิ้งที่มีการเติมซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครส ตั้งแต่ 0 , 0.188 , 0.94 และ 1.88 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทุก 2 วัน พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการเติมซูโครส 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร มีการเจริญได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งปกติ แต่จากการทดลองเมื่อเพิ่มปริมาณของซูโครสเป็น 0.94 และ 1.88 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ไซยาโนแบคทีเรียเจริญได้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.6)



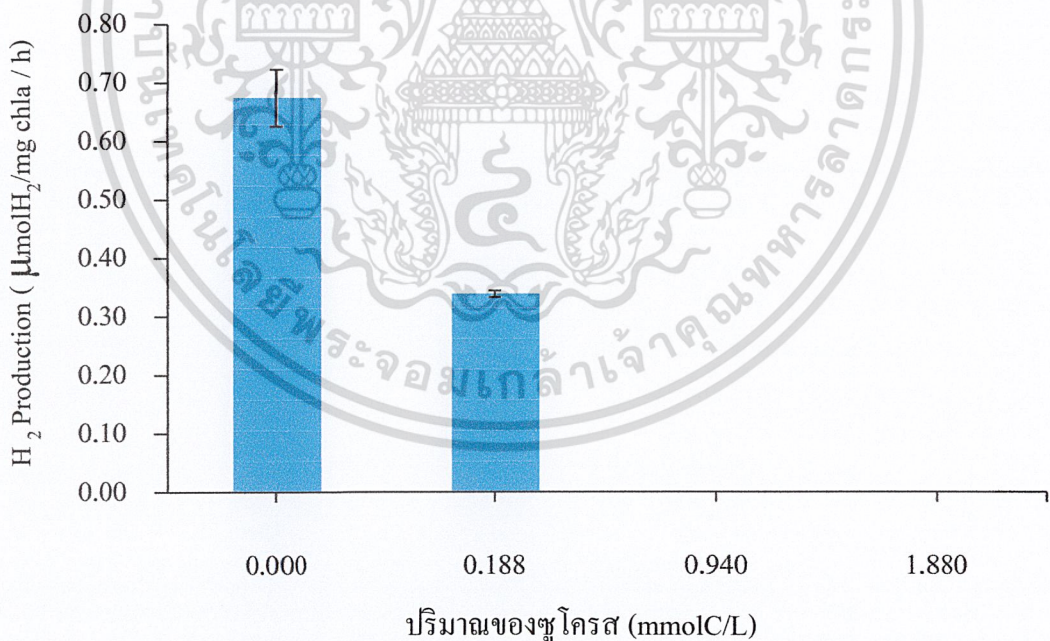
รูปที่ 4.6 ผลการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการแปรผันปริมาณของซูโครส

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งปกติ โดยไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีซูโครสที่ความเข้มข้น 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดเท่ากับ 7.05 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการเติมซูโครส 0.94 และ 1.88 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดเท่ากับ 6.053 และ 5.057 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)

จุลินทรีย์มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำๆ โดยสามารถนำน้ำตาลไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆอาจเกิดการออสโมซิส(osmosis) จากการเติมน้ำตาลลงไปในน้ำ น้ำตาลจะละลายในน้ำเป็นสารละลายทำให้ความเป็นอิสระของน้ำลดลง คือ มีค่า A_w (Water activity) ต่ำกว่า 1 ลงไปเรื่อยๆ ทำให้ความเป็นอิสระของน้ำลดน้อยลง ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตลำบากขึ้นเรื่อยๆ เพราะว่ามันไม่สามารถดึงโมเลกุลของน้ำมาใช้ได้ น้ำภายในเซลล์จุลินทรีย์ถูกดึงออก จุลินทรีย์จึงไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

(cleaming.srp.ac.th) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่พบว่าการเติมซูโครสที่ความเข้มข้นสูงๆ จะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญได้น้อยลง

จากนั้น นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารน้ำทิ้งปกติ น้ำทิ้งที่เติมซูโครส 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร และน้ำทิ้งที่เติมซูโครส 0.94 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหารปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วทึบแสง ฉีดพ่นไต่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาทีและบ่มในสภาวะไร้อากาศอีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วน head space ปริมาตร 400 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งปกติสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 0.675 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงน้ำทิ้งที่เติมซูโครส 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 0.339 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมซูโครส 0.94 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (รูปที่ 4.7)

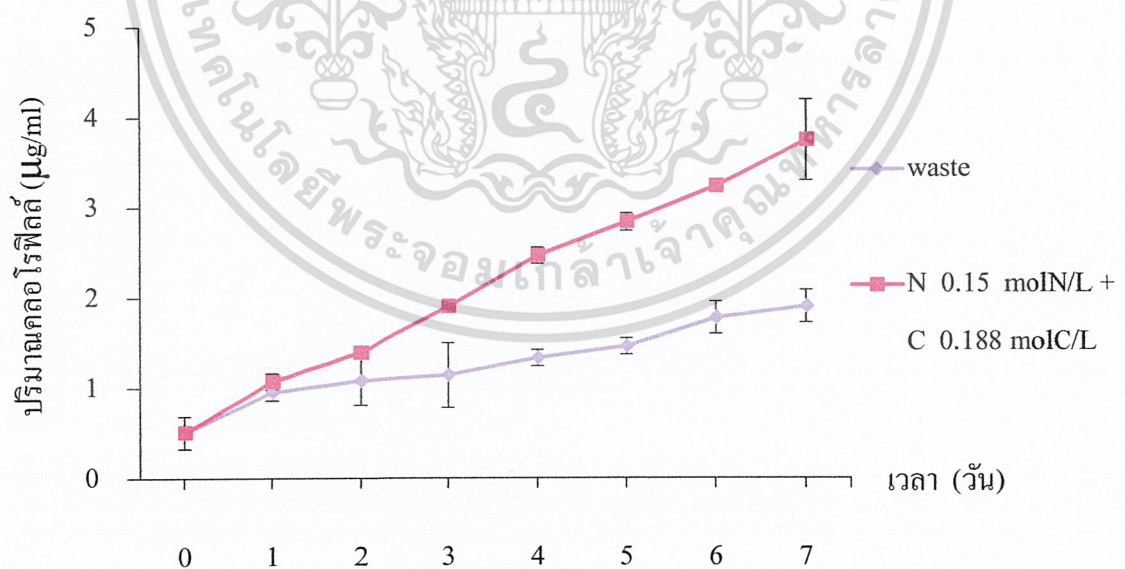


รูปที่ 4.7 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ในน้ำทิ้งที่แปรผันปริมาณซูโครส

เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกออโตโทรฟ (autotroph) ที่สามารถสังเคราะห์สารอาหารได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ จึงไม่จำเป็นต้องได้รับแหล่งคาร์บอนจากภายนอก (วันเพ็ญ, 2549) แต่ก็มีไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากภายนอกได้ ซึ่งแหล่งคาร์บอนนี้ทำให้เกิดความแตกต่างของตัวให้อิเล็กตรอนระหว่างน้ำเสียที่เติมและไม่เติมแหล่งคาร์บอนซึ่งจะถูกใช้เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์รีเวิร์ส-ซิบิลไฮโดรจีเนส จึงส่งผลกระทบต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย (Datta et al, 2000) ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อยลงหรือไม่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เลย

4.3.5 ผลการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina sp.* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือก

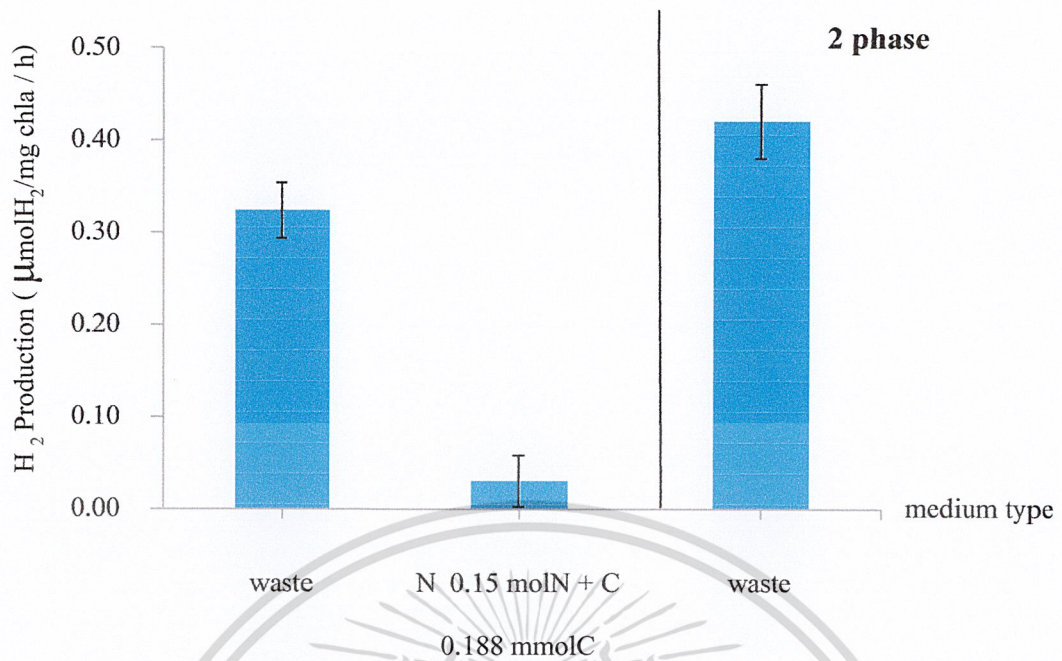
จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือก คือน้ำทิ้งที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตรร่วมกับแหล่งไนโตรเจน (โซเดียมไนเตรท) 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือก มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดโดยมากกว่าน้ำทิ้งปกติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.747 ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 ผลการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina sp.* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือก

จากการทดลองปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์นั้นมีความแตกต่างกันไปเมื่อเซลล์นั้นถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ในน้ำที่สูตรต่างๆ โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่สูตรคัดเลือกและน้ำที่ปกติเซลล์จะค่อยๆ มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เพิ่มขึ้นนั้นหมายถึงเซลล์มีการเจริญโตและเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งจากกราฟจะเห็นได้ว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในน้ำที่สูตรคัดเลือกนั้นจะมีการเจริญเติบโตสูงกว่าในน้ำที่ปกติ ทั้งนี้เนื่องมาจากว่าในน้ำที่สูตรคัดเลือกมีสารอาหารสมบูรณ์กว่าในน้ำที่ปกติ โดยมีทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแหล่งคาร์บอนนั้นมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์เซลล์และสร้างพลังงานของสิ่งมีชีวิตและจำเป็นสำหรับเซลล์ในการเจริญเติบโต ส่วนแหล่งไนโตรเจนนั้นพบว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน โคเอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ในเซลล์

จากนั้น นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำที่ปกติ น้ำที่สูตรคัดเลือกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหารปริมาตร 6 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตรลงในขวดที่บดแสง ฉีดฟุ้งไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที และบ่มในสภาวะไร้อากาศอีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วน head space ปริมาตร 400 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์หองค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่ที่ไม่มีการเติมการเติมแหล่งอาหารลงไป สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุดคือ 0.324 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าในน้ำที่สูตรคัดเลือกประมาณ 10 เท่า (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ใน น้ำทิ้งสูตรคัดเลือกและภายใต้การชักนำในน้ำทิ้งปกติ (2 phase)

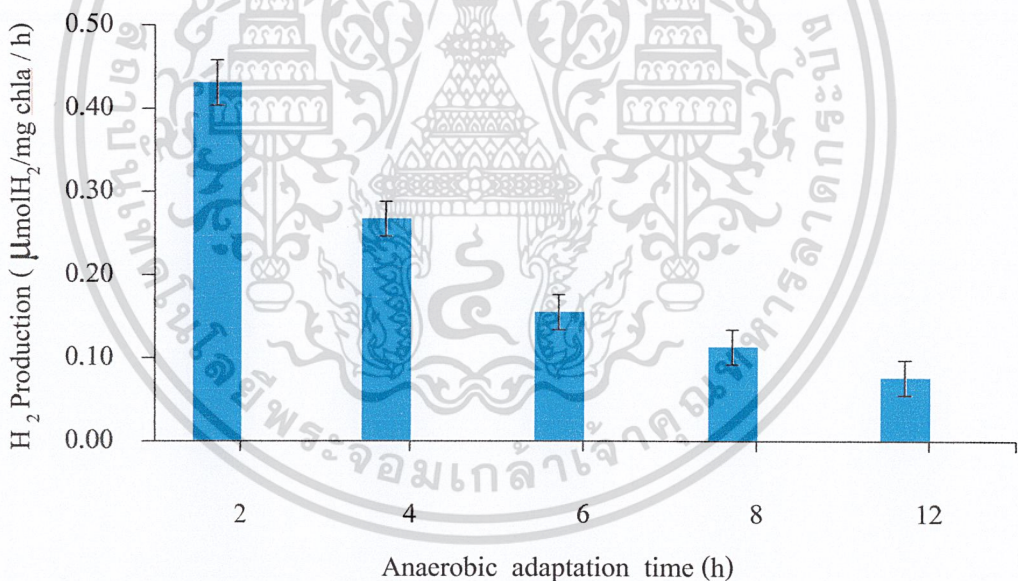
จากผลการทดลอง น้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารลงไปนั้นสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่สูงกว่าน้ำทิ้งที่มีการเติมสารอาหารลงไป โดยทั่วไปไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ไม่ต้องการแหล่งไนโตรเจนจากภายนอก แต่สายพันธุ์ที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ จำเป็นต้องได้รับธาตุไนโตรเจนจากภายนอกเพื่อใช้ในการเจริญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งสารประกอบไนโตรเจนอนินทรีย์หลายชนิด มีผลกระทบต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน เช่น ไนไตรท์ ไนเตรทและแอมโมเนีย เป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Lambert et al., 1979) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองซึ่งน้ำทิ้งที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปนั้นสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อยกว่าในน้ำทิ้งที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารลงไป

จากการทดลองแบบ 2 phase ซึ่งจะทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์มาทำการชักนำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนโดยเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งปกติ เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหารปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตรลงในขวดที่บดแสง ฉีดพ่นไต่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที และบ่มในสภาวะไร้อากาศอีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วน head space ปริมาตร 400 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่า เซลล์ที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงในน้ำที่สูตรคัดเลือกแบบ 2 phase มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่สูตรคัดเลือกแบบธรรมดา ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.42 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.9)

4.3.6 ผลการผลิตไฮโดรเจนจากการแปรผันระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำที่สูตรคัดเลือกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์มาชักนำให้ผลิตไฮโดรเจนโดยเพาะเลี้ยงในน้ำที่ปกติเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ไปปรับตัวในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 2 , 4 , 6 , 8 และ 12 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่า ระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศที่ 2 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่อชั่วโมงสูงสุด คือ 0.42 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่ามากกว่าที่ระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศที่ชั่วโมงอื่นๆ (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ

จากผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแสดงให้เห็นว่า เมื่อระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศเพิ่มขึ้น เซลล์นั้นมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่ลดลง ในสภาวะที่มีออกซิเจนความเข้มข้นสูงมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ในโตรจีเนสและไฮโดรจีเนสในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในสภาวะไร้อากาศเท่านั้น (Fay,1992) โดย

เอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจนที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลพลอยได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของเซลล์และเพื่อป้องกันการรบกวนของออกซิเจนต่อการทำงานของเอนไซม์ ระยะเวลาที่ใช้ในการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศต้องขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและสภาวะในการทดลองที่เหมาะสมด้วย จากการทดลองพบว่าเมื่อเซลล์ปรับตัวในสภาวะไร้อากาศมากกว่า 2 ชั่วโมง เซลล์ไม่สามารถมีการผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มมากขึ้น แต่กลับมีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณที่ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ถูกกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ขึ้นในสภาวะไร้อากาศนั้นทำงานได้น้อยลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมต่อการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศในการทดลองนี้ คือ ชั่วโมงที่ 2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการนำไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. ที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานปลาป่นมาทำให้บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน และระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ สรุปได้ว่า

1. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. คือ เพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทิ้งที่มีซูโครสความเข้มข้น 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina* sp. คือ เพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือกที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนซูโครส 0.188 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนโซเดียมไนเตรท 0.15 โมลไนโตรเจนต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้เซลล์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จากนั้นจึงชักนำให้อยู่ในน้ำทิ้งที่ขาดแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน ซึ่งเหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน โดยให้ระยะเวลาการปรับตัวในสภาวะไร้อากาศ 2 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งเท่ากับ 0.42 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

- กัมปนาท มะหิพันธ์ และ ชีราภรณ์ มะลิวัลย์.2551.การศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเล.โครงการพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2551.
- ยงยุทธ. 2550. วารสารวิชาการ โอสธสภา. ภาควิชาปฐพีวิทยา. วิทยาเขตกำแพงแสน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ยุวดี พิรพรพิศาล, อัญชลี เชื้อนเพชร, วีระพันธ์ เกียรติภักดิ์, ศักดา พรังลำภู และสาทร พรหมบดีแก้ว. 2545.การศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ระดับน้ำร่องจากน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วจากระบบก๊าซชีวภาพฟาร์มเลี้ยงสุกร ปีที่ 2. รายงานการวิจัยภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วันเพ็ญ ภูติจันทร์. 2549. วิทยาสาร่าย (Phycology). กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- สินินาฎ อักโขสุวรรณ.2550.ผลของการแปรรูปและอุณหภูมิของการเก็บรักษาต่อซีไฟโคไซยานินและสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดสาหร่ายเกลียวทอง(*Spirulina platensis*)ป.โท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมาลี ดุลยคุณกิจ. 2535. ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆ ของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสูตรอาหาร Zarrouk ต่อการเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ananyev G., Carrieri D. and Charles G.(2008).Optimization of Metabolic Capacity and Flux through Environmental Cues To Maximize Hydrogen Production by the Cyanobacterium "*Arthrospira(Spirulina)maxima*". Applied and environmental microbiology.7:6102-6113.
- Aoyama, K., Uemura, I., Miyake, J. and Asada, Y.(1997). Fermentation metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium *Spirulina platensis*. Fermentation and Bioengineering. 83:17-20.
- Becker, E. W.(1994). Microalgae Biotechnology and Microbiology.Cambrige University Press, Cambrige.
- Benemann, J. R.(2000). Hydrogen production by microalgae. J. Appl. Phycol. 12:291-300.
- Boichenko, VA., Satina, LY., Litvin, FF.(1989). Efficiency of hydrogen photoproduction by algae and cyanobacteria. Sov Plant Physiol. 36:188-95.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ใช้เฉพาะภายในเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chu, S.P.(1943). The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonicalgae.Part II. The influence of the concentration of inorganic nitrogen and phosphate phosphorus. *J.Ecol.* 31:109-148.
- Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C. and Costa, J.A.V.(2005). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour. Technol.* 98: 1489–1493.
- Costa, J.A.V., Cozza, K.I., Oliveria I. and Magagin, G.(2001). Different nitrogen source and growth response of *Spirulina platensis* microenvironments. *World J. Microbial. Biotechnol*, 17: 439–442.
- Datta, M., Nikki ,G. amd Shah, V.(2000). Cyanobacterial hydrogen production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 16:8-9 .
- Denesi E.D.G., Rangel-Yagui C., De O., Carvalho, J.C.M. and Sato, S.(2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*.*Biomass Bioenergy.* 23:261-269.
- Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S. and Bhattacharya, S.K.(2005). Hydrogen production by cyanobacteria. *Microbial Cell Factories Rev.* 4:36.
- Fay, P.(1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol Rev.* 19:139-185.
- Gaffron, H. and Rubin, J.(1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J. Gen. Physiol.* 26:219–240.
- Gantar, M., Obreht , Z. and Dalmacija, B.(1991). Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 36: 167–171.
- Howarth, DC., Codd, GA.(1985). The uptake and production of molecular-hydrogen by unicellular cyanobacteria. *J Gen Microbiol.* 131:1561–9.
- Jongkon, P., Siripen, T. and Richard, D.L. (2008). The optimum N: P ratio of kitchen wastewater and oil-extracted fermented soybean water for cultivation of *Spirulina platensis* : pigment content and biomass production. *Int. J. Agric. Biol.* 10: 437–441.
- Kebede, E. and Ahlgren G.(1996). Optimum growth conditions and light utilization efficiency of *Spirulina platensis* (equals *Arthrospira fusiformis*) (Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. *Hydrobiologia.* 332:99–109.

- Lambert, G.R., Daday, A. and Smith, G.D. (1979). Hydrogen evolution from immobilized cultures of cyanobacterium *Anabaena cylindrical* I. *FEBS letters*. 101:125-128.
- Llama, M. J., Serra, J. L., Rao, K. K. and Hall, D. O. (1979). Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*. *FEBS Lett*. 98:342-346.
- Lodhi, MAK. (1987). Hydrogen production from renewable sources of energy. *Int J Hydrogen Energy*. 12:461-8.
- Meek, J. and Castenholz, W. (1974). Growth and photosynthesis in an extreme thermophile *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Archives of Microbiology*. 78:25-41.
- Papen, H., T. Kentemich, T. Schmülling, and H. Bothe. (1986). Hydrogenase activities in cyanobacteria. *Biochimie*. 68:121-132.
- Phang, S.M., Miah, M.S., Yeoh, B.G. and Haxhim, M.A. (2000). *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. *J. Appl. Phycol*. 12: 395-400.
- Rao, K. and Hall, O. (1996). Hydrogen production by cyanobacteria: potential, problems and prospects. *Journal of marine Biotechnology*. 4:10-15.
- Serebryakova, L.T., Zorin, N.A. and Gogotov, I.N. (1992). The hydrogenase activity in filamentous cyanobacteria. *Microbiology (Moscow)* 61, 175-182.
- Seshadri C.V., Thomas S., Manoharan R., Jeeji N. and Raja, G. (1980). Mono graph series on : Engineering of photosynthetic systems.
- Ungsethaphand, T., Peerapornpisal, Y. and Whangchai, N. (2009). Production of *Spirulina platensis* using dry chicken manure supplemented with urea and sodium bicarbonate. *Maejo Int. J. Sci. Technol*. 3: 379-387.
- Yu, J. and Takahashi, P. (2007). Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae.

[Online]. Available : <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria>

[Online]. Available : <http://www.elearning.srp.ac.th>

[Online]. Available : <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/photosynthesis/chapter21.htm>

[Online]. Available : <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/photosynthesis/chapter21.htm>

[Online]. Available : http://www.ostc.thaiembdc.org/news_us/Feb52_12.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG 11

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1,000

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอล (II) ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG 11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1.76	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดโซเดียมอีดีทีเอ (Na_2EDTA)	279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix 1,000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 เท่า		

ส่วนประกอบอาหาร BG 11

อาหาร BG 11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	1	มิลลิลิตร
(2 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร)		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	มิลลิลิตร
(3.05 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร)		
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4 \cdot Citrate$)	1	มิลลิลิตร
(0.60 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร)		
(ปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 1,000 มิลลิลิตร)		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ห้อยค์ประกอบของน้ำทิ้ง

1. ปริมาณของแข็ง

1.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมด

1. นำจานระเหยไปอบในเตาอบจนมีน้ำหนักคงที่ (ใช้อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) จากนั้นนำมาทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักของจานระเหยแต่ละใบ

2. เติมปริมาตรน้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตรลงในจานระเหยที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน(ทำ 3 ซ้ำ)

3. นำซามระเหยที่มีตัวอย่างน้ำไปตั้งบนเครื่องอ้งน้ำจนกระทั่งน้ำระเหยหมดจากนั้นนำจานระเหยไปอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียสจนแห้งและมีน้ำหนักคงที่ ทำให้จานระเหยเย็นในเดซิเคเตอร์

4. ชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือน้ำหนักของของแข็งทั้งหมด นำไปคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (มก./ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (มก.)} \times 1000}{\text{มล.ของตัวอย่างน้ำ}}$$

1.2 ปริมาณของแข็งแขวนลอย

1. อบกระดาษกรองใยแก้วในเตาอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้นชั่งหาน้ำหนักของกระดาษกรอง

2. เทตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองที่วางอยู่บนกรวยแก้วที่ต่อกับเครื่องดูดอากาศ เปิดเครื่องดูดอากาศ

3. เมื่อกรองเสร็จ ใช้ปากคีบจับกระดาษกรองใส่ภาชนะทนความร้อนนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนกว่ากระดาษกรองจะแห้ง (ประมาณ 2 ชั่วโมง)

4. นำมาทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้นชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้นและคำนวณหาปริมาณของแข็งแขวนลอยตามสูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณของแข็งแขวนลอย (มก./ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (มก.)} \times 1000}{\text{มล.ของตัวอย่างน้ำ}}$$

1.3 ปริมาณของแข็งละลายน้ำ

1. ชั่งจานระเหยที่อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงและทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

2. นำตัวอย่างที่ได้จากการกรองของแข็งแขวนลอยออก (จากข้อ 1.2) ใส่ลงในจานระเหยจากนั้นนำไปตั้งบนเครื่องอ้งน้ำจนกระทั่งแห้ง

3. นำจานระเหยไปอบในเตาอบอุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนแห้งและมีน้ำหนักคงที่แล้วนำไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

4. ชั่งน้ำหนักจานระเหยที่เพิ่มขึ้นและคำนวณหาปริมาณของแข็งแขวนลอยตามสูตร ดังนี้

$$\frac{\text{ปริมาณของแข็งละลายน้ำ}}{\text{(มก./ลิตร)}} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (มก.)} \times 1000}{\text{มล.ของตัวอย่างน้ำ}}$$

2. ซีโอดี (COD)

1. ชั่งเมอร์คิวรัสซัลเฟต (HgSO_4) 0.4 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม

2. เติมตัวอย่างน้ำ 20 มิลลิลิตร ลงไปในขวดก้นกลม

3. เติมสารละลายมาตรฐาน โพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 30 มิลลิลิตร

4. เขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันดี นำขวดต่อเข้ากับเครื่องควมแน่นกลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังที่ไว้ให้เย็น ล้างเครื่องควมแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะถอดเครื่อง

5. เติมน้ำกลั่นลงในขวดก้นกลมจนปริมาตรครบ 150 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ (2-3 หยด) จนกระทั่งสีของส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

7. ทำแบลนด์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำและทำเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทุกประการ

การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มก./ลิตร)} = \frac{(A-B) \times C \times 8000}{\text{มล.ของตัวอย่างน้ำ}}$$

เมื่อ A = มล.ของสารละลายเฟอร์รัสแอม โมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับแบลงค์

B = มล.ของสารละลายเฟอร์รัสแอม โมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ

C = โมลาริตี (M) ของสารละลายเฟอร์รัสแอม โมเนียมซัลเฟต

3. บีโอดี (BOD)

ก. การเตรียมตัวอย่างน้ำที่จะหาค่าบีโอดี

1.ทำการเลือกช่วงตัวอย่างของน้ำที่เหมาะสม จากนั้นนำไปทำการเจือจางแล้วเติมลงในขวดบีโอดี (ซึ่งจะทำทั้งหมด 3 ขวด)

2.นำขวดบีโอดี 1 ขวด ไปหาค่าออกซิเจนละลาย (DO) เพื่อต้องการหาค่าออกซิเจนละลายเริ่มต้น (D_1)

3.นำขวดบีโอดีที่เหลือไปบ่มในตู้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำ ออกมาหาค่าออกซิเจนละลายที่เหลือ (D_2)

ข. การหาค่าออกซิเจนละลาย (DO) โดยวิธี Iodometric method

1.เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายอัคราไล-ไอโอดี-เอไซด์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไปในขวดบีโอดี

2.จับขวดคว่ำขึ้นลง 15 ครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนที่เกิดขึ้นตกจนมีปริมาณน้ำใสครึ่งขวด เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร

3.นำสารละลายในขวดบีโอดี 201 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไทโอซัลเฟต โดยใช้ น้ำแข็งเป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณ

$$\text{บีโอดี (มก./ลิตร)} = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

เมื่อ D_1 = ออกซิเจนละลายของตัวอย่างที่เจือจางแล้วเป็นเวลา 15 นาทีของวันที่ 0

D_2 = ออกซิเจนละลายที่ทำการเจือจางแล้วและบ่มเป็นเวลา 5 วัน

P = อัตราส่วนของตัวอย่างที่ใช้ต่อตัวอย่างที่เจือจางแล้ว