การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora sp.* CU2551 ในอาหาร N8

HYDROGEN PRODUCTION OF GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551 IN N8 MEDIUM

นางสาวบงกช บุญกำจัด

นางสาวระพีพรรณ ทองปลิว

นางสาววิสสุตา สุวรรณรุ่งเรือง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HYDROGEN PRODUCTION OF

GREEN ALGA *Tetraspora* sp. CU2551 IN N8 MEDIUM

MISS BONGKOCH BOONGAMJUD

MISS RAPEEPAN THONGPIU

MISS VISSUTA SUWANRUNGRUENG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร N8

Hydrogen Production of Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551 in N8 Medium

ชื่อนักศึกษา นางสาวบงกช บุญกำจัด รหัสนักศึกษา 55050945

นางสาวระพีพรรณ ทองปลิว รหัสนักศึกษา 55050980

นางสาววิสสุตา สุวรรณรุ่งเรือง รหัสนักศึกษา 55050999

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ ประธานกรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร N8		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวบงกช	บุญกำจัด	รหัสนักศึกษา 55050945
	นางสาวระพีพรรณ	ทองปลิว	รหัสนักศึกษา 55050980
	นางสาววิสสุตา	สุวรรณรุ่งเรือง	รหัสนักศึกษา 55050999
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม		
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์		

บทคัดย่อ

ก๊าซไฮโดรเจนเป็นหนึ่งในพลังงานทางเลือกที่สะอาด เหมาะสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูงในการเผาไหม้เนื่องจากให้พลังงานสูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงจากน้ำมันในปริมาณที่เท่ากัน ก๊าซไฮโดรเจนจึงได้รับการคาดหมายและยอมรับว่าจะเป็นแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงที่สำคัญอย่างมากในอนาคต สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้รับการแสดงลักษณะมาก่อนหน้านี้ว่ามีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรจนผ่านการทำงานของเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนส ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการดูความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Tetraspora* sp. CU2551 ในระบบอาหาร N8 ที่ขาดแร่ธาตุต่างๆ ได้ทำการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย พบว่า *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดในอาหาร N8 และN8-S ในช่วงเวลา 29 วัน ส่วนอาหารN8-P และ N8-P-S จะมีการเติบโตเป็นครึ่งหนึ่งของสองอาหารแรก ส่วนที่เหลือ ไม่พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เลย การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนนั้นทำได้โดยการเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำการย้ายเซลล์ลงสู่อาหาร N8 ที่มีการขาดแร่ธาตุต่างๆ พบว่าเซลล์ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจน แต่ในสภาวะขาดออกซิเจน เซลล์จะมีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในอาหาร N8-N-P-S คิดเป็น 377.59 nmol/mg dry weight/hr รองลงมาคือ N8-N-P, N8-N, N8-P-S และ N8-P คิดเป็น 173.77 , 54.80 , 6.46 , 5.19 nmol/mg dry weight/hr ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงโอกาสที่จะเพิ่มความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 โดยการใช้อาหาร N8

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Hydrogen Production of Green Alga *Tetraspora* sp. CU2551 in N8 Medium	
Students	Miss Bongkoch Boongumjud	Student ID 55050945
	Miss Rapeepan Thongpiu	Student ID 55050980
	Miss Vissuta Suwanrungrueng	Student ID 55050999
Degree	Bachelor of Science Environmental Chemistry	
Department	Chemistry	
Academic Year	2015	
Advisor	Dr.Cherdsak Maneeruttanarungroj	

Abstract

Hydrogen is one of clean renewable energy source that suitable for the use as the efficient fuel in combustion due to its high energy capacity and the environmental friendly when compared to other fuel, oil, in the same amount. Hydrogen is also expected and accepted to be a good energy source in the future. Green alga *Tetraspora* sp. CU2551 was previously identified and characterized for hydrogen production capacity through the catalysis of hydrogenase enzyme. This study focuses on the hydrogen production of *Tetraspora* sp. CU2551 in N8 medium with nutrients deprivation. The alga showed the maximum growth rate in N8 and N8-S over the time period of 29 days, while the half growth rate was observed in N8-P and N8-P-S where as the rest were found no growth. The successive hydrogen production was obtained by culturing the cell in TAP medium for 24 hr followed by transferring cell to N8 system with nutrients deprivation. The results showed that hydrogen production could not be observed under oxygenic conditions. The maximum production rate was observed in N8-N-P-S under anaerobic condition representing 377.59 nmol/mg dry weight/hr followed by N8-N-P, N8-N, N8-P-S and N8-P representing 173.77, 54.80, 6.46, 5.19 nmol/mg dry weight/hr, respectively. This study shows the opportunity and the possibility in hydrogen production from green alga *Tetraspora* sp. CU2551 using N8 medium.

Keywords : hydrogen production , green algae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำแนะนำให้คำปรึกษาและเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความร่วมมือในการอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำโครงงานพิเศษ

น.ส.บงกช บุญกำจัด

น.ส.ระพีพรรณ ทองปลิว

น.ส.วิสสุตา สุวรรณรุ่งเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญรูป ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย/ปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 สาหร่าย 3

2.1.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย 4

2.1.2 สาหร่ายสีเขียว 5

2.1.2.1 ลักษณะทั่วไป 5

2.1.2.2 การจำแนกหมวดหมู่ของสาหร่ายสีเขียว 5

2.1.3 สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp.CU2551 6

2.1.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.1.3.1.1 อุณหภูมิ 7

2.1.3.1.2 ผลของปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต และการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 7

2.1.3.1.3 ผลของปริมาณของแหล่งซัลเฟอร์ต่อการเจริญเติบโต และการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 8

2.1.3.1.4 ผลของปริมาณของแหล่งฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโต และการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 8

2.2 ไฮโดรเจน 8

2.2.1 การผลิตไฮโดรเจน 10

2.2.1.1 Steam Reforming 10

2.2.1.2 Electrolysis of water 11

2.2.1.3 Partial Oxidation 12

2.2.1.4 Biological Process 12

2.2.1.4.1 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (direct biophotolysis) 12

2.2.1.4.2 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis) 13

2.2.1.4.3 กระบวนการหมักแบบใช้แสง (photofermentation) 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.1.4.4 กระบวนการแบบไม่ใช้แสง (non light-drivenprocess) 15

2.2.1.4.5 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำเป็นก๊าซด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological water-gas shift reaction) ... 16

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 18

3.1 สาหร่าย 18

3.2 สารเคมี 18

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย 18

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8 18

3.2.3 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N 19

3.2.4 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-P 20

3.2.5 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-S 21

3.2.6 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-P 21

3.2.7 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-S 22

3.2.8 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-P-S 23

3.2.9 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-P-S 23

3.2.10 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP (Tris-Acetate-Phosphate medium) 24

3.2.11 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.12 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน 25

3.3 อุปกรณ์ 25

3.4 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, N8-N-P-S และ Tris Acetate Phosphate (TAP) 27

3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 28

3.6 วิธีวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S 29

3.7 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 30

3.7.1 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S 30

3.7.2 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8 ในอายุเซลล์ที่ต่างกัน 33

3.7.3 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลวN8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P,N8-P-S,N8-N-S และ N8-N-P-S 34

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 36

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S 42

4.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8 ในอายุเซลล์ที่ต่างกัน 43

4.4 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S 44

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 47

5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S 47

5.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S 47

5.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8 ในอายุเซลล์ที่ต่างกัน 48

5.4 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S 48

5.5 ข้อเสนอแนะ 49

เอกสารอ้างอิง 50

ภาคผนวก 51

ภาคผนวก ก 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ข 53

ภาคผนวก ค 59

ภาคผนวก ง 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph- Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)] 32

4.1 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 39

4.2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และ ประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย 4

2.2 อัตราการผลิตของเซลล์ในการบ่มในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 7

2.3 กระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า (Electrolysis) 11

2.4 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง 13

2.5 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม 14

2.6 การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง 15

2.7 การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง 15

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 27

3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ภายในตู้บ่ม 28

3.3 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลวต่างๆ 29

3.4 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลว N8 30

3.5 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลว N8-P 31

3.6 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลว N8-S 31

3.7 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลว N8-P-S 31

3.8 ขวดแก้วตัวอย่างเซลล์พ่นก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 % เป็นเวลา 5 นาที 32

3.9 เตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว N8 เพาะเลี้ยงให้มีอายุเซลล์ที่ต่างกัน 33

3.10 เตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 34

3.11เตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S 37

4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S วันที่ 1 38

4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S วันที่ 15 38

4.4 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S วันที่ 29 38

4.5 การพ่นก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 % เข้าไปในขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) เพื่อไล่ออกซิเจนภายในให้หมด 43

4.6 ขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เตรียมวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยเครื่อง GC-TCD 44

4.7 การผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S 46

ค 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD 59

ค 2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4% ในอาร์กอนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันพลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในการตอบสนองความต้องการขั้นพื้นฐาน ของประชากรโลกและเป็นปัจจัยพื้นฐานการผลิตในภาคธุรกิจและภาคอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงต้องมีการจัดหาพลังงานให้มีปริมาณที่เพียงพอและมีคุณภาพที่ดี สอดคล้องกับความต้องการของผู้ใช้ เพื่อให้สามารถตอบสนองความต้องการขั้นพื้นฐานของประชาชน และสามารถตอบสนองความต้องการใช้ ในกิจกรรมการผลิตต่างๆ ได้อย่างเพียงพอ เนื่องจากทุกๆ ปีความต้องการใช้พลังงานของโลกมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทั้งในภาคอุตสาหกรรม ภาคการขนส่ง ภาคเศรษฐกิจ สังคม รวมถึงการใช้งานในชีวิตประจำวันก็เพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก พลังงานที่หล่อเลี้ยงกิจกรรมของ มนุษย์ในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยเฉพาะถ่านหินและน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งเป็นทรัพยากรสิ้นเปลือง ที่กำลังร่อยหรอลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้น การเผาผลาญเชื้อเพลิงฟอสซิลในอัตรามหาศาลยังนำมาซึ่งผลกระทบใหญ่หลวงต่อระบบนิเวศของโลกและความเป็นอยู่ของผู้คน โดยเฉพาะการทำลายโอโซนบนชั้นบรรยากาศ ให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจกและภาวะโลกร้อน ดังนั้นการหาพลังงานทางเลือกแหล่งใหม่เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนจะสามารถช่วยบรรเทาปัญหานี้ได้ เนื่องจากว่าพลังงานที่ใช้อยู่ในปัจจุบันกำลังจะหมดไปในอนาคตอันใกล้นี้หรือเพราะมีมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมมากจนเกินไป และนำมาซึ่งภาวะปัญหาโลกร้อน

พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนถือได้ว่าเป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากให้พลังงานสูง ต้นทุนต่ำ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงจากน้ำมันในปริมาณที่เท่ากัน ก๊าซไฮโดรเจนจึงได้รับการคาดหมายและยอมรับว่าจะเป็นแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงที่สำคัญอย่างมากในอนาคต

จากการค้นคว้าพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน พบว่า สาหร่ายกำลังได้รับความนิยมจากนักวิจัย เพราะสาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูง แบ่งตัวได้เร็ว สามารถเลี้ยงในพื้นที่น้อยได้ จึงเป็นสิ่งที่ดึงดูดกลุ่มนักวิจัย และยังได้รับการสนับสนุนทางด้านการเงินจากหน่วยงานพลังงานทดแทนอย่างแพร่หลายและด้วยข้อจำกัดด้านสิ่งแวดล้อมของเทคโนโลยีการผลิตไฮโดรเจนที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนด้วยกรรมวิธีใหม่ โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพ เพราะในวงการชีววิทยามีองค์ความรู้ที่ทราบกันมานานแล้วว่า มีสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติหลายชนิดที่สามารถผลิตและคายก๊าซไฮโดรเจนระหว่างการเจริญ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสาหร่ายขนาดเล็ก (micro-algae) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และแบคทีเรียบางกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายที่เลือกใช้ศึกษา คือ สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งได้รับการแสดงลักษณะว่าสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม ด้วยการควบคุมอุณหภูมิและความเข้มแสงให้เหมาะสม อย่างไรก็ตามการขาดแร่ธาตุบางอย่างในอาหารอาจจะส่งผลต่อความสามารถในการผลิตก๊าซ ดังนั้นในการทดลองจึงอยากทราบผลของแร่ธาตุต่างๆที่จะส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอาหาร N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (โดยที่อาหารปกติเราจะเรียกว่า N8 หากขาดแหล่งไนโตรเจน จะเรียกว่า N8-N นอกจากนั้นแล้วยังมีแหล่งฟอสฟอรัส (-P) และแหล่งซัลเฟอร์ (-S))

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของแหล่งอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนในอากาศต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. วัดอัตราการเติบโตของสาหร่ายในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S

2. วัดความสามารถของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สภาวะใหม่ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่นอกเหนือจากระบบเดิม

2. ได้ทราบผลของแร่ธาตุต่างๆที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย

สาหร่าย(algae) เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะร่วมกัน คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง มีความหลากหลายของสัณฐานวิทยา (morphology) สูง ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว หรือหลายเซลล์ มีขนาดตั้งแต่เล็กมากจนมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ขนาดพิโค (pico = 10-12 เมตร) เช่นพิโคแพลงก์ตอน (picoplankton) จนถึงขนาดใหญ่ มีความยาวหลายสิบเมตร เช่น วัชพืชทะเล (seaweed) ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายพืช สาหร่ายบางกลุ่มมีโครงสร้างเซลล์คล้ายแบคทีเรียและบางกลุ่มที่เคลื่อนที่ด้วยแส้ (flagellum) ก็มีลักษณะคล้ายสัตว์ สามารถแบ่งได้เป็น 9 กลุ่ม โดยกลุ่มที่มีลักษณะคล้ายพืช ได้แก่ ส่วนใหญ่ของสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) สาหร่ายไฟ (Charophyta) สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) สาหร่ายสีน้ำตาลแกมทอง (Chrysophyta) และสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) กลุ่มที่มีลักษณะโครงสร้างเซลล์คล้ายแบคทีเรีย ได้แก่ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (Cyanophyta หรือไซยาโนแบคทีเรีย, cyanobacteria) กลุ่มที่มีลักษณะคล้ายสัตว์จะมีแส้เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ บางส่วนของสาหร่ายสีเขียวยูกลีนอยด์ (Euglenophyta) ไดโนแฟลกเจลเลต (Dinophyta) และคริปโตโมแนด (Cryptophyta) บุคคลทั่วไปรู้จักสาหร่ายเหล่านี้ในชื่อ “ตะไคร่” (บนบก) “ตะไคร่น้ำ” หรือ “ขี้แดด” (ในน้ำจืด) และในน้ำทะเลในชื่อ“น้ำแดง” “ขี้ปลาวาฬ” (red tide) หรือวัชพืชทะเล (sea weed)

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญยิ่งในการรักษาสมดุลต่างๆ ในสภาพแวดล้อมของโลก กว่า 3.5พันล้านปีมาแล้วที่สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเกิดขึ้นมาบนโลกพร้อมกับการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์แล้วปลดปล่อยออกซิเจนให้กับโลกซึ่งเป็นจุดก่อให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ รวมทั้งมนุษยชาติตามมาในที่สุด นอกจากเป็นผู้สร้าง “ลมหายใจ” แล้ว สาหร่ายยังมีบทบาทสำคัญในวัฏจักรของธาตุต่างๆ เช่น คาร์บอน (กว่าร้อยละ 40 ของคาร์บอนในโลกนี้ถูกตรึงด้วยกระบวนการสังเคราะห์ ด้วยแสงโดยสาหร่าย) รวมถึงไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และแร่ธาตุต่างๆ อีกมาก

นอกจากนี้สาหร่ายยังมีบทบาทสำคัญยิ่งในกระบวนการ “ฟื้นฟูสภาพด้วยตนเอง” (self restoration) ของแหล่งน้ำ โดยทำการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (รวมทั้งตรึงไนโตรเจน โดยสาหร่ายบางกลุ่ม) และดูดซับสารอาหารต่างๆ ที่ถูกชะล้างลงสู่แหล่งน้ำมาใช้ในการสร้างเซลล์ซึ่ง เป็นอาหารของสัตว์น้ำอื่นๆ ในระบบของห่วงโซ่อาหารตามลำดับชั้นอันสมดุล สาหร่ายจึงนับเป็น “ผู้ผลิตเบื้องต้น” (primary producer) ของห่วงโซ่อาหาร การสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายเป็นการเพิ่มออกซิเจนละลายน้ำซึ่งเป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่จะนำออกซิเจนไปใช้ใน กระบวนการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

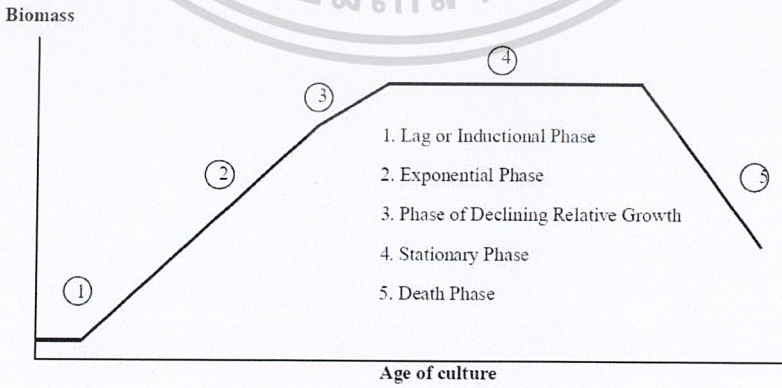
สลายสารต่างๆ โดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ “สาหร่าย” จึงเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญต่อ ชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์ ทั้งในแง่ผู้ให้ลมหายใจ น้ำสะอาด และอาหาร

นอกจากหน้าที่และการบริการด้านนิเวศวิทยา (ecological function and ecological service) แล้ว สาหร่ายยังมีศักยภาพการใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ อีกมาก ได้แก่ ด้านการเกษตร เช่น ปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) วัสดุปรับปรุงดิน (soil conditioner) อาหารสัตว์ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (ส่งเสริม/ยับยั้ง) สารควบคุมศัตรูพืช (pesticides) ด้านสุขภาพและความงาม เช่น อาหารเสริมสุขภาพจากสาหร่ายชนิดต่างๆ (Spirulina Chlorella Dunaliella และ Haematococcus) ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว และเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ เช่น สารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ด้านพลังงาน เช่น น้ำมันเชื้อเพลิงและน้ำมันหล่อลื่น และด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การบำบัดน้ำเสีย และการลดโลกร้อนโดยการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว และเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ เช่น สารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ด้านพลังงาน เช่น น้ำมันเชื้อเพลิงและน้ำมันหล่อลื่น และด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การบำบัดน้ำเสียและการลดโลกร้อนโดยการตรึง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

2.1.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

การเจริญเติบโตของสาหร่ายมีลักษณะกราฟโค้งรูปตัว “ S ” (sigmoid curve) ซึ่งเรียกว่าเส้นโค้งการเติบโต (growth curve) โดยเส้นกราฟหรือเส้นโค้งการเจริญเติบโตแบ่งออกได้ 5 ระยะ คือ

1. ระยะปรับตัว (Lag phase or inductional phase)
2. ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential phase)
3. ระยะเฉื่อย (Retardation phase or phase of declining relative growth)
4. ระยะคงที่ (Stationary phase)
5. ระยะตาย (Death phase)



รูปที่ 2.1 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย (ที่มา: ลัดดา, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 สาหร่ายสีเขียว

2.1.2.1 ลักษณะทั่วไป

คลอโรพลาสต์ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b สารสีประกอบได้แก่ carotene (เบต้า-แคโรธีน) ส่วน xanthophyll ได้แก่ lutein, diatoxanthin และ neoxanthin สารสีรวมอยู่ใน คลอโรพลาสต์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีมากกว่า 1 อัน สาหร่ายสีเขียวมีหรือไม่มีผนังเซลล์ ถ้าไม่มีก็จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ pellicle, periplast หรือเป็นแบบ scale หนวด (flagella) มีจำนวน 1, 2, 4, 8, 16 เส้น ลักษณะของหนวดมีหลายแบบเช่นแบบ acronematic, pantonematic หรือแบบมีเกล็ดอยู่บนหนวด จุดตั้งต้นของหนวดอยู่ที่ apical cell หรือ subapical cell ความยาวอาจเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้ อาหารสะสม (starch) ได้แก่ true starch หรือ paramylon (แป้งที่พบในพืชชั้นสูง) อยู่ในไซโตพลาส์ซึมหรือคลอโรพลาสต์ รูปร่าง (form) ของเซลล์มีหลายแบบ เช่น กลม รี กระสวย อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โคโลนี บาง ชนิดเป็นเส้นสาย filament บางกลุ่มมี gullet อยู่ที่ด้านบนสุดของเซลล์ เช่น Euglenoids

2.1.2.2 การจำแนกหมวดหมู่ของสาหร่ายสีเขียว

Christensen (1962, 1966) จำแนกหมวดหมู่ของสาหร่ายสีเขียว ตามรูปร่างลักษณะของเซลล์ ได้ 3 Class ได้แก่ Class Chlorophyceae, Class Prasinophyceae และ Class Euglenophyceae

1) Class Chlorophyceae สาหร่ายสีเขียว (green algae)

การจำแนกหมวดหมู่ Prescott (1962) แบ่งออกเป็น 6 Order ดังนี้

1. Order Volvocales
2. Order Tetrasporales
3. Order Chlorococcales
4. Order Ulotrichales
5. Order Oedogoniales
6. Order Zygnematales

2) Class Prasinophyceae หรือเรียกว่า “Prasinophytes”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสาหร่ายที่มีหนวดมีขนาดเล็กมาก 1-50 ไมโครเมตร เดิมรวมอยู่ใน Order Volvocales, Class Chlorophyceae แต่มีผู้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน จึงพบความแตกต่างจึงแยกออกมาจัดตั้งเป็นคลาสใหม่คือ Class Prasinophyceae ซึ่งมีความแตกต่างคือ เซลล์และหนวดมีเกล็ดหุ้ม แต่มีขนาดเล็กมากและอัดกันแน่น

3) Class Euglenophyceae ยูกลีนอย์ (euglenoids)

ยูกลีนอย์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ว่ายน้ำเป็นอิสระมีชื่อสามัญคือ euglenoids เซลล์มีสีเขียวสดบางชนิดไม่มีสีจัดเป็นพวก saprophytic และ holozoic form (กินสิ่งเน่าเปื่อยหรือตะกอนเป็นอาหาร) พบทั่วไปในน้ำจืด ทำให้เกิดการบลูมของน้ำได้

การจำแนกหมวดหมู่

Class Euglenophyceae ประกอบด้วย 5 Order ได้แก่

1. Order Eutreptiales
2. Order Euglenales
3. Order Rhabdomonadales
4. Order Sphenomonadales
5. Order Hetronematales

2.1.3 สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp.CU2551

Tetraspora sp. CU2551 จัดอยู่ใน

Domain Eukaryota

Kingdom Viridiplantae

Phylum Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Tetrasporales

Family Tetrasporaceae

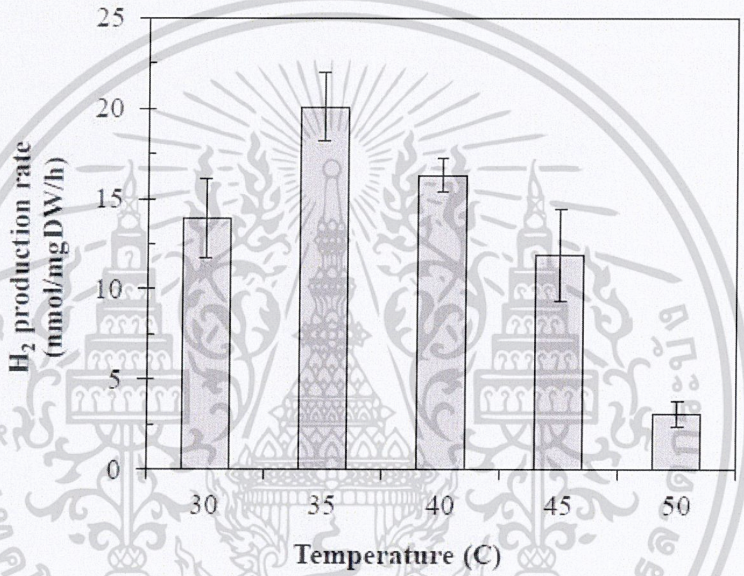
Genus Tetraspora

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.1ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

2.1.3.1.1 อุณหภูมิ

การเพาะเลี้ยงได้รับการทดสอบสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ขวดก๊าซถูกบ่มในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน รูปที่ 2.2 แสดงให้เห็นถึงอัตราการผลิตเมื่อบ่มเซลล์ในแต่ละอุณหภูมิ สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 แสดงให้เห็นถึงอุณหภูมิที่เหมาะสม 35° C สำหรับการผลิต ไฮโดรเจน



รูปที่ 2.2 อัตราการผลิตของเซลล์ในการบ่มในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (ที่มา: เชิดศักดิ์, 2554)

2.1.3.1.2 ผลของปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

แหล่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณและมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนส่วนมากมาจากไนเตรท แอมโมเนีย หรือยูเรีย ไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในสาหร่าย เป็นองค์ประกอบของโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำงานภายในเซลล์ของสาหร่าย จากรายงานวิจัยพบว่า การขาดไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น แต่การเจริญเติบโตลดลง

2.1.3.1.3 ผลของปริมาณของแหล่งซัลเฟอร์ต่อการเจริญเติบโตและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารหลักอีกชนิดหนึ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ยังมีความสำคัญสำหรับการสร้างโปรตีนในเซลล์ โดยเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซีสเทอีนและเมทไทโอนีน ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ที่เป็นเกลือของโลหะ ได้แก่ ซัลเฟต ซัลไฟท์และซัลไฟด์ การขาดซัลเฟอร์ จะช่วยในการลดการทำงานของระบบแสงที่สอง ทำให้เกิดการผลิตออกซิเจนลดลง จึงไม่มีออกซิเจนมากพอที่จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ สาหร่ายจะมีการสะสมแป้งตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยทำให้มีการหายใจลดลงและผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณมากขึ้น

2.1.3.1.4 ผลของปริมาณของแหล่งฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและ

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์สาหร่าย มันแสดงให้เห็นว่าฟอสฟอรัสแทนที่ไนโตรเจนได้เป็นสารอาหารหลักสำหรับสาหร่ายในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติมากมาย ผลกระทบทันทีจากการขาดฟอสฟอรัสประกอบด้วยการลดลงของการสังเคราะห์และการเกิดใหม่ของสารตั้งต้นในวัฏจักรคาลวิน-เบนสันและผลที่ตามมาคือการลดลงของอัตราความต้องการการใช้แสงสำหรับการตรึงคาร์บอน

คล้ายกับผลกระทบของการขาดไนโตรเจน ความอดอยากฟอสฟอรัสจะลดคลอโรฟิลล์ เอ และโปรตีนดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเซลล์สาหร่าย การขาดฟอสเฟตแสดงให้เห็นถึงผลในการสะสมของ astaxanthin และลดการเจริญเติบโตโดยรวมในเซลล์ การลดลงของ phycobilisome ภายใต้เงื่อนไขของการขาดฟอสฟอรัส เนื่องจากการแบ่งเซลล์และการหยุดการสังเคราะห์ phycobilisomes ดังที่ได้แสดงให้เห็น Theodorou *et al.* ตั้งข้อสังเกตว่า การอดอาหารฟอสฟอรัสใน *Selenastrum minutum* จะไปลดอัตราการหายใจ

2.2 ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด เมื่อเผาไหม้จะได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่จะนำไปสู่การลดมลพิษทางอากาศ ไฮโดรเจนมีค่าความหนาแน่นของพลังงานสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกรัม ปัจจุบันมีการใช้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงอย่างแพร่หลายในประเทศอุตสาหกรรม โดยที่ไฮโดรเจนสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อผลิตไฟฟ้าผ่านเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) บริษัทผู้ประกอบการผลิตรถยนต์หลายบริษัท เช่น General Motors, BMW, Daimler-Chrysler,Volkswagen, Mazda, Honda และ Ford เป็นต้นได้พัฒนารถยนต์ต้นแบบที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิง(Reith et al., 2003) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงในการให้ความร้อนภายในบ้านและสำนักงานได้อีกด้วย

ถ้ามีการนำก๊าซไฮโดรเจน (H_2) มาใช้เป็นเชื้อเพลิงแทนจะสามารถลดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้ โดยข้อดีสามารถแบ่งออกเป็น 3 ด้านหลัก คือ

1) ด้านสิ่งแวดล้อม

ข้อดีของการใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานในด้านสิ่งแวดล้อม แยกออกเป็นข้อดีในระยะสั้นและข้อดีในระยะยาว ในระยะสั้นนั้นจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าเมื่อมีการเปลี่ยนเครื่องยนต์ของยานพาหนะจากระบบการเผาไหม้น้ำมันธรรมดามาเป็นการเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนนั้น จะสามารถลดการสร้างก๊าซพิษ เช่น CO, CO_2, NOx, VOCs, SOx, ก๊าซไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ และเขม่าควันเข้าสู่แหล่งชุมชนได้ (Johnston et al.,2005) (Adamson, 2004) (Scott, 2004) สำหรับผลในระยะยาวนั้น จะกล่าวถึงการลดสภาวะเรือนกระจกของโลกและลดการบางลงของชั้นโอโซน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้จัดว่าเป็นก๊าซสำคัญที่ทำให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวถึง 50% (และอีก 50% คือ ก๊าซมีเทน (CH_4) ก๊าซไนตรัส-ออกไซด์ (N_2O) ไฮโดรฟลูออโรคาร์บอน (HFCs) และเขม่าควันที่เหลือจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง) ทำให้การใช้และผลิตก๊าซไฮโดรเจนนี้ไม่เพิ่มภาวะการเกิดก๊าซเรือนกระจก (เมื่อมีการเลือกแหล่งให้ก๊าซไฮโดรเจนที่เหมาะสม เช่น น้ำ เป็นต้น)

2) ด้านสุขภาพ

มลภาวะทางอากาศที่เราเผชิญหน้าอยู่ในปัจจุบันนี้เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ อย่างรวดเร็วโดยไม่ได้คำนึงถึงของเสียที่ปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม เช่น ก๊าซพิษต่างๆ ล้วนแต่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพหรือเป็นสาเหตุของมะเร็งได้ หน่วยงานของประเทศสหรัฐอเมริกา The American Environmental Protection Agency (EPA) กล่าวว่า แหล่งที่สร้างสารพิษหลักออกมา คือ การเผาไหม้ของเครื่องยนต์ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมเป็นเชื้อเพลิง ทำให้เกิดก๊าซที่ก่อมลภาวะ เช่น benzene, formaldehyde, acetaldehyde, 1,3-butadiene และอนุภาคเขม่าอื่นๆ ขณะที่เมื่อใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงแล้วจะไม่มีก๊าซพิษและไม่มีสารก่อมะเร็งที่กล่าวมาดังข้างต้น

3) ด้านความแข็งแกร่งทางเศรษฐกิจ

หลังจากมีการรวมกลุ่มกันของประเทศผู้ผลิตน้ำมันเพื่อการส่งออกหรือกลุ่ม OPEC ในปี ค.ศ. 1973 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงอำนาจการต่อรองขององค์กรนี้ต่อสาธารณะประเทศ หลังจากเกิดวิกฤติน้ำมันขึ้น ประเทศผู้นำด้านอุตสาหกรรมได้เริ่มหาทางออกโดยการใช้แหล่งพลังงานอื่น เพื่อไม่ให้เศรษฐกิจของประเทศต้องขึ้นกับราคาน้ำมันเพียงอย่างเดียว แต่ก็ยังไม่สัมฤทธิ์ผล เช่น ประเทศใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม EU ได้นำเข้าน้ำมันดิบสูงถึง50% ของความต้องการพลังงานทั้งหมด ดังนั้นจึงทำให้เศรษฐกิจของประเทศต้องขึ้นกับประเทศ

2.2.1 การผลิตไฮโดรเจน

2.2.1.1 Steam Reforming

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเชิงพาณิชย์ที่นิยม คือ Steam reforming โดยมีสารตั้งต้นเป็นก๊าซธรรมชาติเอทานอลหมักจากวัสดุธรรมชาติ เป็นต้น ปัจจุบัน 95% ของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตหรือ 9,000,000 ตัน ผลิตในประเทศสหรัฐอเมริกาและใช้ก๊าซธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ หรือเรียกกระบวนการนี้เรียกว่า Steam Methane Reformation (SMR) เนื่องจากมีเทนเป็นส่วนประกอบหลักของก๊าซธรรมชาติ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่สำคัญคือ 1) นำก๊าซธรรมชาติทำปฏิกิริยา reforming กับไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงๆ (อาจจะมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งร่วมด้วย) เพื่อให้ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์(CO) และก๊าซไฮโดรเจน (ดังสมการที่ 3 และ 4 ในขั้นที่ 1) จากขั้นตอนที่ 1 จะเห็นว่ามี CO เกิดขึ้นร่วมด้วย ดังนั้นจะมีการนำไอน้ำเข้ามาทำปฏิกิริยากับ CO อีกครั้งเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ดังแสดงในขั้นที่ 2 ปฏิกิริยานี้เรียกว่า Water-Gas Shift reaction (WGS)

ขั้นที่ 1: $CH_4 + H_2O \rightleftharpoons CO + 3H_2$ $\Delta H_{298\,K} = 206$ kJ mol-1 สมการที่ (3)

$CH_4 + 2H_2O \rightleftharpoons CO_2 + 4H_2$ $\Delta H_{298\,K} = 165$ kJ mol-1 สมการที่ (4)

ขั้นที่ 2: $CO + H_2O \rightleftharpoons CO_2 + H_2$ $\Delta H_{298\,K} = -41$ kJ mol-1 สมการที่ (5)

ก๊าซไฮโดรเจนที่ใช้ในปัจจุบันนี้ทั่วโลกได้มาจากการผลิตโดยวิธีดังกล่าวเป็นหลัก ปฏิกิริยาทั้งหมดเป็นปฏิกิริยาที่ย้อนกลับได้และจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วยจากสมการเคมีแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 1 เป็นปฏิกิริยาแบบดูดความร้อน (endothermic) และความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาถูกควบคุมด้วยอิทธิพลทางเทอร์โมไดนามิกส์เพื่อให้ได้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสูงๆ ซึ่งจำเป็นต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง จากเหตุผลข้อนี้ทำให้ต้นทุนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงตามไปด้วย และเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สังเคราะห์ได้ สามารถทำได้โดย

1) คัดแยกก๊าซไฮโดรเจนหรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกระหว่างปฏิกิริยาดำเนินไป เพื่อเป็นการรบกวนสมดุลของปฏิกิริยา และ

2) ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสม อิทธิพลของชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาก็เป็นอีกตัวแปรที่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ดังนั้นงานวิจัยด้านการศึกษาและพัฒนาตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับ

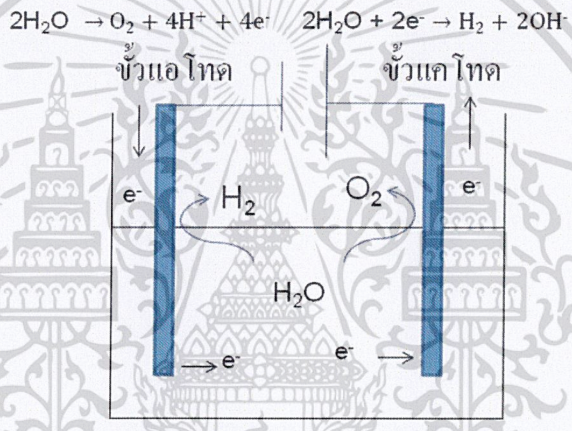
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบ Steam reforming reaction จึงกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

2.2.1.2 Electrolysis of water

เป็นกระบวนการทางไฟฟ้าเคมีโดยผ่านกระแสไฟฟ้าลงไปในน้ำ ซึ่งรู้จักกันดีในชื่อ ปฏิกิริยาการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า(Electrolysis reaction) กระแสไฟฟ้านี้จะทำให้เกิดการแตกตัวของไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอมออกจากกัน แล้วอะตอมชนิดที่เหมือนกันจะเกิดการรวมตัวกันให้ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจน ดังแสดงในสมการที่ (8) และภาพที่ 2

$$H_2O(l) + \text{Electricity} \longrightarrow H_2(g) + \tfrac{1}{2}O_2(g) \qquad \text{สมการที่ (8)}$$



รูปที่ 2.3 กระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า (Electrolysis) (ที่มา: รัชนีกร, 2011)

เมื่อพิจารณาการได้มาซึ่งก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีนี้กระแสไฟฟ้าที่ใช้ในปฏิกิริยาได้มาจากแหล่งพลังงานตั้งต้นอื่นถ้าจะนำก๊าซไฮโดรเจนนี้มาเป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยใช้เซลล์เชื้อเพลิง พบว่า ค่าพลังงานไฟฟ้าที่ได้นั้นยังไม่คุ้มค่ากับต้นทุนในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าดังกล่าว เพราะราคาต้นทุนเกือบทั้งหมดของกระบวนการนี้ขึ้นกับมูลค่าของพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสลายน้ำ ถึงแม้ว่าแหล่งให้ก๊าซไฮโดรเจนนี้จะใช้เพียงน้ำซึ่งมีมากในโลกก็ตาม กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำนี้จึงจำเป็นต้องได้รับการวิจัยและพัฒนาต่อไป เพื่อลดมูลค่าและต้นทุนในระหว่างการผลิต นอกจากนั้นต้องพิจารณาถึงแหล่งให้พลังงานไฟฟ้าเบื้องต้นด้วย ถ้ามาจากแหล่งที่ใช้แล้วหมดไป เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน หรือน้ำมันปิโตรเลียม ย่อมไม่เหมาะสม ควรจะเป็นแหล่งที่สามารถเกิดมาทดแทนใหม่ได้เร็ว เช่น พลังงานไฟฟ้าจาก ลม แสงอาทิตย์ หรือพลังน้ำ เป็นต้น จึงจะทำให้กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.3 Partial Oxidation

ปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วน หรือ Partial Oxidation เป็นเทคนิคที่เกิดขึ้นโดยจำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา บางครั้งเรียกว่า gasification ซึ่งกล่าวง่ายๆ ก็คือ เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ความร้อนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยทั่วไปแล้วสารตั้งต้นที่นิยมใช้มักเป็นสารประกอบทางอินทรีย์ เช่น ก๊าซมีเทน หรือเอทานอล เป็นต้น โดยทั่วไปปฏิกิริยานี้มักทำที่อุณหภูมิสูงกว่า700 °C ปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วนของก๊าซมีเทน ทำให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาแบบคายความร้อนปานกลาง และให้ $H_2/CO \approx 2$ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Fischer-Tropschsynthesis หรือกระบวนการ Syn gas แต่เมื่อพิจารณาในกรณีการให้ก๊าซไฮโดรเจนนั้นยังไม่มีประสิทธิภาพเท่ากับปฏิกิริยาSteam Reforming reaction สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วนทำให้ได้ CO และ H_2 ดังสมการที่ (6) และสมการแสดงปฏิกิริยาออกซิเดชันสมบูรณ์หรือ full combustion ทำให้ได้CO_2 และ H_2O ดังสมการที่ (7) ตัวแปรที่ควบคุมว่าปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นแบบออกซิเดชันบางส่วนหรือออกซิเดชันสมบูรณ์คือปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่เข้าทำปฏิกิริยานั่นเอง

$$CH_4 + 1/2O_2 \longleftarrow CO + 2H_2 \quad \Delta H_{298K} = -36 \text{ kJ mol-1} \qquad \text{สมการที่ (6)}$$

$$CH_4 + 2O_2 \longleftarrow CO_2 + 2H_2O \quad \Delta H_{298K} = -890 \text{ kJ mol-1} \qquad \text{สมการที่ (7)}$$

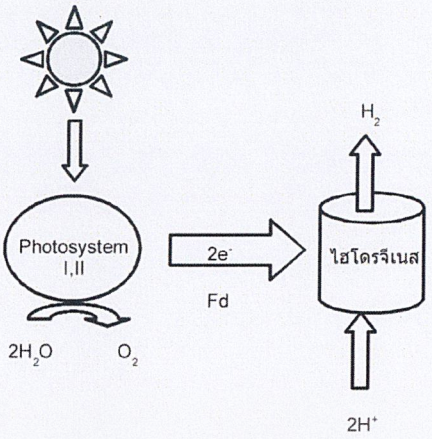
2.2.1.4 Biological Process

2.2.1.4.1 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (direct biophotolysis)

การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงเป็นกระบวนการที่ใช้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว (green algae) เพื่อแยกน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรงให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยอัตราส่วน 2:1 ดังสมการที่ (1) ระบบแสงที่สอง (photosystem II, PSII) ดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน โปรตรอน (H+)และอิเล็กตรอน (e-) จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์รีดอกซิน (Fd) โดยพลังงานแสงอาทิตย์ที่ถูกดูดซับโดยระบบแสงที่หนึ่ง (photosystem I, PSI) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจน ดังแสดงในรูปที่ 3

$$H_2O \longrightarrow 2H_2 + O_2 \qquad (1)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง(ที่มา: รัชนีกร, 2011)

เนื่องจากออกซิเจนมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงมีความจำเป็นต้องรักษาระดับออกซิเจนให้มีค่าต่ำกว่า 0.1% เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืน สาหร่ายสีเขียวหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงได้ เช่น Chlamydomonas reinhardtii และChlorella fusca

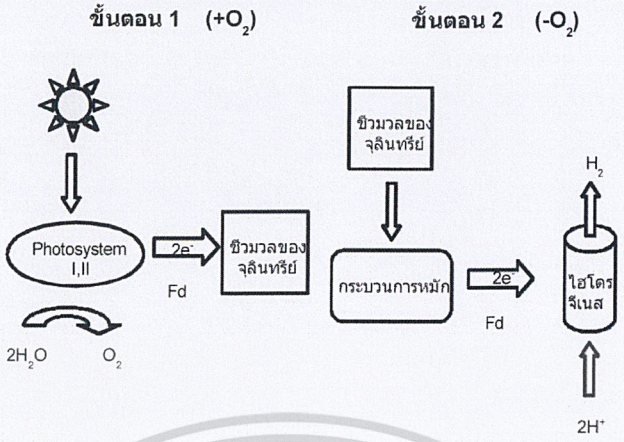
2.2.1.4.2 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)

จะพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (bluegreen algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ซึ่งมีคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน ดังแสดงในรูปที่ 4 การผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะสามารถแก้ปัญหาเนื่องจากออกซิเจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผลิตไฮโดรเจน เพราะกระบวนการสร้างออกซิเจนและไฮโดรเจนเกิดแยกกัน โดยในขั้นตอนแรกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย ดังสมการที่ (2) และในขั้นตอนที่สองชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจนดังสมการที่ (3)

$$12H_2O + 6CO_2 \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad (2)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 12H_2 + 6CO_2 \qquad (3)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม (ที่มา: รัชนีกร, 2011)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมได้ เช่น Gloeocapsa alpicola

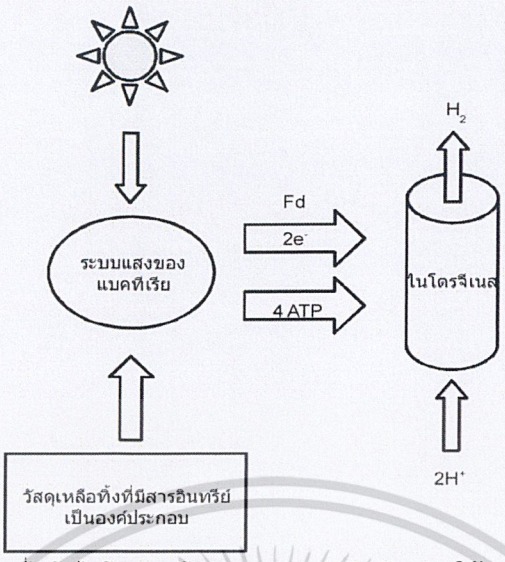
2.2.1.4.3 กระบวนการหมักแบบใช้แสง (photofermentation)

การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสงเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเช่น แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria) โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะประกอบด้วยระบบสังเคราะห์แสงเดียวและไม่สร้างออกซิเจน ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายและพืชชั้นสูง แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะผลิตไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะที่ใช้แสงและสารประกอบอินทรีย์หรือชีวมวล ดังแสดงในรูปที่ 5 ภายใต้สภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้กรดอินทรีย์อย่างง่ายเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังเฟอร์รีดอกซินโดยพลังงานในรูป ATP ซึ่งอิเล็กตรอน 1 ตัวจะต้องการพลังงาน 2 ATP จากนั้นเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเพื่อสร้างไฮโดรเจน สมการที่ (4) แสดงการผลิตไฮโดรเจนจากกรดแลคติก

$$C_2H_6O_3 + 3H_2O \; 3CO_2 + 6H_2 \qquad (4)$$

การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสงนั้นสามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด เช่น สารอินทรีย์หลายประเภท ของเสียที่เป็นชีวมวล ไม่ว่าจะเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมหรือจากการเกษตร แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก ได้แก่ Rhodobacter capsulatus และ Rhodopseudomonas capsulate

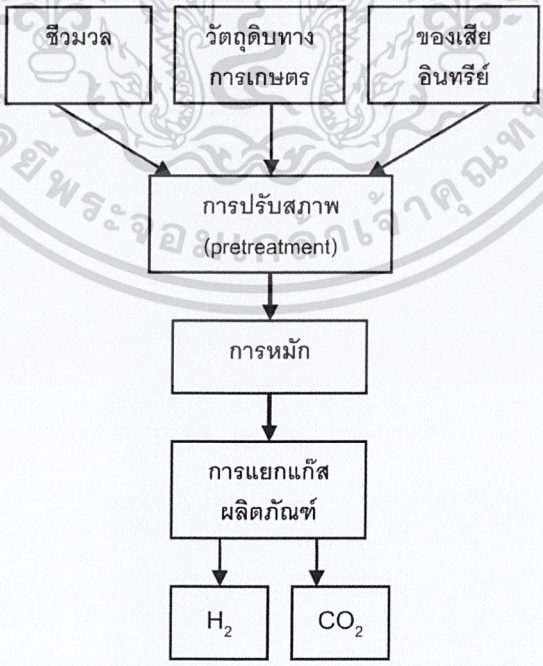
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง (ที่มา: รัชนีกร, 2011)

2.2.1.4.4 กระบวนการแบบไม่ใช้แสง (non light-drivenprocess)

การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะเกิดในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ ซึ่งมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและสามารถใช้สารตั้งต้นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ชีวมวล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ของเสียจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม ในสภาวะไม่ใช้แสง เพื่อการผลิตไฮโดรเจน ดังแสดงในรูปที่ 6 และมีผลพลอยได้เป็นสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 2.7 การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง(ที่มา: รัชนีกร, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้กลูโคส 1 โมล เป็นสารตั้งต้น จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล เมื่อมีกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังแสดงในสมการที่ (5) หรือผลิตไฮโดรเจนได้ 2 โมล เมื่อมีกรดบิวทีริกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังแสดงในสมการที่ (6)

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \quad (5)$$

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \quad (6)$$

แต่ในทางปฏิบัติ การผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล ต่อ กลูโคส 1 โมล ไม่สามารถเกิดขึ้นได้จริง เนื่องจากสารตั้งต้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นชีวมวลของจุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์สุดท้ายมักจะมีทั้งกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกอยู่รวมกัน นอกจากนี้ยังมีสารเมแทบอไลต์อื่นๆ เช่น กรดโพรพิโอนิก แอลกอฮอล์ และกรดแลคติก รวมอยู่ด้วย

2.2.1.4.5 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำเป็นก๊าซด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological water-gas shift reaction)

ปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำเป็นก๊าซด้วยกระบวนการทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ผลิตไฮโดรเจนด้วย photoheterotrophic bact. เช่น Rhodospirillum rubrum คาร์บอนมอนออกไซด์สามารถถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเกี่ยวกับการเผาผลาญเพื่อผลิต ATP ควบคู่ไปกับการลดปฏิกิริยาของน้ำ โมเลกุลไฮโดรเจนสามารถแสดงได้ดังสมการต่อไปนี้

$$CO + H_2O \; CO_2 + H_2 \; \Delta G_0 = -20.1 \text{ kJ/mol}$$

แบคทีเรียแกรมลบ เช่น Rubrivax rubrum Rubrivax gelatinosus และแบคทีเรียแกรมบวก Carboxydothermus hydrogenoformans สามารถผลิตไบโอไฮโดรเจนผ่านปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำเป็นก๊าซด้วยกระบวนการทางชีวภาพ กระบวนการผลิตทางชีวภาพนี้ อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ (2011) ศึกษาสาหร่ายที่เก็บมาจากแหล่งน้ำจืดในธรรมชาติ พบว่าเป็นสายพันธุ์ Tetraspora พร้อมตั้งชื่อสายพันธุ์ว่า *Tetraspora* sp. CU2551 ผลการยืนยันจากการหาลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน 18S rDNA พบว่าสาหร่ายนี้มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว สาหร่ายที่อายุ 24 ชม.เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงที่ 37 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที แสดงความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เหมาะสมเมื่อบ่มเซลล์ที่ 35 องศาเซลเซียส การผลิตก๊าซภายใต้แสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มจาก 5.75 ถึง 9.30 อย่างไรก็ตาม การผลิตลดลงอย่างมากเมื่อลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH ถึง 5.25 การเติม 0.5 มิลลิโมล่าร์ของเบต้าเมอแคปโตเอทธานอล ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยกระตุ้นอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ประมาณสองเท่า การขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ส่งผลให้อัตราการผลิตก๊าซเพิ่มขึ้นประมาณ 50% ซึ่งผลนี้ต่างจากการขาดแหล่งไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งซึ่งจะส่งผลให้เซลล์ผลิตก๊าซในอัตราเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ผลการเพิ่มอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเติม 0.5 มิลลิโมล่าร์ของเบต้าเมอแคปโตเอทธานอล ในภาวะขาดทั้งแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์จะเกิดขึ้นเมื่อความเข้มแสงไม่เกิน 5 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที หากแสงเข้มขึ้นจะไม่ส่งผลให้ผลิตได้สูงขึ้นตาม การบ่มเชื้อให้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดสูงสุดเมื่ออยู่ในภาวะขาดทั้งแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 29 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที คำนวณได้ค่าอัตราการผลิตได้ประมาณ 17.3 – 61.7 ไมโครโมลต่อมิลลิตกรัมคลอโรฟิลเอต่อชั่วโมง ซึ่งถือได้ว่าเป็นค่าการผลิตที่สูงเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น ส่งผลให้ *Tetraspora* sp. CU2551 เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพที่ใช้แสง

สุรัตน์ติพร รัตนะ (2011) ศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติและมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่าในบรรดาสาหร่ายที่แยกได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดและผลิตได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA พบว่ามีความเหมือนกับสาหร่ายในจีนัส *Scenedesmus* จึงตั้งชื่อสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 นี้ว่า *Scenedemus* sp.KMITL-O1 หลังจากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedemus* sp.KMITL-O1 ใน 2 สภาวะของการเพาะเลี้ยง คือ สภาวะโฟโตออโตโทรปและสภาวะเฮเทอโรโทรปพบว่าภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป สาหร่าย *Scenedemus* sp.KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBM เป็นเวลา 1 สัปดาห์และให้ระยะเวลาปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM สูตรที่เหมาะสม คือ อาหารที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนและแมกนีเซียมซัลเฟต ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป สาหร่าย *Scenedemus* sp.KMITL-O1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ในที่มีแสง เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมงและให้ระยะเวลาปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด อุณหภูมิและความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ 35 องศาเซลเซียสและ 2,000 ลักซ์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่าย

สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย (ภาคผนวก ก)

1. อาหาร N8 (Vonshak, 1986)
2. อาหาร N8-N
3. อาหาร N8-P
4. อาหาร N8-S
5. อาหาร N8-N-P
6. อาหาร N8-N-S
7. อาหาร N8-P-S
8. อาหาร N8-N-P-S
9. อาหาร TAP (Tris-Acetate-Phosphate medium) (Harris, 1989)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8

1. คิวปริกซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
3. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
6. โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
7. เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Germany)
8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
9. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. วุ้น (Agar-Agar Bacto) (Analytical grade, S.D. Fine-Chem Limited, India)
11. อลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต ($Al_2(SO_4)_3.18H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
12. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

3.2.3 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N

1. คิวปริกซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
3. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
7. เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Germany)
8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. อลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต ($Al_2(SO_4)_3.18H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
11. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

3.2.4 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-P

1. คิวปริกซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
3. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
5. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
6. โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
7. เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Germany)
8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
9. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. อลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต ($Al_2(SO_4)_3.18H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
11. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-S

1. คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
3. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
6. โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
7. เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Germany)
8. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
9. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. อลูมิเนียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($AlCl_3.6H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
11. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

3.2.6 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-P

1. คิวปริกซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
3. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
5. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Germany)
7. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
8. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
9. อลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต ($Al_2(SO_4)_3.18H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

3.2.7 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-S

1. คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
3. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
7. เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Germany)
8. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
9. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. อลูมิเนียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (AlCl3.6H2O) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
11. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.8 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-P-S

1. คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
3. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
5. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
6. โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
7. เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Germany)
8. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
9. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. อลูมิเนียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($AlCl_3.6H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
11. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

3.2.9 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-P-S

1. คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
3. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
5. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
6. เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Germany)
7. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
9. อลูมิเนียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($AlCl_3.6H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

3.2.10 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP (Tris-Acetate-Phosphate medium)

1. กรดบอริก (H_3BO_3) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
2. เกลเซียลอะซิติกแอซิด (Glacial Acetic Acid) (GR Grade, Duksan Pure Chemicals, Korea)
3. คิวปริกซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
5. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
6. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
7. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4.2H_2O$) (Analytical grade, Carlo Erba Reagents, France)
8. ทริส-ไฮดรอกซีเมทิล-อะมิโนมีเทน (Tris(hydroxymethyl-aminomethane)) (Analytical grade, Carlo Erba Reagents, France)
9. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

12. แมงกานีสคลอไรด์ไดไฮเดรต ($MnCl_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

13. วุ้น (Agar-Agar Bacto) (Analytical grade, S.D. Fine-Chem Limited, India)

14. เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ (EDTA-$Na_2.2H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

15. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

16. ไอร์ออนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) (Analytical grade, Loba Chemie Pvt.Ltd, India)

3.2.11 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

1. แอมพิซิลลิน (Ampicillin Sodium Salt) (VWR International, New York)

2. กานามัยซิน (Kanamycin)

3.2.12 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (แพรกซ์แอร์,ประเทศไทย)

2. ก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (แพรกซ์แอร์, ประเทศไทย)

3.3 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope) (Olympus, CH30, Japan)

2. ขวด Headspace Vial ขนาด 10 มิลลิลิตร

3. คิวเวต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (SCHOTT, Germany)

5. เครื่องเขย่าแบบใช้แสง (Illumination Orbital Shaker)

6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo)

7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (JS Research INC, Korea)

8. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo Centrifuge) (Thermo-Scientific, Heraeus-Megafuge 8R, Germany)

9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Thermo Scientific, Genesys 10S)

10. จานเลี้ยงเชื้อแก้ว (Petri Dish)

11. ตะเกียงแอลกอฮอล์

12. ตู้ดูดควัน (Hood) (Flexlab, FH5-11-13/FB)

13. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) (Astec, Astecair 3000E)

14. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) (Memmert, UN55, Germany)

15. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาดต่างๆ (Mettler Toledo, Pipet-Lite XLS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, N8-N-P-S และ Tris Acetate Phosphate (TAP)

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อควรใช้เครื่องแก้วที่สะอาด ผ่านการล้างมาเป็นอย่างดี ไม่ปนเปื้อนสารใดๆ หลังจากนั้นผสมสารเคมีตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ในภาคผนวกและเติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่กำหนดไว้ในสูตร ควรใช้น้ำกลั่นเนื่องจากเป็นน้ำที่ปราศจากคลอรีน (Chlorine) สารเคมีและไอออนของโลหะหนักต่าง ๆ (Heavy metal ions) ที่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้และควรเตรียมในภาชนะที่มีปริมาตรมากกว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการเตรียมประมาณ 2 เท่า เพื่อความสะดวกในการผสมและป้องกันฟองที่เกิดจากการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนในการเลี้ยงเชื้อบนจานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish) จะต้องทำเป็นอาหารแข็งก่อนโดยใส่ผงวุ้น (Agar) ลงไป โดยใส่ลงไปปริมาณ 1.5% ของอาหารเหลวที่ต้องการนำไปทำเป็นอาหารแข็ง เมื่อผสมทุกอย่างเสร็จ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Sterilized) ใน Autoclave ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในขั้นตอนนี้ควรทำในตู้ปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน หลังจากเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อแล้ว รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ต้องแน่ใจว่าไม่มีไอน้ำเกาะอยู่ที่ฝาจานเลี้ยงเชื้อ เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้

รูปที่ 3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 บนอาหารแข็ง N8 โดยเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีมาขีดบนจานที่มีอาหารแข็ง N8 และใช้ที่เกลี่ยเชื้อกระจายไปยังทั่วผิวหน้าของอาหารแข็ง นำไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสงบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

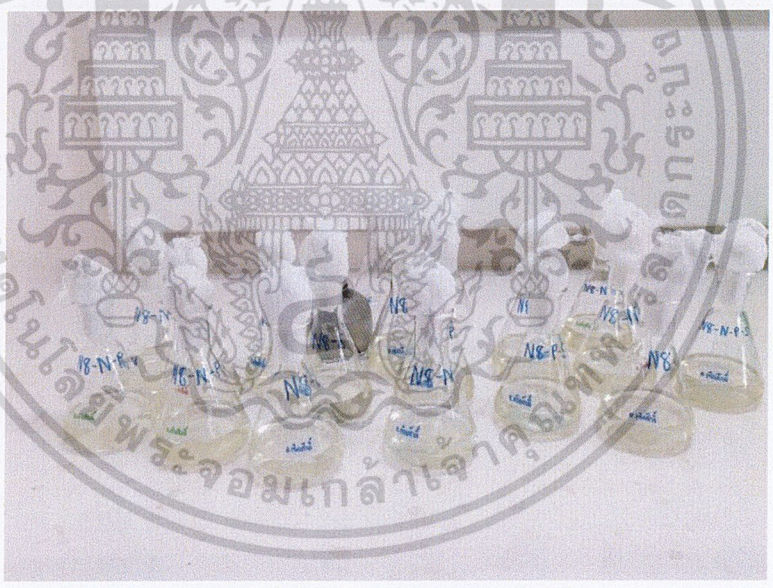
สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว N8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ภายในตู้บ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 วิธีวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S

นำสาหร่ายสีเขียวที่ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สาหร่ายเกิดการตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอด เมื่อสาหร่ายตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอดแล้ว เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว N8-N-P-S 40 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างเซลล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง จึงเทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์โดยวิธีนี้ 3 ครั้ง หลังจากการปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้าย จากนั้นเทส่วนใสให้เหลือประมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกระจายเซลล์ ใช้ไมโครปิเปตดูดสาหร่ายจากหลอดเซนตริฟิวจ์มา 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในคิวเวตที่มีน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร จากนั้นทำการเริ่มเลี้ยงสาหร่ายชุดใหม่ โดยให้เริ่มต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 0.05 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาตรของตัวอย่างสาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงไปในแต่ละฟลาสก์ ซึ่งในแต่ละฟลาสก์จะประกอบไปด้วยอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S และ N8-N-P-S ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร



รูปที่ 3.3 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลวต่างๆ

หลังจากเตรียมสาหร่ายลงในอาหารเหลวต่างๆ เรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เป็นเวลา 29 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

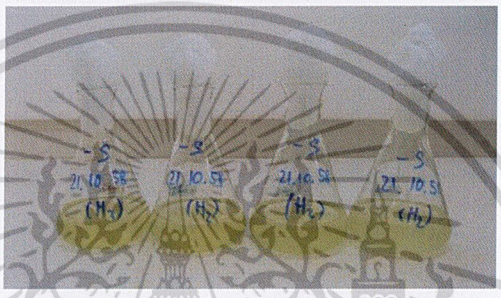
3.7.1 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S

จากผลการทดลองการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S พบว่า สาหร่ายสีเขียวที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S มีการเจริญเติบโตดีที่สุด เราจึงสนใจที่จะศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยนำสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ปริมาตร 280 มิลลิลิตร ตามวิธีในหัวข้อ 3.5 มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สาหร่ายเกิดการตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอด เมื่อสาหร่ายตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอดแล้ว เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว N8-N-P-S 40 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างเซลล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงจึงเทส่วนใสทิ้ง ทำล้างเซลล์โดยวิธีนี้ 3 ครั้ง หลังจากการปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้ายให้เหลือส่วนใสในหลอดเซนตริฟิวจ์ประมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกระจายเซลล์ ใช้ไมโครปิเปตดูดสาหร่ายจากหลอดเซนตริฟิวจ์มา 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในคิวเวต ที่มีน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาตรของตัวอย่างสาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงไปในแต่ละฟลาสก์ ซึ่งในแต่ละฟลาสก์จะประกอบไปด้วยอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ้าหากกลัวการปนเปื้อนจากอาหารเหลวให้ใส่ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลงไปด้วย หลังจากเตรียมสาหร่ายลงในอาหารเหลวต่างๆ เรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

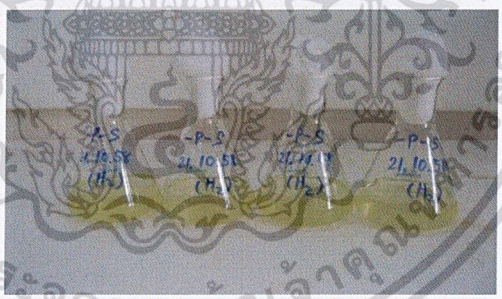
รูปที่ 3.4 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลว N8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.5 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลว N8-P



รูปที่ 3.6 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลว N8-S



รูปที่ 3.7 การเตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในอาหารเหลว N8-P-S

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ปิเปตสารละลายเซลล์จากอาหารเหลวแต่ละฟลาสก์มา 5 มิลลิลิตรใส่ขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด ทำการวิเคราะห์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนำตัวอย่างไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที นำขวดแก้วที่บรรจุเซลล์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง นำก๊าซตรงบริเวณส่วนบนของขวด (head space) ไปวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนด้วยแก๊สโครมาโตกราฟ (GC) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน แสดงในตารางที่ 3.1 และโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD แสดงดังรูปที่ ค1 (ภาคผนวก ค) แล้วนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปคำนวณค่าการผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในภาคผนวก ง

รูปที่ 3.8 ขวดแก้วตัวอย่างเซลล์พ่นก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 % เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph- Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]

พารามิเตอร์	**สภาวะในการเดินระบบ**
Column	Pack column 2 m; Molecular sieve 13X mesh 60/80
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	Injector temperature : 100 ^{0}C
	Column temperature : 50 ^{0}C
	Detector temperature : 120 ^{0}C
Carrier gas	Argon flow rate 20 ml/min (99.999 % purity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.2 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8 ในอายุเซลล์ที่ต่างกัน

นำสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตามวิธีในหัวข้อ 3.5 มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส จากนั้นทำการกระจายเซลล์ในอาหารเหลว N8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสาหร่ายจากหลอดเซนตริฟิวจ์มา 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในคิวเวต ที่มีน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาตรของตัวอย่างสาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงไปในแต่ละฟลาสก์ ถ้าหากกลัวการปนเปื้อนจากอาหารเหลวให้ใส่ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลงไปด้วย หลังจากเตรียมสาหร่ายลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว N8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ โดยแต่ละฟลาสก์เพาะเลี้ยงให้มีอายุเซลล์ที่ต่างกันเป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน

รูปที่ 3.9 เตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว N8 เพาะเลี้ยงให้มีอายุเซลล์ที่ต่างกัน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีอายุเซลล์ครบ 1 วัน ปิเปตสารละลายเซลล์ มา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด ทำการวิเคราะห์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนำตัวอย่างไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที นำขวดแก้วที่บรรจุเซลล์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำก๊าซตรง

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณส่วนบนของขวด (head space) ไปวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยแก๊สโครมาโตกราฟ (GC) และเมื่อเซลล์มีอายุครบ 2, 3, 4 และ 5 วัน ทำวิธีเช่นเดียวกันกับวิธีทำในวันที่ 1

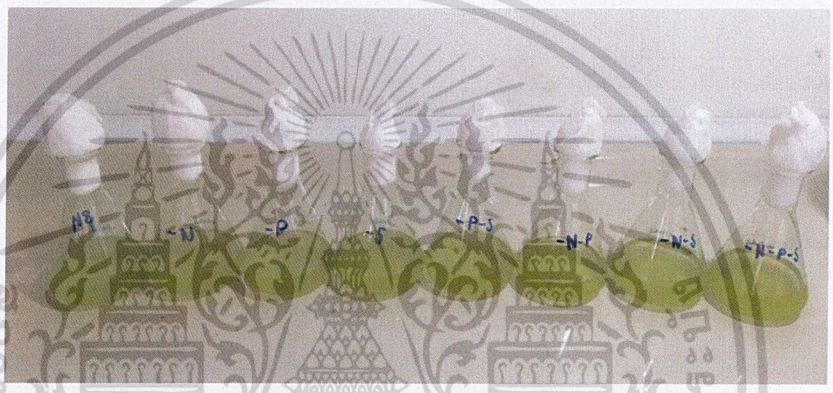
3.7.3 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S และ N8-N-P-S

นำสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามวิธีในหัวข้อ 3.5 มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สาหร่ายเกิดการตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอด เมื่อสาหร่ายตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอดแล้ว เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการกระจายเซลล์ในอาหารเหลว N8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสาหร่ายจากหลอดเซนตริฟิวจ์มา 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในคิวเวต ที่มีน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ประมาณ 0.03 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาตรของตัวอย่างสาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงไปในฟลาสก์ ที่มีปริมาตรอาหารเหลว TAP ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร ถ้าหากกลัวการปนเปื้อนจากอาหารเหลวให้ใส่ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลงไปด้วย หลังจากเตรียมสาหร่ายลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รูปที่ 3.10 เตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารละลายเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ครบ 24 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สาหร่ายเกิดการตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอด เมื่อสาหร่ายตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอดแล้ว เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว N8-N-P-S 40 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างเซลล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงจึงเทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์โดยวิธีนี้ 3 ครั้ง หลังจากการปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้ายให้เหลือส่วนใสในหลอดเซนตริฟิวจ์ประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกระจายเซลล์ ทำการปิเปตสารละลายเซลล์ในหลอดเซนตริฟิวจ์ มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์ที่มี อาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P,N8-P-S,N8-N-S และ N8-N-P-S ฟลาสก์ละ 40 มิลลิลิตร



รูปที่ 3.11 เตรียมสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S

ปิเปตสารละลายเซลล์ของแต่ละอาหารเหลว มา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด ทำการวิเคราะห์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนำตัวอย่างไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที นำขวดแก้วที่บรรจุเซลล์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำก๊าซตรงบริเวณส่วนบนของขวด (head space) ไปวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยแก๊สโครมาโตกราฟ (GC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

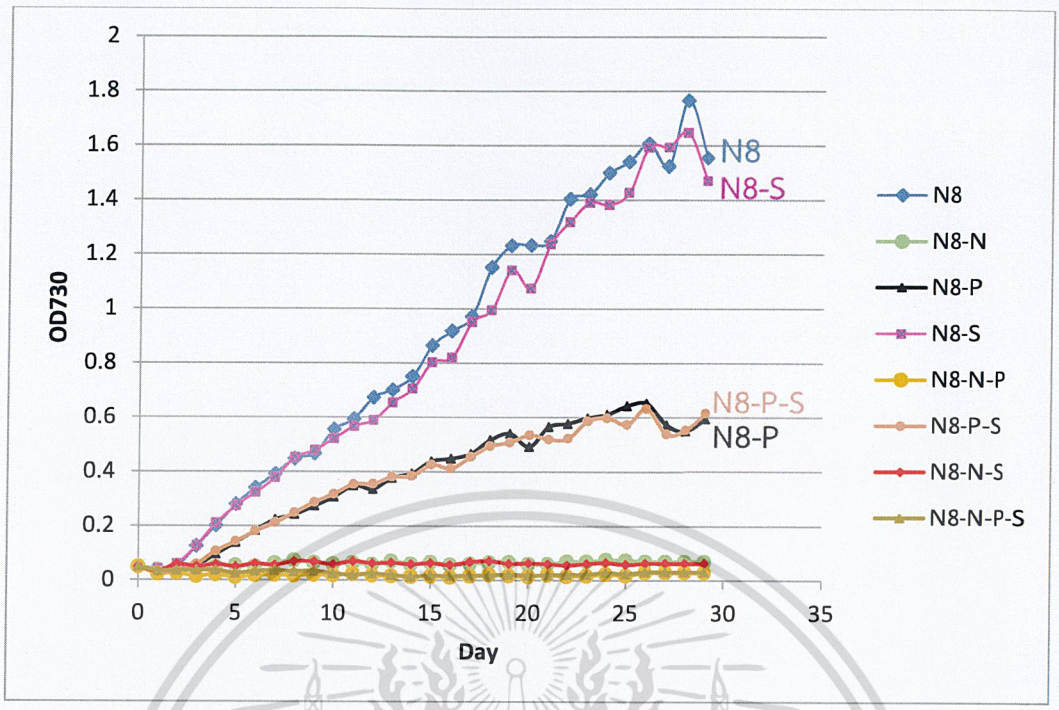
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่ภายในมีอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S แต่ละฟลาสก์มีอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.05 จากนั้นนำไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 29 วัน ดังรูป 4.1 แสดงให้เห็นถึงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเหลว N8, N8-S, N8-P และ N8-P-S มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและไม่มีการเจริญเติบโตต่อหลังจากนั้น เป็นที่สังเกตว่าสาหร่ายในอาหาร N8 มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า N8-S เล็กน้อย สาหร่ายจากทั้งสองมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันและเจริญเติบโตได้ดีที่สุดกว่าอาหารชนิดอื่น ส่วนสาหร่ายในอาหาร N8-P และ N8-P-S มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันและมีการเจริญเติบโตเป็นประมาณครึ่งหนึ่งของสาหร่ายที่เลี้ยงใน N8 และ N8-S และยังสังเกตได้ว่าอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร N8-N, N8-N-P, N8-N-S และ N8-N-P-S มีการเจริญเติบโตที่ช้าที่สุด ดังรูป 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

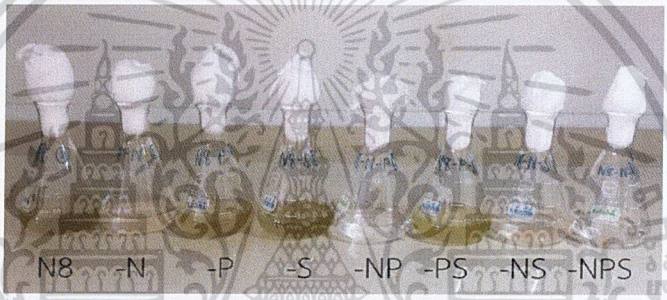


รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S

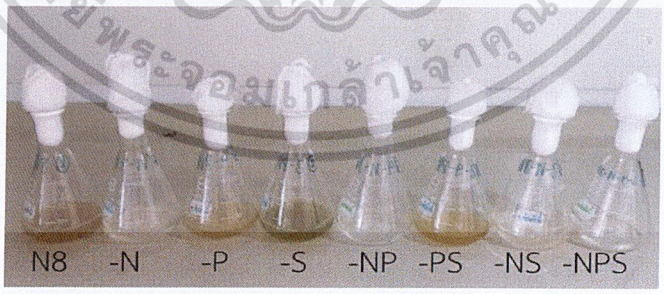
เมื่อเปรียบเทียบสีของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารต่างๆ จะพบว่าสีของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารทุกตัวในวันแรกมีสีเดียวกันทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 15 วันพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S เมื่อเวลาผ่านไป 15 วันมีสีเขียวขึ้นมากกว่าวันแรกอย่างมาก และเมื่อผ่านไป 29 วันก็เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเขียวอมน้ำตาล ส่วนสีของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8-N, N8-N-P, N8-N-S, และ N8-N-P-S มีสีซีดจางลงจนเห็นว่าเป็นสารละลายสีใสอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเวลาผ่านไป ดังรูปที่ 4.2, 4.3 และ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S วันที่ 1



รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S วันที่ 15

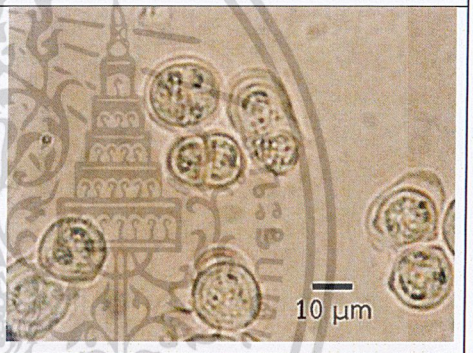
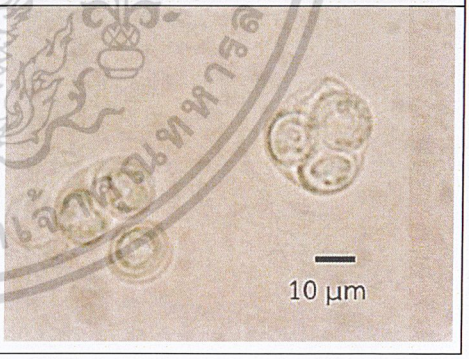


รูปที่ 4.4 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S วันที่ 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

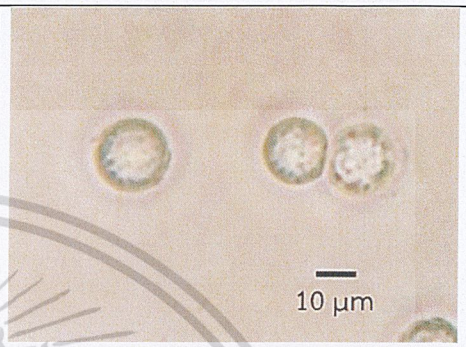
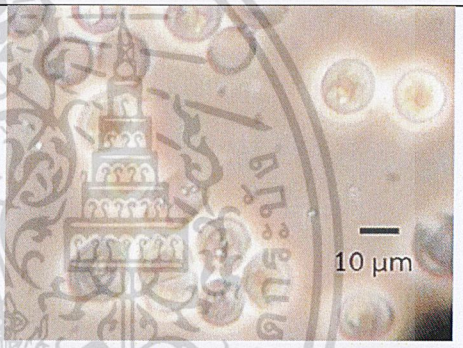
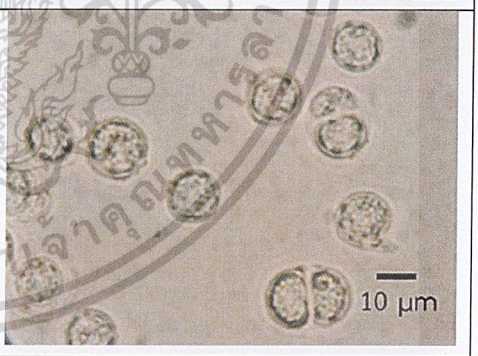
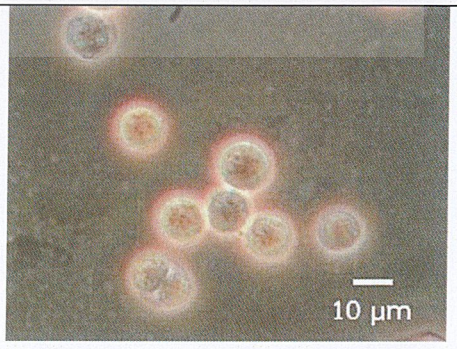
จากการนำเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S ไปส่องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง สังเกตได้ว่า เซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร N8 ปกติมีขนาดเซลล์ใหญ่กว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารอื่นๆ เซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในแหล่งอาหารที่ขาดไนโตรเจน N8-N, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S มีขนาดเล็กที่สุดและยังสังเกตได้ว่าเซลล์มีสีจางกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8 เปรียบเทียบดังตาราง 4.1

ตารางที่ 4.1 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ชนิดของอาหาร	ลักษณะของสาหร่าย	ภาพถ่าย
N8	เซลล์มีขนาด 18.23 µm. เห็นคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วเซลล์ มองเห็นว่ามีระบบเยื่อหุ้มส่วนประกอบภายในเซลล์ชัดเจน	
N8-N	เซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8 คลอโรพลาสต์สีจางกว่าอย่างเห็นได้ชัด	

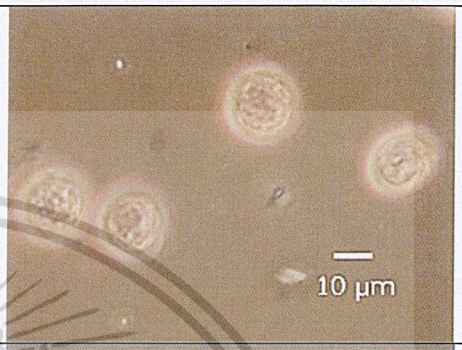
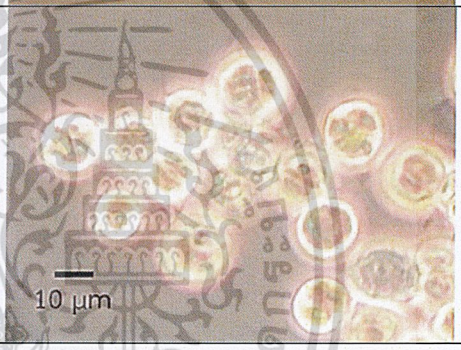
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ชนิดของอาหาร	ลักษณะของสาหร่าย	ภาพถ่าย
N8-P	เซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8 คลอโรพลาสต์มีการเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์	
N8-S	เซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8 ผนังเซลล์หนาขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับเซลล์ในอาหาร N8 ยังมองเห็นว่ามีเยื่อหุ้มเซลล์ห่อหุ้มส่วนต่างๆภายในเซลล์	
N8-N-P	เซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8 มองไม่เห็นเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์ภายในกระจัดกระจาย	
N8-N-S	เซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8 คลอโรพลาสต์สีจางกว่าอย่างเห็นได้ชัด	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ชนิดของอาหร	ลักษณะของสาหร่าย	ภาพถ่าย
N8-P-S	เซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร N8 มองไม่เห็นเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์ภายในกระจัดกระจาย	
N8-N-P-S	เซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็ก ผนังเซลล์หนาขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับเซลล์ในอาหาร N8 มองเห็นว่ามีระบบเยื่อหุ้มส่วนประกอบภายในเซลล์ชัดเจน	

จะสรุปได้ว่าการขาดแหล่งอาหารในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนส่วนมากมาจาก ไนเตรท แอมโมเนีย หรือยูเรีย (Grobbelaar, 1995) ไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของสาหร่าย เป็นองค์ประกอบของโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำงานภายในเซลล์ของสาหร่าย ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารหลักอีกชนิดหนึ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว ยังมีความสำคัญสำหรับการสร้างโปรตีนในเซลล์ โดยเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ที่เป็นเกลือของโลหะ ได้แก่ ซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543) ส่วนฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีความสำคัญเช่นกัน ทั้งนี้เพราะฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการแปรรูปพลังงาน เช่นเป็นส่วนประกอบของ Deoxyribonucleic acid (DNA) และ Ribonucleic acid (RNA) จากผลการทดลองพบว่าการขาดแหล่งอาหารไนโตรเจนทำให้สาหร่ายมีการเติบโตช้าและทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรพลาสต์มีสีจางลงมากกว่า ส่วนการขาดแหล่งอาหารซัลเฟอร์ทำให้ผนังเซลล์หนาขึ้นกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดอื่น

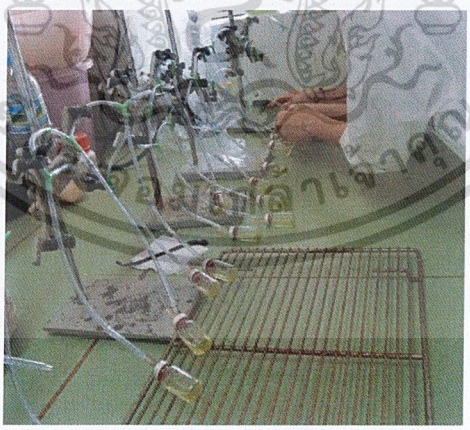
4.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-S, N8-P และ N8-P-S

จากผลการทดลองการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S พบว่า สาหร่ายสีเขียวที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยนำสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ปริมาตร 280 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 แล้วปิเปตตัวอย่างสาหร่ายใส่ลงไปในแต่ละฟลาสก์ ซึ่งในแต่ละฟลาสก์จะประกอบไปด้วยอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากเตรียมสาหร่ายลงในอาหารเหลวต่างๆ เรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา ปิเปตสารละลายเซลล์จากอาหารเหลวแต่ละฟลาสก์ มา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด ทำการวิเคราะห์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนำตัวอย่างไปพ่นก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 % เป็นเวลา 5 นาที นำขวดแก้วที่บรรจุเซลล์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง นำก๊าซตรงบริเวณส่วนบนของขวด (head space) ไปวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยแก๊สโครมาโตกราฟ (GC) ผลจากการฉีดพบว่าในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจน สาหร่ายจากอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนขึ้นเลย สาเหตุที่แน่ชัดยังไม่สามารถระบุได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8 ในอายุเซลล์ที่ต่างกัน

จากการทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนเพื่อหาอายุวันที่เหมาะสมในการวัดไฮโดรเจน โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้น 0.1 ให้มีอายุวันเป็น 1, 2 ,3 ,4 และ 5 วัน ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว N8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา ปิเปตเซลล์สาหร่าย 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมาวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ออกซิเจนและสภาวะที่ไร้ออกซิเจน โดยสภาวะที่ไร้ออกซิเจนทำโดยการเป่าก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 % เป่าเข้าไปในขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) เพื่อไล่ออกซิเจนภายในให้หมด จากนั้นนำไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสงอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เข็มดูดก๊าซบนบริเวณบนของขวด (head space) ไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยเครื่อง GC-TCD ผลจากการฉีดพบว่าในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจน สาหร่ายที่มีอายุ 1, 2, 3, 4, และ 5 วัน ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นเลย สาเหตุที่แน่ชัดยังไม่สามารถระบุได้ อย่างไรก็ตาม มีการสังเกตพบการปนเปื้อนของราดูได้จากส่วนใสของอาหารเลี้ยงสาหร่ายมีความขุ่นเกิดขึ้น ทำการยืนยันโดยการขีดน้ำสาหร่ายบนอาหารวุ้น พบว่ามีโคโลนีของราเกิดขึ้น



รูปที่ 4.5 การพ่นก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 % เข้าไปในขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) เพื่อไล่ออกซิเจนภายในให้หมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.6 ขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เตรียมวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยเครื่อง GC-TCD

4.4 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S

จากหัวข้อ 4.2 เราได้พยายามวัดไฮโดรเจนของเซลล์จากอาหารเหลวต่างๆ 4 ชนิด พบว่าไม่เจอการผลิตไฮโดรเจนเลย จึงปรับวิธีการใหม่โดยจะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว TAP ก่อน เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการย้ายเซลล์ไปสู่อาหารเหลวใหม่ 8 ชนิด ตามข้อ 4.2 วิธีทำเป็นดังนี้ต่อไป

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในฟลาสก์ที่ภายในมีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีการใส่ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.03 จากนั้นนำไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาปั่นเก็บเซลล์ แล้วทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว N8-N-P-S 40 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ปั่นรวมเซลล์แล้วปิเปตใส่ในฟลาสก์ที่ภายในมีอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S แต่ละฟลาสก์มีอาหารปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมาวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนทำโดยการเป่าก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 % เข้าไปในขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) เพื่อไล่ออกซิเจนภายในให้หมด จากนั้นนำไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสง ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เข็มดูดก๊าซบนบริเวณบนของขวด

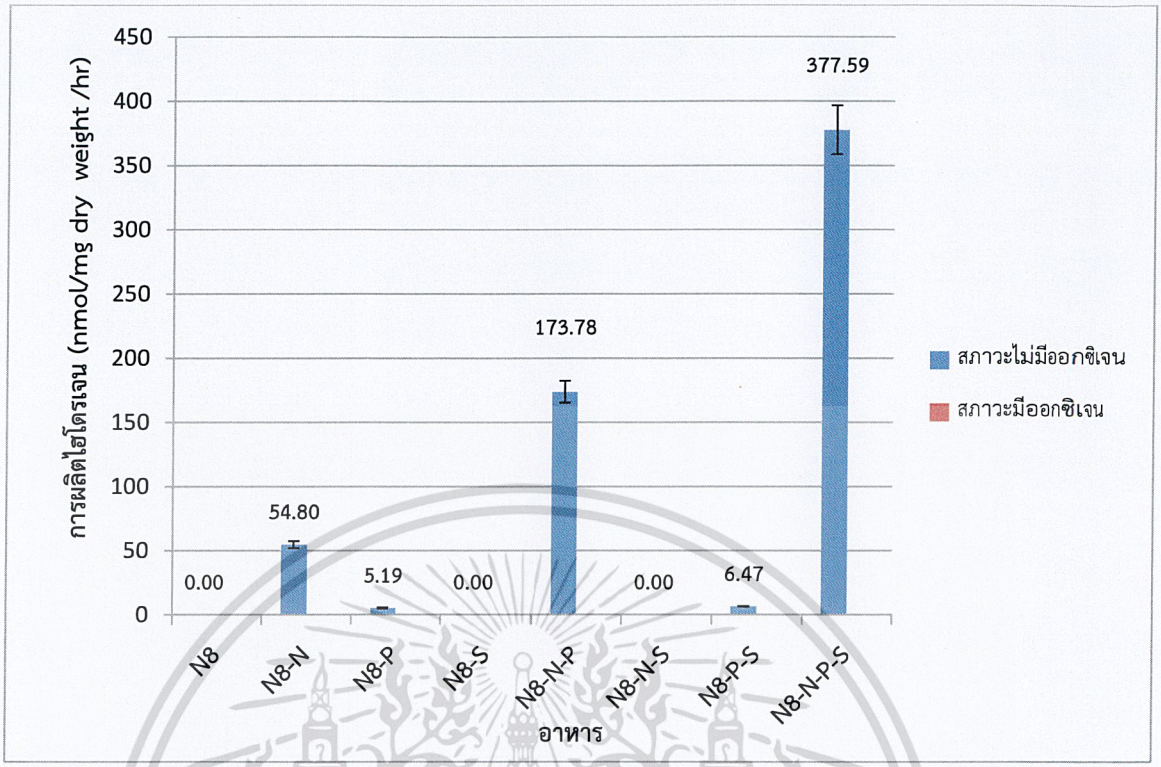
เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(head space) ไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยเครื่อง GC-TCD ผลจากการฉีดพบว่าในสภาวะมีออกซิเจน สาหร่ายจากในทุกอาหารเหลวไม่มีการผลิตไฮโดรเจนขึ้นเลย แต่ในสภาวะไม่มีออกซิเจนมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารเหลว 5 อาหาร คือ N8-N-P-S, N8-N-P, N8-N, N8-P-S และ N8-P นอกจากนั้นยังสังเกตได้อย่างชัดเจนว่า N8-N-P-S มีการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด รองลงมาก็คือ N8-N-P, N8-N, N8-P-S และ N8-P ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 จึงแสดงว่าผลของการขาดแหล่งอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 โดยการขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตต่ำลง แต่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดแหล่งฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์จะทำให้สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณมากขึ้นเช่นกัน ดังนั้นสาหร่ายในอาหาร N8-N-P-S จึงมีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S

อาหาร	ค่าเฉลี่ย		ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
	สภาวะมีออกซิเจน	สภาวะไม่มีออกซิเจน	สภาวะมีออกซิเจน	สภาวะไม่มีออกซิเจน
N8	0.00	0.00	0.00	0.00
N8-N	0.00	124.88	0.00	89.58
N8-P	0.00	18.31	0.00	1.00
N8-S	0.00	0.00	0.00	0.00
N8-N-P	0.00	98.73	0.00	60.42
N8-N-S	0.00	0.00	0.00	0.00
N8-P-S	0.00	21.35	0.00	1.58
N8-N-P-S	0.00	205.02	0.00	72.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 การผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-P-S, N8-N-S, และ N8-N-P-S

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S

การขาดแหล่งอาหารในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนส่วนมากมาจาก ไนเตรท แอมโมเนีย หรือยูเรีย (Grobbelaar, 1995) ไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของสาหร่าย เป็นองค์ประกอบของโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำงานภายในเซลล์ของสาหร่าย ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารหลักอีกชนิดหนึ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว ยังมีความสำคัญสำหรับการสร้างโปรตีนในเซลล์ โดยเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ที่เป็นเกลือของโลหะ ได้แก่ ซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543) ส่วนฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีความสำคัญเช่นกัน ทั้งนี้เพราะฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการแปรรูปพลังงาน เช่นเป็นส่วนประกอบของ Deoxyribonucleic acid (DNA) และ Ribonucleic acid (RNA)

5.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-S, N8-P และ N8-P-S

จากผลการทดลองการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S พบว่า สาหร่ายสีเขียวที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N8, N8-P, N8-S และ N8-P-S มีการเจริญเติบโตดีที่สุด จึงนำมาศึกษาการลิตไฮโดรเจนจากการฉีดพบว่าในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8, N8-S, N8-P และ N8-P-S ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว N8 ในอายุเซลล์ที่ต่างกัน

จากการฉีดพบว่าในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจน สาหร่ายที่มีอายุ 1, 2, 3, 4, และ 5 วัน ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นเลย อาจเป็นผลเนื่องมาจากสาหร่ายที่ใช้มีราเกิดขึ้น มีการสังเกตพบการปนเปื้อนของราดูได้จากส่วนใสของอาหารเลี้ยงสาหร่ายมีความขุ่นเกิดขึ้น ทำการยืนยันโดยการขีดน้ำสาหร่ายบนอาหารวุ้น พบว่ามีโคโลนีของราเกิดขึ้น

5.4 ผลการศึกษาการการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีออกซิเจนและสภาวะไม่มีออกซิเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเหลว TAP และประยุกต์ลงอาหารเหลว N8, N8-N, N8-P, N8-S, N8-N-P, N8-N-S, N8-P-S และ N8-N-P-S

ผลจากการฉีดพบว่าในสภาวะมีออกซิเจน สาหร่ายจากในทุกอาหารไม่มีการผลิตไฮโดรเจนขึ้นเลย แต่ในสภาวะไม่มีออกซิเจนมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายที่ประยุกต์ลงในอาหารเหลว N8-N-P-S, N8-N-P, N8-N, N8-P-S และ N8-P จะเห็นว่า N8-N-P-S มีการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด รองลงมาก็คือ N8-N-P, N8-N, N8-P-S และ N8-P ตามลำดับ โดยที่ N8 ปกติไม่มีการเกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้นเลย

ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ (เชิดศักดิ์, ไม่ได้เผยแพร่) และ งานวิจัยของ สุรีรัตน์ติพร รัตนะ (สุรีรัตน์ติพร, 2011) ดังนั้นผลของการแหล่งอาหารไนโตรเจนในปริมาณต่ำทำให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูง และการขาดแหล่งอาหารฟอสฟอรัสก็ทำให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เช่นกันเพราะสาหร่ายจะมีการสะสมแป้งตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยทำให้มีการหายใจลดลงและการผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Kosourov และคณะ, 2007)

และเนื่องจากพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถผลิตได้แต่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังนั้นการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในสภาวะที่มีออกซิเจน ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 ข้อเสนอแนะ

1. อาจมีศึกษาเพิ่มเติมถึงอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ต่อเวลา (Time cross) ของอาหาร N8-N, N8-P, N8-N-P, N8-P-S และ N8-N-P-S
2. อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอิทธิพลของการเติมสารเคมีบางชนิดที่จะไปเพิ่มความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ยกตัวอย่างเช่น สารที่ทำหน้าที่เป็น reducing agent เป็นต้น
3. อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสมบัติทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ยกตัวอย่างเช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิการบ่ม ค่าOD เริ่มต้นของสาหร่าย เป็นต้น ในอาหาร N8 และ N8 ที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ
4. อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอิทธิพลของการแทนที่ด้วยเกลือในสูตรอาหาร N8 ที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ ที่อาจมีผลกับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551
5. อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอิทธิพลของสารเคมีในส่วนประกอบของอาหาร TAP และ N8 ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์. 2554. “การคัดกรองสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนและการปรับภาวะให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี , จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรัตน์ติพร รัตนะ. 2554. “การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *SCENEDESMUS* SP. KMITL-O1.”วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ , สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รัชนีกร วันจันทึก. 2554. **ก๊าซไฮโดรเจน : ความคาดหวังเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน.** [Online]. Available : www.sci.buu.ac.th/research/downloads/journal/2554-1/2554-1-15.pdf

ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม. ม.ป.ป. **บทปฏิบัติการที่ 3 การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่าย.** [Online]. Available : www.fishtech.mju.ac.th/fishNew1/OSS/files/TmBcVkLThu30003.pdf

ขนิษฐา หมู่โสภิญ. 2553. **ไบโอไฮโดรเจน พลังงานทางเลือกใหม่.** [Online]. Available : home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553/3.pdf

อาภารัตน์ มหาขันธ์. 2556. **สาหร่าย แหล่งพลังงานทางเลือกในอนาคต.** [Online]. Available : http://ostc.thaiembdc.org/13th/blog/archives/1303

Ankita Juneja 1, Ruben Michael Ceballos 2 and Ganti S. Murthy 1,*. 2013. **Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production:A Review.** [Online]. Available : www.mdpi.com/journal/energies

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

1. อาหาร N8 (Vonshak, 1986)

2. อาหาร N8-N

3. อาหาร N8-P

4. อาหาร N8-S

5. อาหาร N8-N-P

6. อาหาร N8-N-S

7. อาหาร N8-P-S

8. อาหาร N8-N-P-S

9. อาหาร TAP (Tris-Acetate-Phosphate medium) (Harris, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียม Stock สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CaCl_2.2H_2O$)	0.1322 g
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	($Na_2HPO_4.2H_2O$)	2.6 g
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	(K_2HPO_4)	7.4 g
โพแทสเซียมไนเตรท	(KNO_3)	10 g
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($FeCl_2.4H_2O$)	0.0557 g
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($MgSO_4.7H_2O$)	0.5 g
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์	($EDTA\text{-}Na_2.2H_2O$)	0.0818 g
โพแทสเซียมคลอไรด์ (สำหรับสูตร N8-N)	(KCl)	7.3731 g
โพแทสเซียมคลอไรด์ (สำหรับสูตร N8-P)	(KCl)	6.3339 g
โซเดียมคลอไรด์	(NaCl)	1.9602 g
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	($MgCl_2.6H_2O$)	0.4066 g
ปรับด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 mL ในแต่ละตัว		
*ส่วนผสม Trace element สำหรับ N8		
อลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต	($Al_2(SO_4)_3.18H_2O$)	0.0716 g
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($MnCl_2.4H_2O$)	0.2596 g
คิวปริกซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	($CuSO_4.5H_2O$)	0.0366 g
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($ZnSO_4.7H_2O$)	0.0640 g
*ส่วนผสม Trace element สำหรับ N8-S		
อลูมิเนียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	($AlCl_3.6H_2O$)	0.0531 g
คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CuCl_2.2H_2O$)	0.0256 g
ซิงค์คลอไรด์	($ZnCl_2$)	0.0300 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($MnCl_2.4H_2O$)	0.2596 g

ส่วนผสม Trace element ปรับด้วยน้ำกลั่นเป็น 20 mL ในแต่ละตัว

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8

สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CaCl_2.2H_2O$)
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	($Na_2HPO_4.2H_2O$)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	(K_2HPO_4)
โพแทสเซียมไนเตรท	(KNO_3)
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($FeCl_2.4H_2O$)
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($MgSO_4.7H_2O$)
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์	(EDTA-$Na_2.2H_2O$)

ปิเปต stock ของสารแต่ละตัว อย่างละ 10 mL
ปิเปตส่วนผสม Trace element สำหรับ N8 แต่ละตัว ตัวละ 1 mL
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N

สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CaCl_2.2H_2O$)
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	($Na_2HPO_4.2H_2O$)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	(K_2HPO_4)
โพแทสเซียมคลอไรด์	(KCl)
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($FeCl_2.4H_2O$)
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($MgSO_4.7H_2O$)
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์	(EDTA-$Na_2.2H_2O$)

ปิเปต stock ของสารแต่ละตัว อย่างละ 10 mL
ปิเปตส่วนผสม Trace element สำหรับ N8 แต่ละตัว ตัวละ 1 mL
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8-P

สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CaCl_2.2H_2O$)
โซเดียมคลอไรด์	(NaCl)
โพแทสเซียมคลอไรด์	(KCl)
โพแทสเซียมไนเตรท	(KNO_3)
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($FeCl_2.4H_2O$)
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($MgSO_4.7H_2O$)
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์	(EDTA-$Na_2.2H_2O$)

ปิเปต stock ของสารแต่ละตัว อย่างละ 10 mL

ปิเปตส่วนผสม Trace element สำหรับ N8 แต่ละตัว ตัวละ 1 mL

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8-S

สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CaCl_2.2H_2O$)
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	($Na_2HPO_4.2H_2O$)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	(K_2HPO_4)
โพแทสเซียมไนเตรท	(KNO_3)
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($FeCl_2.4H_2O$)
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	($MgCl_2.6H_2O$)
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์	(EDTA-$Na_2.2H_2O$)

ปิเปต stock ของสารแต่ละตัว อย่างละ 10 mL

ปิเปตส่วนผสม Trace element สำหรับ N8-S แต่ละตัว ตัวละ 1 mL

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-P

สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CaCl_2.2H_2O$)
โซเดียมคลอไรด์	(NaCl)
โพแทสเซียมคลอไรด์	(KCl)
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($FeCl_2.4H_2O$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ ($EDTA\text{-}Na_2.2H_2O$)
ปิเปต stock ของสารแต่ละตัว อย่างละ 10 mL
ปิเปตส่วนผสม Trace element สำหรับ N8 แต่ละตัว ตัวละ 1 mL
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-S

สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_2O$)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$)
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$)
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ ($EDTA\text{-}Na_2.2H_2O$)
ปิเปต stock ของสารแต่ละตัว อย่างละ 10 mL
ปิเปตส่วนผสม Trace element สำหรับ N8-S แต่ละตัว ตัวละ 1 mL
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8-P-S

สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($FeCl_2.4H_2O$)
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2.6H_2O$)
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์ ($EDTA\text{-}Na_2.2H_2O$)
ปิเปต stock ของสารแต่ละตัว อย่างละ 10 mL
ปิเปตส่วนผสม Trace element สำหรับ N8-S แต่ละตัว ตัวละ 1 mL
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8-N-P-S

สารเคมี

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CaCl_2.2H_2O$)
โซเดียมคลอไรด์	(NaCl)
โพแทสเซียมคลอไรด์	(KCl)
เฟอริคคลอไรด์เตตระไฮเดรต	($FeCl_2.4H_2O$)
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	($MgCl_2.6H_2O$)
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์	(EDTA-$Na_2.2H_2O$)

ปิเปต stock ของสารแต่ละตัว อย่างละ 10 mL

ปิเปตส่วนผสม Trace element สำหรับ N8-S แต่ละตัว ตัวละ 1 mL

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP (Tris-Acetate-Phosphate medium)

สารเคมี

กรดบอริก	(H_3BO_3)	11.40 mg
เกลเซียลอะซิติกแอซิด	(Glacial Acetic Acid)	1 mL
คิวปริกซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	($CuSO_4.5H_2O$)	0.16 mg
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	($CaCl_2.2H_2O$)	0.05 g
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	($CoCl_2.6H_2O$)	0.17 mg
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($ZnSO_4.7H_2O$)	27.21 mg
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต	($NaMoO_4.2H_2O$)	0.75 mg
ทริส-ไฮดรอกซีเมทิล-อะมิโนมีเทน	(Tris(hydroxymethyl-aminomethane))	2.42 g
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	(K_2HPO_4)	0.10 g
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	(KH_2PO_4)	0.05 g
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($MgSO_4.7H_2O$)	0.10 g
แมงกานีสคลอไรด์ไดไฮเดรต	($MnCl_2.2H_2O$)	5.52 mg
เอทิลีนไดเอมีนไดโซเดียมซอลต์	(EDTA-$Na_2.2H_2O$)	0.05 g

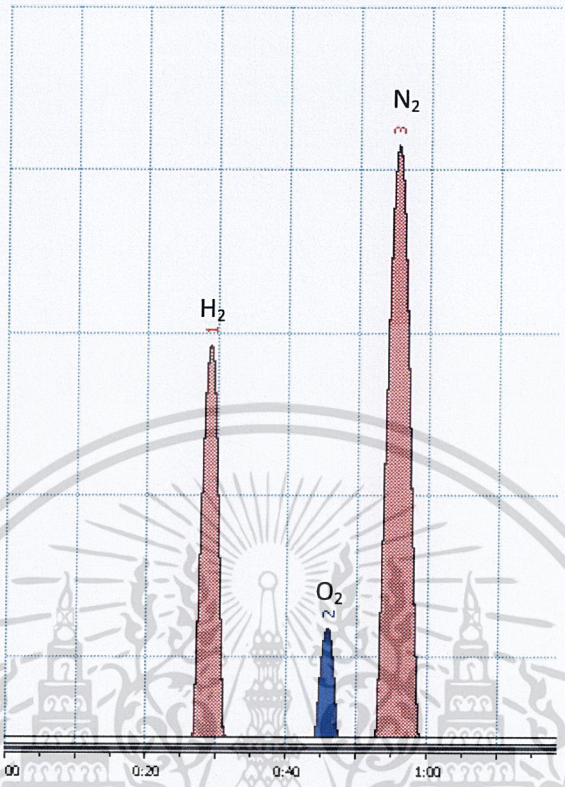
เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอมโมเนียมคลอไรด์	(NH_4Cl)	0.40 g
ไอร์ออนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	($FeSO_4.7H_2O$)	5.60 mg

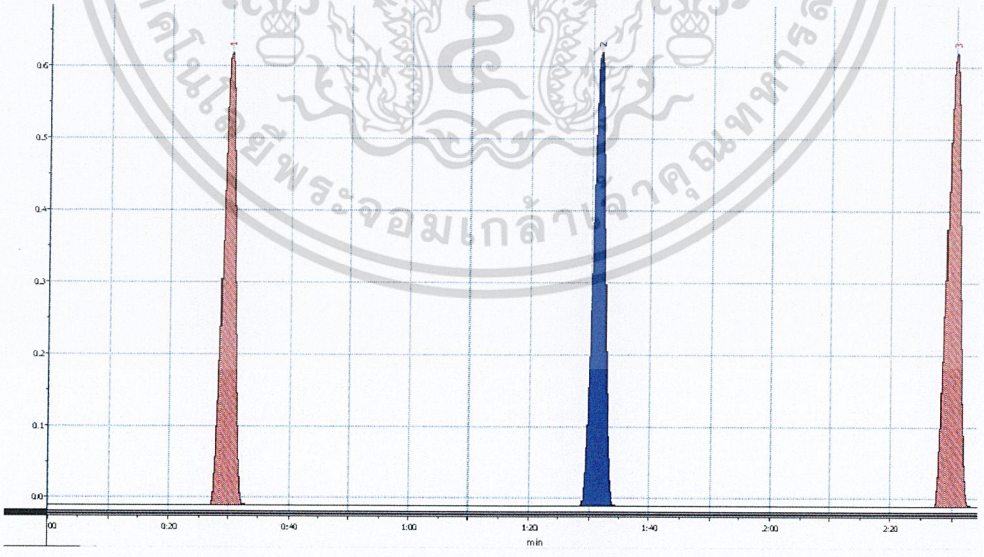
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค



รูปที่ ค 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซไฮโดรเจนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD



รูปที่ ค 2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4% ในอาร์กอนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GC-TCD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%)
2. นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
3. นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมลโดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล และเปลี่ยนเป็นหน่วย ไมโครโมล
4. หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ จากสมการ y=1.7915X ในหน่วย มิลลิกรัม (ค่า y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร)
5. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมง จะได้ปริมาณไฮโดรเจน ในหน่วย ไมโครโมลต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อชั่วโมง

ตัวอย่างการคำนวณ

ฉีดไฮโดรเจนมาตรฐาน 0.4 ml ได้พื้นที่ เท่ากับ 1445.90 mV.s

ฉีดตัวอย่าง(N8-N-P-S) 0.4 ml ได้พื้นที่ เท่ากับ 82.01 mV.s

1. หาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%)

ถ้าพื้นที่ 1445.90 mV.s จะเข้มข้น 4%

ถ้าพื้นที่ 82.01 mV.s จะเข้มข้น (82.01 mV.s x 4%)/1445.90 mV.s = 0.23%

2. ปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร

ถ้าปริมาตร 100 ml จะมี H_2 0.23 ml

ถ้าปริมาตร 9 ml จะมี H_2 (9 ml x 0.23 ml)/ 100 ml = 0.02 ml

* (ปริมาตรส่วนบนของขวด (head space) เท่ากับ 8 ml + ปริมาตรกระบอกฉีดยา เท่ากับ 1 ml) = 9 ml

3. ปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมล

ถ้า H_2 22.4 ml มีปริมาณ 1 mol

ถ้า H_2 0.02 ml มีปริมาณ (0.02 ml x 1 mol)/ 22.4 ml = 0.91 umol

4. หาน้ำหนักแห้งของเซลล์

จากสมการ y=1.7915X ในหน่วย มิลลิกรัม

* (ค่า y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร , ค่า X คือ น้ำหนักแห้งของเซลล์)

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เท่ากับ 0.218

ดังนั้น น้ำหนักแห้งของเซลล์ เท่ากับ (0.218 / 1.7915) x 5 = 0.61 mg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

* ปริมาณสาหร่ายในขวดแก้วเก็บก๊าซ (gas-tight vial) เท่ากับ 5 ml

5. ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง

ปริมาณ H_2 0.91 umol /4 hr จะเท่ากับ 0.23 umol / hr

*ใช้เวลาในการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

6. ปริมาณไฮโดรเจนในหน่วย ไมโครโมลต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อชั่วโมง

จะได้ว่า 0.23 umolH_2 / 0.61 mgDW / hr เท่ากับ 0.377 umolH_2 / mgDW / hr

หรือ 377.59 nmolH_2 / mgDW / hr

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้