



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลในประเทศไทย
Hydrogen Production by Cyanobacteria Isolated from
Seawater in Thailand



ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พุกักษ์

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘

คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลในประเทศไทย
Hydrogen Production by Cyanobacteria Isolated from
Seawater in Thailand



ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์
ศ.ดร.อรรณู อินเจริญศักดิ์

๕๓๖๕

๖๐๐๒๗๔๑๔๕

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลในประเทศไทย
 แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 499,000 บาท
 ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2558
 หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พุกษ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
 เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 ผู้ร่วมโครงการวิจัย ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเมื่อเผาไหม้ไฮโดรเจนจะให้ค่าพลังงานความร้อนสูง และก่อให้เกิดมลพิษในอากาศน้อยกว่าการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีในปริมาณมากและไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลฝั่งอันดามันและอ่าวไทยของประเทศไทย จากการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากน้ำทะเลของประเทศไทยได้ทั้งหมด 54 ไอโซเลท เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์พบว่าได้ไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์และปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียจำนวน 27 ไอโซเลท จากการศึกษาชนิดของไซยาโนแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าเป็นไซยาโนแบคทีเรียจีส *Geitlerinema*, *Phormidium*, *Leptolyngba*, *Pseudoanabeana* และ *Synnechococcus* ในบรรดาไอโซเลททั้งหมด ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวไอโซเลท P-SH8.2.1 และ ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายไอโซเลท RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อบ่มเซลล์ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ ที่พีเอชเท่ากับ 8 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไซโตเคมีนไนเตรท และมีความเข้มข้นของไซโตเคมีนคลอไรด์เท่ากับ 0.25 โมลาร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 0-1.5 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของ Fe^{3+} 4 ไมโครโมลาร์ และ ความเข้มข้นของ Ni^{2+} 0-0.1 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงถึง 189 มิลลิโมลาร์บอนต่อลิตร ส่งผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท RMK-SH10 สูงขึ้น แต่การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 ลดลง นอกจากนี้ ยังพบว่า สามารถนำน้ำทะเลมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 เพื่อการผลิตไฮโดรเจนได้

คำสำคัญ: การผลิตไฮโดรเจน ไซยาโนแบคทีเรีย น้ำทะเล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Biohydrogen production by microalgae isolated from the rice paddy field in Thailand

Researchers: (1) Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch, Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (2) Prof. Dr. Aran Incharoensakdi, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Nowadays, Hydrogen is one of the alternative interesting energy sources because the H₂ combustion provides a high heating value and causes less air-pollution than that of other fossil fuels. Cyanobacteria and green algae are able to produce H₂ via a photosynthetic pathway by using unlimited sunlight as an energy source. This research aims to study hydrogen production by cyanobacteria isolated from seawater in Andaman Sea and the Gulf of Thailand. The result showed that a total of 54 cyanobacterial isolates were isolated from seawater in Thailand. Out of them, 27 isolates were purified. By 16S rDNA sequencing analysis they were identified as cyanobacteria in Genus *Geitlerinema*, *Phormidium*, *Leptolyngba*, *Psuedoanabeana*, and *Synnechococcus*. Among them the unicellular cyanobacterial isolate P-SH8.2.1 and the filamentous cyanobacterial isolate RMK-SH10 showed the highest H₂ production when cultivated 1 week old cells at pH8 and at temperature 30 °C under dark anaerobic condition. In addition, the highest H₂ production by cyanobacterial isolates P-SH8.2.1 and RMK-SH10 was found when cultivated cells in NaNO₃-free ASNIII medium containing 0.25 M NaCl, 0-1.5 mM MgSO₄·7H₂O, 4 μM Fe³⁺ and 0-0.1 μM Ni²⁺. High concentration of glucose at 189 mmolC L⁻¹ resulted in an increase of H₂ production by RMK-SH10 but it decreased the H₂ production by P-SH8.2.1. Finally, it was found that P-SH8.2.1 and RMK-SH10 can grow in seawater supplemented with Turk Island salt solution containing 17.6 mM NaNO₃ and their H₂ production was highest when incubating cells in Nitrate-free medium, suggesting the possibility of natural seawater utilization for growth and H₂ production in P-SH8.2.1 and RMK-SH10.

Keywords: H₂ production, Cyanobacteria, Seawater

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลในประเทศไทย ดำเนินงานจนสามารถสำเร็จจุลวงไปด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘ คณะผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโท และ เอก ในกลุ่มวิจัยที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำการทำวิจัยให้สำเร็จจุลวงเป็นอย่างดี

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ไฮโดรเจน	5
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	6
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	9
2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย	10
2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน	13
2.6 ไซยาโนแบคทีเรีย	17
2.7 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
3.1 ไซยาโนแบคทีเรีย	28
3.2 สารเคมี	30
3.3 อุปกรณ์	32
3.4 วิธีการคัดแยกเชื้อและทดสอบความบริสุทธิ์	32
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย	33
3.6 วิธีการศึกษาชนิดของไซยาโนแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rDNA	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 วิธีการวัดการเจริญเติบโต	36
3.8 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์	36
3.9 วิธีการวัดปริมาณเซลล์แห้ง	36
3.10 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจน	36
3.11 วิธีการศึกษาการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง	37
3.12 วิธีการศึกษาผลของชนิดอาหารต่อการเจริญเติบโตในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก	37
3.13 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก	38
3.14 วิธีการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก	38
3.15 วิธีการศึกษาผลอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก	38
3.16 วิธีการศึกษาผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก	39
3.17 วิธีการศึกษาผลความเค็มที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก	39
3.18 วิธีการศึกษาผลของแหล่งอาหารและความเข้มข้นของแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจน	39
3.19 วิธีการศึกษาการเพาะเลี้ยงของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารน้ำทะเล เพื่อการผลิตไฮโดรเจน	40
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	41
4.1 ผลการคัดแยกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทะเลในประเทศไทย	41
4.2 ผลการศึกษาชนิดของไซยาโนแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	55
4.3 ผลการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง	59
4.4 ผลของชนิดของอาหารต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	66
4.6 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	67
4.7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	69
4.8 ผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	70
4.9 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	71
4.10 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโน แบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	72
4.11 ผลของความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	74
4.12 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	75
4.13 ผลของความเข้มข้นของเหล็กไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	76
4.14 ผลของความเข้มข้นของนิกเกิลไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10	78
4.15 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทะเลมาใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโน แบคทีเรีย P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน	79
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	83
บรรณานุกรม	85
ภาคผนวก	88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	11
3.1	35
3.2	35
3.3	37
4.1	42
4.2	45
4.3	58
4.4	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า	
2.1	การเปรียบเทียบพลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ	2
2.2	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	7
2.3	กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ	8
2.4	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง	12
2.5	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียด้วยกระบวนการตรึงไนโตรเจน	13
2.6	องค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส	14
2.7	กระบวนการออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนโดยเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส	16
2.8	องค์ประกอบของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส	16
2.9	ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย	18
2.10	ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์รูปร่างเป็นเส้นสาย	19
2.11	การแตกแขนงแท้และการแตกแขนงเทียมของเซลล์	20
2.12	องค์ประกอบภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย	22
2.13	เซลล์อะคีนีท (Akinete) และเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst) ของไซยาโนแบคทีเรีย	24
2.14	ลักษณะเส้นสายของ <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 ในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจน (N+) และไม่มีแหล่งไนโตรเจน (N-)	24
2.15	การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการเตรียมพาสเจอร์ปีปและการดูดเชื้อภายใต้กล้อง inverted microscope	25
2.16	การแยกเชื้อโดยการเพาะบนอาหารวุ้น	26
4.1	จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์	56
4.2	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์	57
4.3	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ในสภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์	63
4.4	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ในสภาวะที่ปราศจากอากาศในที่สว่างเป็นเวลา 1 สัปดาห์	63
4.5	การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 ในอาหาร BG11, BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ ASNIII	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.6	การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท RMK-SH10 โดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม) ในอาหาร BG11, BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ ASN III	65
4.7	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์	67
4.8	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ	68
4.9	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่ป่มที่อุณหภูมิต่างๆ	69
4.10	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ในอาหาร ASN III ปราศจากไนโตรเจนในสภาวะไร้อากาศในที่มืดและมีแสง	71
4.11	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	72
4.12	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท	73
4.13	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	74
4.14	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส	76
4.15	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของ Fe^{3+}	77
4.16	การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของ Ni^{2+}	79
4.17	การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	80
4.18	การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท RMK-SH10 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

- 4.19 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่มีโซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ และอาหารน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท 81



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบัน อาจกล่าวได้ว่าพลังงานเป็นสิ่งที่ยังจำเป็นต่อการดำรงชีวิต โดยพลังงานที่นิยมนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคม และการผลิตกระแสไฟฟ้านั้น ส่วนใหญ่ได้มาจากแหล่งพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ได้แก่ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และ น้ำมันดิบ เป็นต้น แหล่งพลังงานเหล่านี้เป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด หากมนุษย์ใช้พลังงานอย่างอย่างฟุ่มเฟือย แหล่งพลังงานเหล่านี้ก็จะหมดลงอย่างรวดเร็ว จากการสำรวจปริมาณพลังงานทรัพยากรเชื้อเพลิงสำรองภายในประเทศไทยพบว่า มีปริมาณน้ำมัน 0.714 พันล้านบาร์เรล ซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 20 ปี มีปริมาณก๊าซธรรมชาติ 33 ล้านล้านลูกบาศก์ฟุต ซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 30 ปี และมีปริมาณถ่านหิน 0.984 พันล้านตัน ซึ่งใช้ได้ อีกประมาณ 60 ปี ประเทศไทยมีการนำเข้าพลังงานคิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการนำเข้าสินค้าทั้งหมด ซึ่งพลังงานที่นำเข้าส่วนใหญ่คือ น้ำมันเชื้อเพลิง นอกจากนี้ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้ยังก่อให้เกิดมลพิษ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เถ้า และ ฝุ่นละออง เป็นต้น ซึ่งส่งผลทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ เกิดความร้อนเกิดก๊าซเรือนกระจกและ ฝนกรด ดังนั้น เพื่อป้องกันปัญหาการขาดแคลนพลังงานในอนาคต หน่วยงานต่างๆ จึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่จะต้องคิดค้น แสวงหา พลังงานทดแทนหรือพลังงานหมุนเวียนรูปแบบใหม่ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมาทดแทนการใช้พลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล พลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน คือ พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน

พลังงานไฮโดรเจน เป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันเนื่องมาจาก พลังงานไฮโดรเจนให้ค่าความร้อนจากการเผาไหม้สูงถึง 141.6 กิโลจูลต่อกรัม ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี และไม่มีกลิ่น เมื่อทำการเผาผลาญไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ไฮโดรเจนในอากาศจะได้ออกไซด์ของไฮโดรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าการเผาไหม้เชื้อเพลิง อื่นๆ ไฮโดรเจนมีค่าพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้สูงกว่าค่าพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้น้ำมันเชื้อเพลิงถึง 3 เท่า การผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสตีร์ฟอร์มมิง (Steam reforming) การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Water electrolysis) และการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (Thermochemistry) ซึ่งในการผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลโดยวิธีสตีร์ฟอร์มมิงเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม แต่มีข้อเสียคือ ยังคงต้องใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งมีอยู่ในปริมาณที่จำกัดเป็นวัตถุดิบ ส่วนการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้านั้นต้องใช้ความดันสูงและมีความเสี่ยงต่อการระเบิดสูง ทำให้มีการคิดค้นและพัฒนาการนำไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตมาใช้ประโยชน์ ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิต เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียกว่า “ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถผลิตไฮโดรเจน ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก สาหร่ายสีเขียว และ ไซยาโนแบคทีเรีย ในปัจจุบัน มีความสนใจการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียเป็นอย่างมาก เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้พลังงานแสงและน้ำที่มีอยู่ในปริมาณมากมายใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหมัก ในสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย การผลิตก๊าซไฮโดรเจนอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) แต่สำหรับไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรานั้นจะสูญเสียกิจกรรมภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนจัดเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ส่วนเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะพบในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ดังนั้น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจ เนื่องจากมีกลไกการผลิตที่หลากหลายและผลิตได้จากหลายวิถี

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) ไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบสำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงในสภาวะที่มีแสง ในสภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์หรือแหล่งไนโตรเจน ไซยาโนแบคทีเรียจะเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ จนกระทั่ง เมื่อเซลล์เข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศ ไซยาโนแบคทีเรียจะนำเอนคาร์โบไฮเดรตที่สะสมไว้มาเปลี่ยนเป็นแหล่งอิเล็กตรอนเพื่อผลิตไฮโดรเจน ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสายที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (Heterocystous cyanobacteria) ไซยาโนแบคทีเรียแบบไม่เป็นเส้นสายและไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (Non-Heterocystous cyanobacteria) และ ไซยาโนแบคทีเรีนน้ำเค็ม (Marine cyanobacteria) จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเน้นทำการศึกษาในไซยาโนแบคทีเรีนน้ำจืด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากน้ำทะเล โดยมีรายงานว่าไซยาโนแบคทีเรีนน้ำเค็มที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น *Oscillatoria* sp. Miami BG7, *Calothrix scopulorum*, *Cyanothece* 7822, *Anabaena cylindrica* B-629, *Leptolyngbya valderiana* BLJ และ *Phormidium valderianum* เป็นต้น ในน้ำทะเล จะมีความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก เนื่องจากในน้ำทะเลมีแร่ธาตุที่สำคัญบางอย่างที่ใช้ในการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น คลอไรด์ โซเดียม ซัลเฟต แมกนีเซียม โบคาร์บอเนต แคลเซียม และ โพแทสเซียม เป็นต้น นอกจากนี้ น้ำทะเลมีอยู่ในปริมาณมหาศาลในโลกโดยคิดเป็น 96.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำบนผิวโลก ดังนั้น จึงคาดหวังว่าในน้ำทะเลจะพบไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน และยังสามารถประยุกต์ใช้น้ำทะเลซึ่งเป็นทรัพยากรที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในกรเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเพื่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลฝั่งอันดามันและอ่าวไทยของประเทศไทย โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน โดยแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แปรผันปริมาณไนโตรเจน ซัลเฟอร์ โซเดียมคลอไรด์ นิกเกิลและเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ แปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แปรผันอุณหภูมิ แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มแสง และมีการนำน้ำทะเลมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดแยก ศึกษาชนิดและความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากทะเลในประเทศไทย
2. คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก
4. ศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำทะเลในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่าง หิน ดิน ทราย และ น้ำทะเล จากทะเลฝั่งอ่าวไทยจำนวน 24 หาด คือ แหลมเสด็จ แหลมสิงห์ อ่าวกระทิง หาดเจ้าหลาว และ หาดคังวิมาน ที่อยู่ในจังหวัดจันทบุรี หาดแม่รำพึง หาดทรายแก้ว อ่าวไผ่ อ่าวซ้อ อ่าววงเดือน อ่าวปะการัง อ่าวหวาย อ่าวพร้าว อ่าวมะขามป้อม หาดทรายทอง หาดน้ำริน และ หาดปลา ที่อยู่ในจังหวัดระยอง เกาะกูด ที่อยู่ในจังหวัดตราด แสมสาร หาดนางรำ อ่าวดวงตาล หาดเตยงาม หาดทรายแก้ว และ หาดจอมเทียน ที่อยู่ในจังหวัดชลบุรี จากทะเลฝั่งอันดามันจำนวน 16 หาด คือ หาดฉางหลวง หาดเจ้าไหม หาดราชมงคล หาดสำราญ หาดมดตานอย หาดหยงหลิน หาดปากเมง และ หาดสัน ที่อยู่ในจังหวัดตรัง หาดคลองม่วง หาดนพรัตน์ธารา หาดยาว อ่าวนาง อ่าวน้ำเมา อ่าวท่าเลน แหลมกรวด และ สุสานหอย ที่อยู่ในจังหวัดกระบี่ นำตัวอย่างมาคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและทำให้ไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Single cell isolation เมื่อได้ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความบริสุทธิ์แล้ว ทำการศึกษาชนิดของไซยาโนแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สำหรับไซยาโนแบคทีเรีย และยีน 18S rDNA สำหรับสาหร่ายสีเขียว ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S-23S ITS และ cpcB-cpcA IGS จากนั้น เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและการผลิตไฮโดรเจนโดยแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แปรผันปริมาณไนโตรเจน ซัลเฟอร์ โซเดียมคลอไรด์ นิกเกิลและเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ แปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แปรผันอุณหภูมิ แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และความเข้มแสง สุดท้าย นำน้ำทะเลมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงชนิดและความหลากหลายของไฮยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากน้ำทะเลฝั่งอันดามันและอ่าวไทยของประเทศไทย ได้ไฮยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง รวมทั้งทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของไฮยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในระดับเขย่า รวมถึงสามารถ นำเอาน้ำทะเลมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

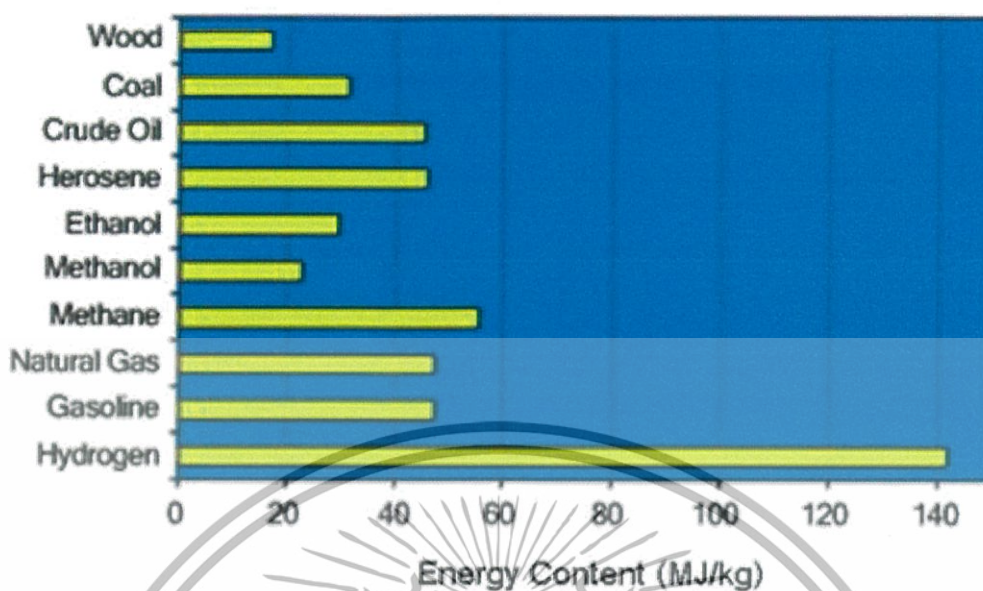
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

ในปัจจุบันนี้ อาจกล่าวได้ว่าพลังงานเป็นสิ่งที่ยำเป็นอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิต โดยพลังงานที่นิยมนำมาใช้ใน โรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคม และการผลิตกระแสไฟฟ้า ก็คือ พลังงานที่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และ น้ำมันดิบ ฯลฯ ซึ่งพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัดและคาดว่าจะหมดลงในอนาคตอันใกล้นี้ หากมนุษย์ยังคงใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือยและไม่คิดค้นหรือแสวงหาพลังงานทางเลือกอื่นๆ นอกจากนี้ การใช้พลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลดังกล่าวยังก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม ได้แก่ มลพิษทางอากาศจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่ไม่สมบูรณ์ การปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกต่างๆ ทำให้เกิดสภาวะโลกร้อน และการเกิดฝนกรด เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยจากทุกประเทศทั่วโลกจึงต้องทำการค้นคว้าและวิจัยพลังงานรูปแบบใหม่ ที่ให้พลังงานสูงและไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมาทดแทนพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

ไฮโดรเจน (H_2) เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 141.6 กิโลจูลต่อกรัม ซึ่งมากกว่าค่าพลังงานของน้ำมันเชื้อเพลิงถึง 3 เท่า (รูปที่ 2.1) ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี และ ไม่มีกลิ่น เมื่อทำการเผาผลาญไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ไฮโดรเจนในอากาศจะได้ออกไซด์ของไฮโดรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ ไฮโดรเจนสามารถติดไฟได้ แต่ไม่ได้ช่วยให้ไฟติด โดยจะต้องอาศัยออกซิเจนในการเผาไหม้ ไฮโดรเจนมีจุดติดไฟที่อุณหภูมิ 570 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าจุดติดไฟของแก๊สโซลีนที่อุณหภูมิประมาณ 500 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดที่ต่ำมากที่อุณหภูมิ -253 องศาเซลเซียส ไฮโดรเจนถือว่ามีอันตรายน้อยกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ เนื่องจากไฮโดรเจนเบากว่าอากาศ เมื่อเกิดการรั่วออกมา ไฮโดรเจนจะกระจายตัวขึ้นไปในอากาศอย่างรวดเร็ว และเมื่อเกิดการเผาไหม้ เปลวไฟจะขึ้นข้างบนและหมดไปอย่างรวดเร็ว การเผาไหม้ไฮโดรเจนเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีการแผ่รังสีความร้อนในระดับต่ำ ซึ่งต่างจากเบนซินและดีเซล โดยไอของเบนซินและดีเซลหนักกว่าอากาศ ทำให้มีการลุกไหม้อยู่นานกว่าด้วยคุณสมบัติของไฮโดรเจนที่ไม่เป็นพิษ ทำให้สามารถออกแบบระบบการใช้พลังงานไฮโดรเจนให้มีความปลอดภัยมากกว่าหรืออย่างน้อยเท่ากับระบบเครื่องยนต์แก๊สโซลีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 การเปรียบเทียบพลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ

ที่มา: <http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html>

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด ไม่ก่อมลพิษให้แก่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ในปัจจุบัน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถทำได้หลายกระบวนการ ซึ่งบางวิธีก็สามารถนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมและบางวิธีที่อยู่ในขั้นตอนของการวิจัยและพัฒนา กระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีดังนี้

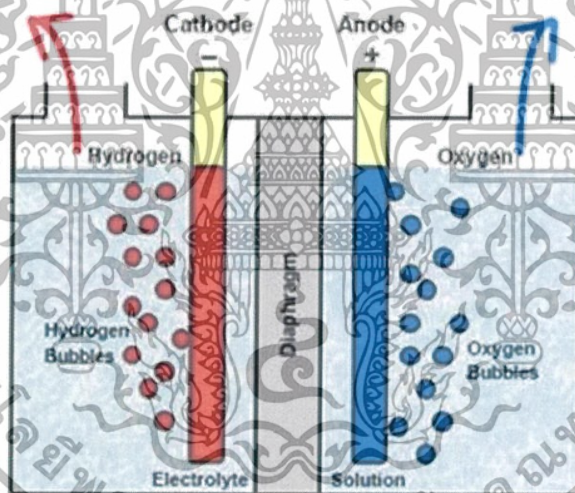
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ ซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมปิโตรเลียม การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลอาจเรียกว่ากระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (Steam reforming) เป็นปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือมีเทนกับน้ำในรูปไอน้ำ โดยอาศัยพลังงานความร้อน ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการสตีมรีฟอร์มมิงนี้นิยมใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรม ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากเกิดสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ และ ซัลเฟอร์ออกไซด์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าเป็นวิธีการในการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกโมเลกุลของน้ำ (Water electrolysis) โดยตรง ทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอม กระบวนการนี้อาศัยอิเล็กโทรด (Electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (Positive electrode) และ อิเล็กโทรดขั้วลบ (Negative electrode) วิธีการเตรียม คือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้ความเป็นตัวนำมากขึ้น โดยการเติมสารพวกอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไป ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวก (รูปที่ 2.2) วิธีนี้ต้องการกระแสไฟฟ้าถึง 90 กิโลวัตต์ และสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีควมบริสุทธิ์สูง แต่วิธีการนี้มีข้อเสีย คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมาก มีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำและจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

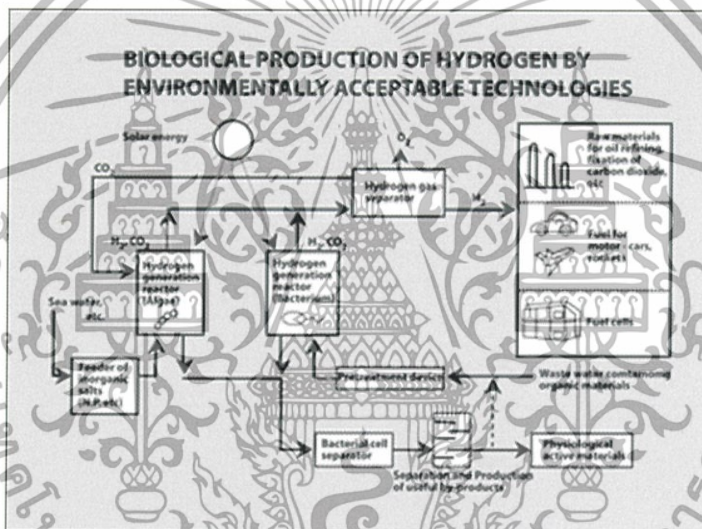
ที่มา: <http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php>

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (Thermochemistry) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สารประกอบปรอทโบรไมด์และแคลเซียมในปฏิกิริยา ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ สามารถนำความร้อนของถังปฏิกรณ์นิวเคลียร์มาผลิตไฮโดรเจนได้ โดยพลังงานทั้งหมดจึงจะถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่กระบวนการมีข้อเสีย คือ เกิดปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนัก อันได้แก่ ปรอท และ โบรไมด์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต

การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตเป็นกระบวนการทางชีวภาพ ที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการเมตาบอลิซึมวัตถุดิบต่างๆ จนได้ผลิตภัณฑ์หลักหรือผลิตภัณฑ์พลอยได้เป็นไฮโดรเจน (รูปที่ 2.3) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง แบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวสามารถใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Kosaric and Lyng, 1988)



รูปที่ 2.3 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ

ที่มา: <http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพนั้น จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนแบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ

2.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.3.1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Phototrophic bacteria)

แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะมีความสามารถในการสังเคราะห์แสง แต่จะไม่ได้ออกซิเจน เป็นผลิตภัณฑ์ (Anoxygenic phototrophic bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ฮ (1) แบคทีเรียสีม่วงที่ไม่สะสมกำมะถัน (Non-sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. (2) แบคทีเรียสีม่วงที่สะสมกำมะถัน (Sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. (3) แบคทีเรียสีเขียวที่สะสมกำมะถัน (Green sulfur bacteria) ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรงควัตถุที่แตกต่างจากรงควัตถุที่พบในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ ซัลเฟต ไรโอซัลเฟต สารประกอบอินทรีย์ หรือโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียในกลุ่มนี้ผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงไนโตรเจน

2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก (Dark fermentative Bacteria)

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เพื่อผลิตตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับใช้ในการผลิตไฮโดรเจน แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ในกลุ่มนี้ ยกตัวอย่าง เช่น *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *Dessulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* และ *Escherichia coli* เป็นต้น

2.3.2 ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) ไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยระบบแสงสำหรับการสังเคราะห์แสง 2 ระบบ และมีชนิดของคลอโรฟิลล์ที่คล้ายกับสาหร่ายสีเขียวและพืช กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับสาหร่ายโดยผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสงทั้งทางตรงและทางอ้อม นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* sp., *Calothrix* sp., *Mastigocladus* sp. และ *Nostoc* sp. เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสงถูกเรียกว่า Photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Codium* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำ เซลล์สาหร่ายจะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียเป็นที่น่าสนใจอย่างมาก เนื่องจากใช้พลังงานแสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียจะต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) หรือเป็นผลผลิตพลอยได้ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในสาหร่ายสีเขียวนั้น จะสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียในสภาวะที่มีออกซิเจนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และยังสามารถพบเอนไซม์ไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดอีกด้วย แต่ไม่สามารถพบเอนไซม์ไนโตรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียทำได้ง่ายสาหร่ายสีเขียว ดังนั้น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง

2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงแล้ว ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับพืช โดยผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสงทั้งทางตรงและทางอ้อม ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้ มีรายงานการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งเมื่อจัดแบ่งกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนตามลักษณะและถิ่นที่อยู่อาศัยสามารถแบ่งกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสาย (Heterocystous cyanobacteria) ไซยาโนแบคทีเรียไม่เป็นเส้นสาย (Non-Heterocystous cyanobacteria) และไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม (Marine cyanobacteria) (ตารางที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน

Heterocystous cyanobacteria	Non-Heterocystous cyanobacteria	Marine cyanobacteria
<i>Anabaena flos-aquae</i>	<i>Synechococcus</i> sp.	<i>Oscillatoria brevis</i>
<i>Anabaena cylindrica</i>	<i>Microcystis</i> sp.	<i>Oscillatoria limosa</i>
<i>Anabaena variabilis</i>	<i>Gloeobacter</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp. Miami BG7
<i>Anabaena azollae</i>	<i>Synechocystis</i> sp.	<i>Calothrix scopulorum</i>
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Aphanocapsa montana</i>	<i>Calothrix membranacea</i>
<i>Nostoc muscorum</i>	<i>Gloeocapsa alpicola</i> CALU 743	<i>Cyanothece</i> 7822
<i>Nostoc linckia</i>	<i>Chroococciopsis thermalis</i> CALU 758	<i>Anabaena cylindrica</i> B-629
<i>Nostoc commune</i>	<i>Microcystis</i> PCC 7806	<i>Leptolyngbya valderiana</i> BLJ
<i>Anabaenopsis circularis</i>	<i>Microcoleus chthonoplasts</i>	<i>Phormidium valderianum</i>

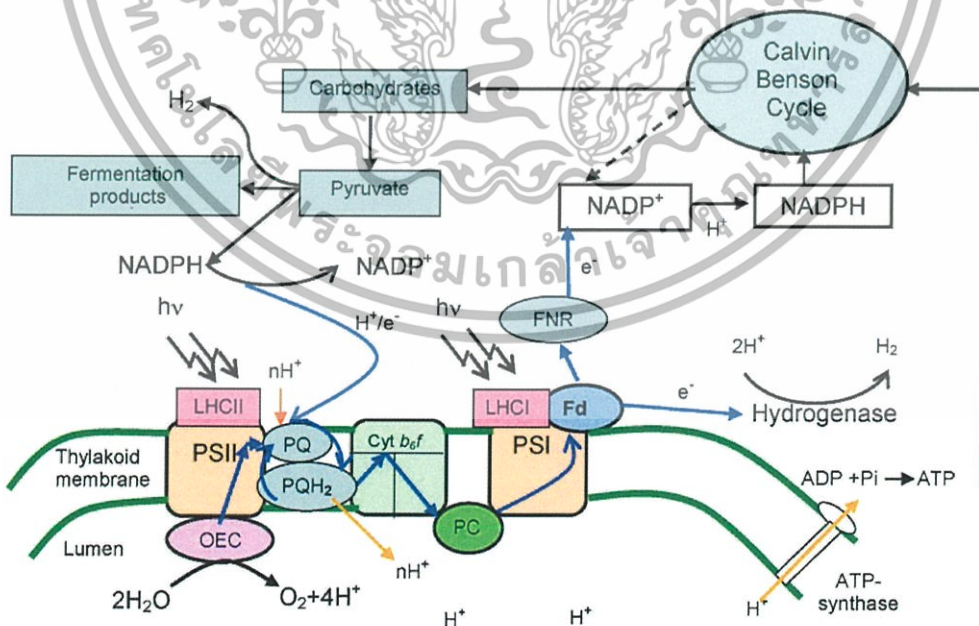
ที่มา: Tiwari and Pandey (2012)

ไชยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จาก 2 กระบวนการ ดังนี้

2.4.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง

ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของไชยาโนแบคทีเรีย เซลล์จะสร้างพลังงานในรูป ATP และผลิตสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation) สำหรับใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ หากไชยาโนแบคทีเรียมีพลังงานหรือสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนมากเกินไปเกินความต้องการ เซลล์จะสะสมสารเหล่านี้ในรูปของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น โกลโคเจน หรือ แป้ง ฯลฯ กระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นในบริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงของไชยาโนแบคทีเรีย จะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดทั้งแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) และ คลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll a) ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง จากนั้น จะส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีระดับพลังงานที่สูงขึ้น และพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงมาตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (Photosystem II; PSII) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนไปที่พลาสโตควิโนน (Plastoquinone; PQ) ต่อมา เมื่อน้ำมีการแตกตัวออกหรือที่เรียกว่า Water splitting ได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และ อิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนที่คลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไปในระบบ จากนั้น อิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครมบี6เอฟ (Cytochrome b6f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin; PC) และ เข้าไปยังระบบแสงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนึ่ง (Photosystem I; PSI) ระบบแสงหนึ่งจะประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อมีโฟตอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง (PSI) คลอโรฟิลล์จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (A : Primary electron acceptor of PSI) และส่งอิเล็กตรอนจนมาถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin; Fd) เมื่ออิเล็กตรอนออกจากเฟอร์รีดอกซินไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น กระบวนการผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงทางตรงอาจเรียกว่า Direct photolysis (รูปที่ 2.4) นอกจากนี้ พลังงานและสารที่ได้จากการสังเคราะห์แสง (ATP และ NADPH) จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-phosphate) จากนั้น จะเปลี่ยนเป็นกลูโคสโดยกระบวนการกลูโคเนอเจนิส (Gluconeogenesis) เมื่อกลูโคสภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เซลล์จะเก็บพลังงานสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรตในรูปไกลโคเจน ซึ่งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเกิดจากกระบวนการหมักนี้จะนำไกลโคเจนมาสลายได้เป็นกลูโคส เกิดกระบวนการหมักกลูโคสได้ผลผลิตเป็นไฮโดรเจนเรียกว่า กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบทางอ้อม (Indirect photolysis) (รูปที่ 2.4) (Yu and Takahashi, 2007) ดังสมการ

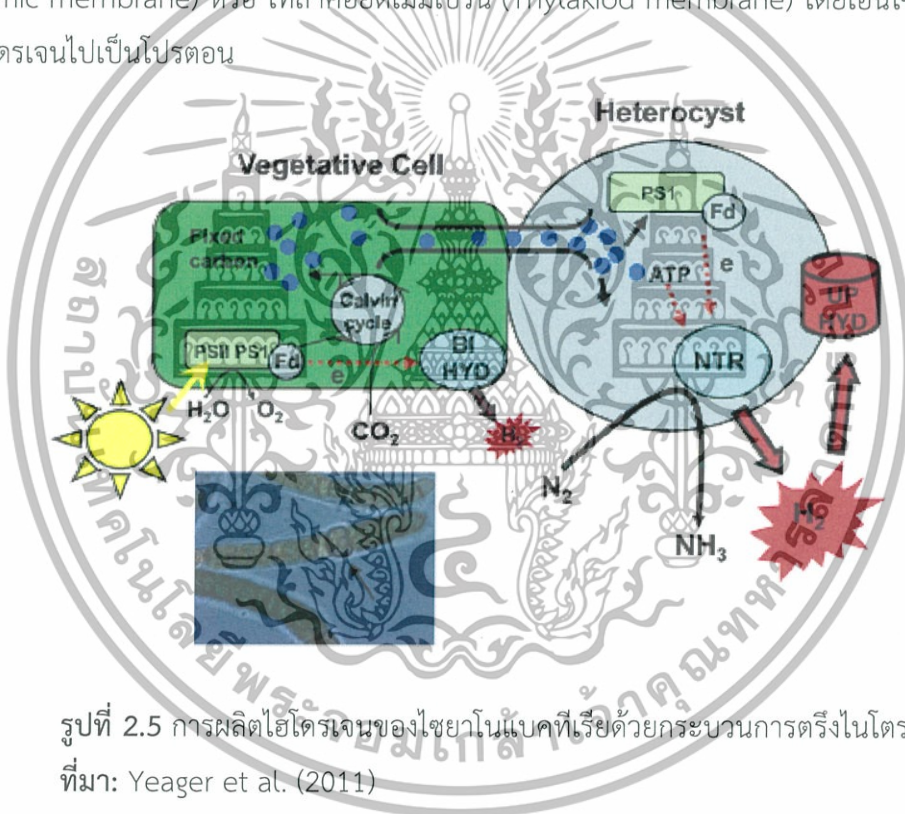


รูปที่ 2.4 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง
ที่มา: Allakhverdiev et al. (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการตรึงไนโตรเจน

ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่สร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst cell) นั้น ไม่มีระบบแสงที่สอง เซลล์เฮเทอโรซิสต์สามารถตรึงไนโตรเจนผ่านเอนไซม์ไนโตรจีเนสและผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด เซลล์จะทำการตรึงโมเลกุลไนโตรเจนพร้อมกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและผลิตกลูตามีน โดยกลูตามีนที่ผลิตได้จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเซลล์ปกติ (Vegetative cell) (รูปที่ 2.5) เนื่องจากเซลล์เฮเทอโรซิสต์นี้ไม่มีระบบแสงสอง จึงไม่เกิดกระบวนการแตกตัวของน้ำ ดังนั้น จึงไม่มีการสร้างก๊าซออกซิเจนที่จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เซลล์เฮเทอโรซิสต์จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์อะพแทคไฮโดรจีเนสหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Membrane bound hydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสซึมเมมเบรน (Cytoplasmic membrane) หรือ ไทลาคอยด์เมมเบรน (Thylakoid membrane) โดยเอนไซม์นี้จะรีดิวซ์โมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน



รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่สร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์
ที่มา: Yeager et al. (2011)

2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน

ไซยาโนแบคทีเรียมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน 2 ชนิด ดังนี้

2.5.1 ไนโตรจีเนส

เอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่สามารถตรึงไนโตรเจน เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกกระตุ้นการทำงาน เมื่อไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ขาดไนโตรเจน

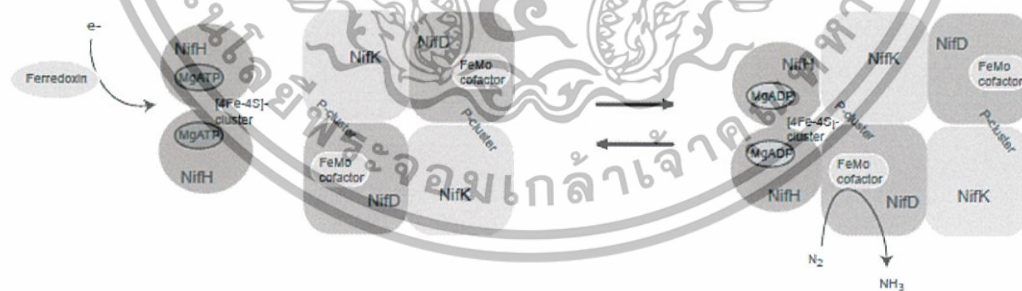
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญของกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรีดักชันของไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียและได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้

กลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย สามารถเขียนได้สมการที่ 1



เอนไซม์ไนโตรจีเนสจัดเป็นเอนไซม์คอมเพลกซ์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ 1) เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส (Dinitrogenase reductase) เอนไซม์นี้เป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protein) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากัน (Homodimer) คือมีขนาดประมาณ 60-70 กิโลดาลตัน หน่วยย่อยทั้งสองจะเข้าจับกับคลัสเตอร์ของ 4Fe-4S จำนวน 1 ชุด นอกจากนี้ ในแต่ละหน่วยย่อยยังจับกับ Mg-ATP จำนวน 1 บริเวณ 2) เอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (Dinitrogenase) เอนไซม์นี้เป็นโปรตีนที่ทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ (MoFe-protein) จึงสามารถเรียกชื่อเอนไซม์ชนิดนี้อีกชื่อหนึ่งว่าโมลิบดีนัมไดไนโตรจีเนส (Molybdenum hydrogenase) ประกอบด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (Heterotetramer) ที่มีขนาดประมาณ 220-250 กิโลดาลตัน เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสแต่ละหน่วยย่อยจะมีคลัสเตอร์ของ P (P-cluster) และศูนย์กลางโคแฟกเตอร์ FeMoco (7FeMo9S) โดย P-cluster หรือศูนย์กลาง 8Fe-7S ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็นช่องทางขนส่งอิเล็กตรอนที่มาจาก 4Fe-4S cluster ของ Fe-protein และส่งต่ออิเล็กตรอนให้กับศูนย์กลาง FeMoco ทำให้เกิดปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนโตรเจนขึ้นภายในศูนย์กลางของโคแฟกเตอร์ FeMoco (รูปที่ 2.6) (Triplett, 2000)



รูปที่ 2.6 องค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

ที่มา: Lindberg (2003)

เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ตามชนิดของโลหะในบริเวณกระตุ้น คือ 1) เอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนส (Molybdenum nitrogenase) 2) เอนไซม์วานาเดียมไนโตรจีเนส (Vanadium nitrogenase) และ 3) เอนไซม์เหล็กไนโตรเจนเนส เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จีเนส (Iron nitrogenase) เอนไซม์วานาเดียมไนโตรจีเนสและเหล็กไนโตรจีเนสจัดเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนสทางเลือก โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสทางเลือกนี้จะไม่ถูกสังเคราะห์ขึ้น เมื่อมีโมลิบดีนัมเพียงพอ แต่จะช่วยส่งเสริมกลไกการตรึงไนโตรเจนอย่างต่อเนื่องในสภาวะที่มีโมลิบดีนัมจำกัด

2.5.2 ไฮโดรจีเนส

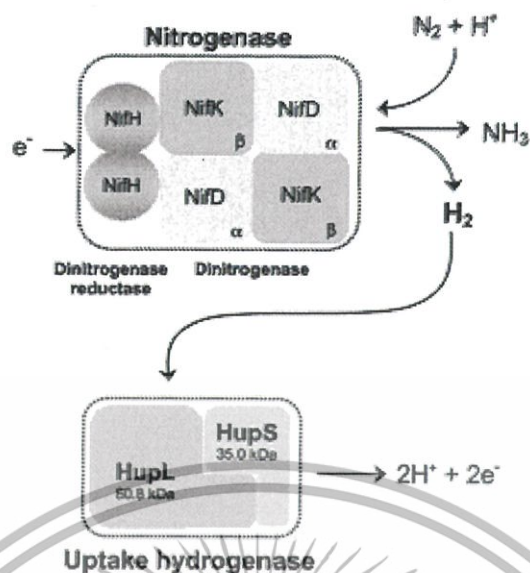
เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจน และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 2



เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

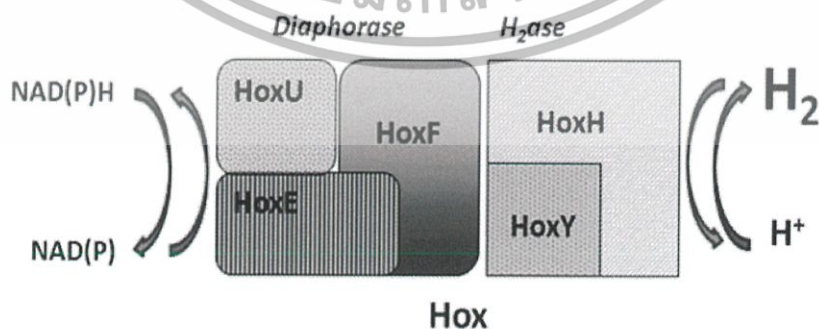
1) เอนไซม์ยูนิไดเรกชันนัลไฮโดรจีเนส (Unidirectional hydrogenase) หรือ อัฟเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน เอนไซม์นี้ส่วนใหญ่พบที่เมมเบรนไทลาคอยด์ของไซยาโนแบคทีเรียเส้นสาย โดยเป็นบริเวณที่มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งเป็นปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนผ่านทางกระบวนการหายใจหรือที่เรียกว่า Oxyhydrogenation หรือ Knallgas reaction เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสประกอบด้วยโปรตีนที่แตกต่างกัน 2 หน่วยย่อย (Heterodimeric) ได้แก่ โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (Large subunit) มีขนาดประมาณ 60.8 กิโลดาลตันซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* โดย *HupL* ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) 4 ตัว ที่จำเป็นสำหรับการจับกับบริเวณกระตุ้น และโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (Small subunit) มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน ซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupS* ประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ FeS ที่จับกับกรดอะมิโนซิสเทอีน หน่วยย่อยนี้ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนบริเวณกระตุ้นไปยังโปรตีนในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนหรือจาก Knallgas reaction จะเข้าสู่กระบวนการออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนโดยเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส (รูปที่ 2.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 กระบวนการออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนโดยเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส
ที่มา : Tamagnini (2002)

2) เอนไซม์ไบไดเรกชันนัลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) หรือ รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase) เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน สามารถพบทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงและไม่ตรึงไนโตรเจน เอนไซม์ประกอบด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (Heterotetrameric) มารวมกัน โดยที่สองหน่วยย่อยรวมกันเรียกว่า ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) และอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่า ไดอะฟอเรส (Diaphorase) หน่วยย่อยของไฮโดรจีเนสถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* (*hox* มาจาก *hydrogen-oxidation*) ส่วนหน่วยย่อยของไดอะฟอเรส ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* โดยทั้งสองส่วนทำหน้าที่ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ และ NAD(P)^+ (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 องค์ประกอบของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส
ที่มา: Hallenbeck (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

1. ไฮโดรจีเนสที่อยู่ในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (NiFe-hydrogenase)
2. ไฮโดรจีเนสที่อยู่ในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์เท่านั้น (Fe-hydrogenase)
3. ไฮโดรจีเนสที่ไม่พบโลหะใดเป็นองค์ประกอบในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Metal-free hydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นเอนไซม์ชนิดที่บริเวณกระตุ้นประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กอยู่ในศูนย์กลางบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ หรือ NiFe-hydrogenase เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Hallenbeck, 2012)

2.6 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอต เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่แตกต่างจากแบคทีเรีย คือ ไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ สามารถพบไซยาโนแบคทีเรียตามแหล่งน้ำ โดยชั้นอยู่ได้ทั่วทุกแห่งในโลก ทั้งน้ำจืด น้ำทะเล น้ำพุร้อน หรืออาจขึ้นรวมอยู่กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ทั้งพืชและสัตว์

2.6.1 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียมีองค์ประกอบภายในเซลล์ ดังนี้

2.6.1.1 สารสีสำหรับการสังเคราะห์ (Photosynthetic pigment)

รงควัตถุที่พบในไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วย 1) คลอโรฟิลล์ เอ 2) แคโรทีนอยด์ ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน แกมมา-แคโรทีน 3) แซนโทฟิลล์ ได้แก่ มิกโซ-แซนทิน ออสซิลลาแซนทิน ซีอาแซนทิน ลูเทออิน ฟลาวินิน อะฟานิโซฟิลล์ และ อะฟานินิน 4) ไฟโคบิลิน ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน และ ซีไฟโคอีริทริน

2.6.1.2 ผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ที่เรียกว่ามิวโคเปปไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Mucopolysaccharide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์ มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่า ซีท (Sheath) หุ้มอยู่ โดยรอบซีท นี้มีความหนางต่างกัน อาจมีสี หรือ ไม่มีสี หรือ แบ่งออกเป็นชั้นๆ

2.6.1.3 หนวด (Flagella)

ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา โดยทั่วไป ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (Gliding movement)

2.6.1.4 ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสง

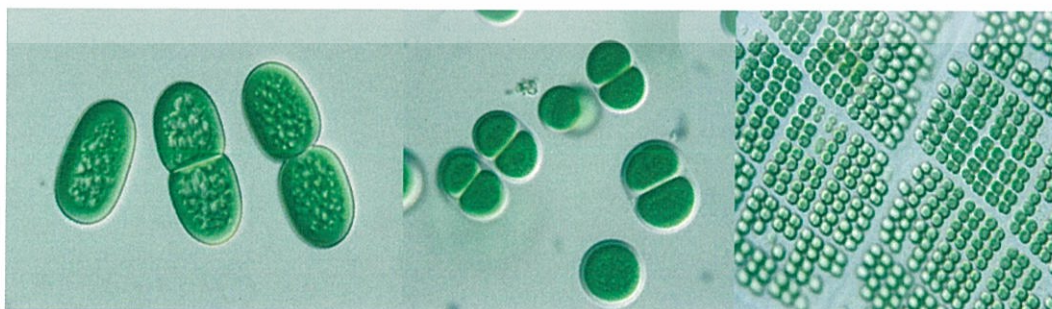
ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารประเภทแป้งชนิดหนึ่ง คือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (Cyanophycean starch) แป้งนี้มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปในไซยาโนไฟซินแกรนูล (Cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน จะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน

2.6.1.5 ลักษณะพิเศษประจำวิชัน

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่แตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอตคือ สารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติด แต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

2.6.2 โครงสร้างของเซลล์

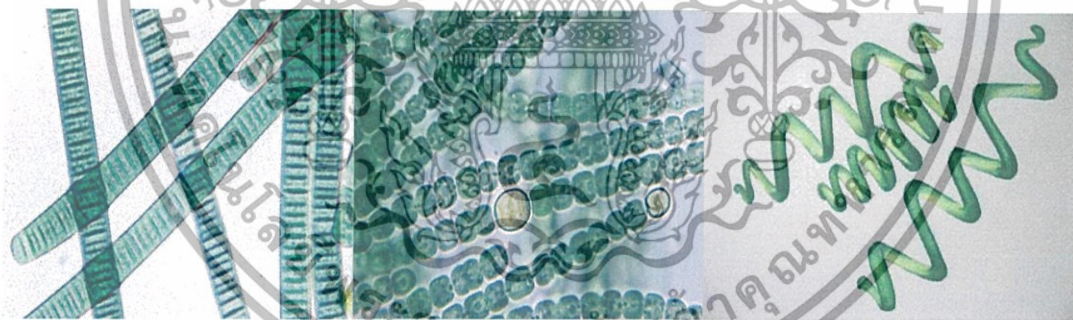
ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างเป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 เป็นเซลล์ที่ไม่มีหนวด หรือเรียกว่า คอคคอยด์ (Coccioid form) (รูปที่ 2.9) ซึ่งพบทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย (Single unicellular or Non filamentous form) และแบบพาลเมลลา (Palmella form) ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว ได้แก่ *Chroococcus* แบบพาลเมลลา ได้แก่ *Merismopedia*, *Eucapsis* และ *Anacystis* เป็นต้น เซลล์ของพวกนี้มีรูปร่างต่างๆ กัน เช่น กลม รูปไข่ ทรงกระบอก หรือ รูปไข่แบบแหลมหัวแหลมท้าย พวกที่อยู่เป็นโคโลนีแบบพาลเมลลาอาจมีลักษณะของโคโลนีกลมแบน สีเหลี่ยม หรือมีรูปร่างที่แน่นอนก็ได้ ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวมีการแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 จาก 2 เป็น 4 ซึ่งเป็นการแบ่งตัวแบบ Amitotic เช่น *Chroococcus* sp. และ *Microcystis* sp. เป็นต้น



รูปที่ 2.9 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซยาโนแบคทีเรียแบบที่ 2 มีรูปร่างเป็นเส้นสาย (Filamentous form) (รูปที่ 2.10) เซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสายที่เรียกว่า ตรีโคม (Trichome) เส้นสายนี้อาจจะตรงและเรียบ ไม่มีการแตกแขนงมีเซลล์ชนิดเดียวกันมาเรียงต่อกันเรียกว่า Homocystous form เช่น *Oscillatoria* และ *Lyngbya* เป็นต้น ส่วนเซลล์ที่เป็นเส้นสายที่มีเซลล์ปกติและมีเฮเทอโรซิสต์มาเรียงสลับหรืออยู่ที่ปลายสุดของตรีโคมเรียกว่า Heterocystous form เช่น *Nostoc* และ *Anabaena* เป็นต้น เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst) เป็นเซลล์ที่มีผนังหนา ภายในเซลล์ใสเป็นสีเหลืองจางๆ หากเกิดเฮเทอโรซิสต์ระหว่างเซลล์ปกติในเส้นสายจะเรียกตำแหน่งของเฮเทอโรซิสต์แบบนี้ว่า อินเตอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์ (Intercalary heterocyst) และหากเฮเทอโรซิสต์เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายหรือทั้งสองข้างจะเรียกตำแหน่งของเฮเทอโรซิสต์แบบนี้ว่า เทอร์มินัลเฮเทอโรซิสต์ (Terminal heterocyst) ซึ่งเฮเทอโรซิสต์แบบนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ชนิดแรก คือ เบซัลเฮเทอโรซิสต์ (Basal heterocyst) พบในเส้นสายของเซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากันตลอดทั้งสาย ส่วนมากมักเกิดติดกับเซลล์ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด พบในไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix* sp. ชนิดที่สอง เพดิเซลเลทเฮเทอโรซิสต์ (Pedicellate heterocyst) เกิดที่ปลายของแขนงสั้นๆ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพียง 1-3 เซลล์ และ ชนิดที่สาม แลทเทอรัลเฮเทอโรซิสต์ (Lateral heterocyst) เกิดข้างๆ เส้นสาย โดยแนบติดกับเซลล์ในเส้นสายนั้นๆ สามารถพบเพดิเซลเลทเฮเทอโรซิสต์และแลทเทอรัลเฮเทอโรซิสต์ได้ในไซยาโนแบคทีเรีย *Nostochopsis* sp. และบางชนิดเส้นสายนั้นอาจจะมีปลายโค้งงอหรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Arthrospira* และ *Spirulina* เป็นต้น (ยูวดี, 2546)



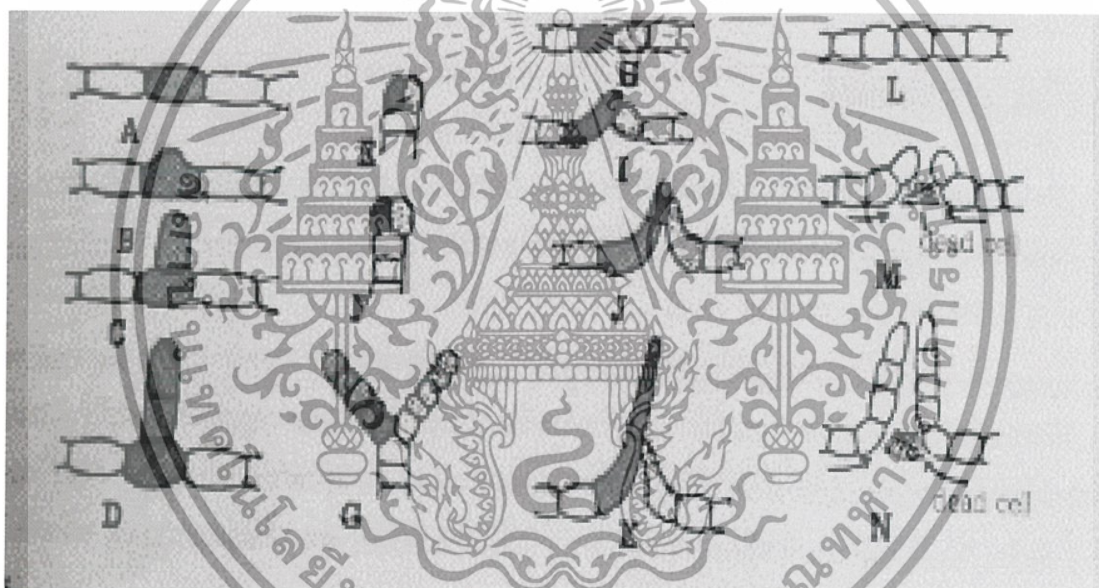
รูปที่ 2.10 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์รูปร่างเป็นเส้นสาย

ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายอาจมีทั้งเส้นสายที่ไม่แตกแขนง (Unbranched filament) ได้แก่ *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Anabaena* และ *Anabaenopsis* หรือเส้นสายที่แตกแขนง (Branched filament) โดยการแตกแขนงแบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ การแตกแขนงแท้ (True branching) และการแตกแขนงเทียม (False branching)

การแตกแขนงแท้ เป็นการแตกแขนงที่เกิดจากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในสายทำการแบ่งเซลล์ในแนวตั้งฉากกับแนวการแบ่งเซลล์ปกติ ซึ่งอาจแบ่งออกด้านข้างด้านเดียวหรือสองด้าน (รูปที่ 2.11 A-D) อีกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบคือเซลล์ปลายสุดของเส้นสาย (Apical cell) แบ่งตัวตามยาวขนานกับแนวแกน (Axis) ของเส้นสาย ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ หลังจากนั้น เซลล์ทั้ง 2 เซลล์จะแบ่งตัวต่อไปอีก ได้เป็นแขนงใหม่ตรงปลายเส้นเป็นคู่ (รูปที่ 2.11 E-G) และการแตกแขนงแท้แบบสุดท้ายเรียกว่า การแตกแขนงแบบตัววี “V” คว่า ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ตามปกติ หลังจากนั้น เซลล์ที่เกิดใหม่ 2 เซลล์จะยึดตัวแล้วดันออกไปทางเดียวกัน และจะแบ่งเซลล์ต่อไปอีกจนได้แขนงสั้นๆ ขนกัน จึงเกิดเป็นรูปตัว “V” คว่า (รูปที่ 2.11 H-K)

การแตกแขนงแบบเทียมเกิดจากเซลล์ในเส้นสายแบ่งตัวตามปกติ ให้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ผนังเซลล์ส่วนที่ชนกันจะโค้งมน หลังจากนั้น เซลล์ใหม่ทั้ง 2 เซลล์ หรือ เพียงเซลล์เดียว จะทำการแบ่งตัว เกิดเป็นแขนงใหม่ดันออกทางด้านข้างของสายเดิม เกิดเป็นแขนงเทียม ถ้าเจริญเพียงแขนงเดียว จะเรียกว่า แขนงเทียมเดี่ยว หากเจริญ 2 แขนง จะเรียกว่า แขนงเทียมคู่ (รูปที่ 2.11 L-N) การเกิดแขนงเทียมนี้ทำให้เกิดมีรอยขาดของซีทเดิม โดยเรียกรอยนี้ว่า โอครี (Ocrea)



รูปที่ 2.11 การแตกแขนงแท้และการแตกแขนงเทียมของเซลล์ (แขนงแท้โดยแตกแขนงด้านข้าง (A-D) แขนงแท้โดยแตกแขนง 2 แฉก (E-G) แขนงแท้โดยแตกแขนงเป็นรูปตัว “V” คว่า (H-K) และ แขนงเทียม (L-N)

ที่มา : ยูดิ (2546)

2.6.3 องค์ประกอบของเซลล์

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ออร์แกเนลล์ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียมีดังนี้ ผนังเซลล์และซีท เยื่อหุ้มเซลล์ ไฟโคพิลโลโซม ไโรโบโซม คาร์บอกซิโซม แก๊สแวคิวโอล ไทลาคอยด์ และ สารพันธุกรรม (รูปที่ 2.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3.1 ผนังเซลล์และชีท (Cell wall and sheath)

ไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยผนังเซลล์ 2 ชั้น ผนังเซลล์ชั้นนอก และ ผนังเซลล์ชั้นใน ซึ่งโครงสร้างของผนังเซลล์ภายนอกจะขึ้นอยู่กับสภาวะสิ่งแวดล้อมและจำนวนการขับสารเมือก ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเหมือนกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ โดยส่วนประกอบของผนังเซลล์ส่วนใหญ่จะเป็นพวกลิพิดโกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งเป็นร่างแหของคาร์โบไฮเดรตจับกับสายเปปไทด์ (peptide) สั้นๆ เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสีคริสตัลไวโอเลตจะติดสีม่วง (Peptidoglycan purple) และเซลล์รอบนอกมักจะมีเมือกใสๆ (Mucilage layer) เรียกว่า ชีท (Sheath) หรือ แคปซูล (Capsule) หุ้มอยู่โดยรอบ ชีทจะมีหน้าที่ป้องกันเซลล์ไม่ให้เกิดการแห้งจนเกินไปและเกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (Gliding movement) นอกจากนี้ ยังพบว่าชีทมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ขาดอาหารพบว่า ส่วนของชีทจะเปลี่ยนเป็นเซลล์พิเศษที่เรียกว่า สปอร์ (Resting spore) หรือ อะคีนีท (Akinete)

2.6.3.2 เยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane)

เยื่อหุ้มเซลล์จะห่อหุ้มไซโทพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์ ประกอบด้วยสารเคมีจำพวกโปรตีนและไขมัน

2.6.3.3 ไซโทพลาสซึม (Cytoplasm)

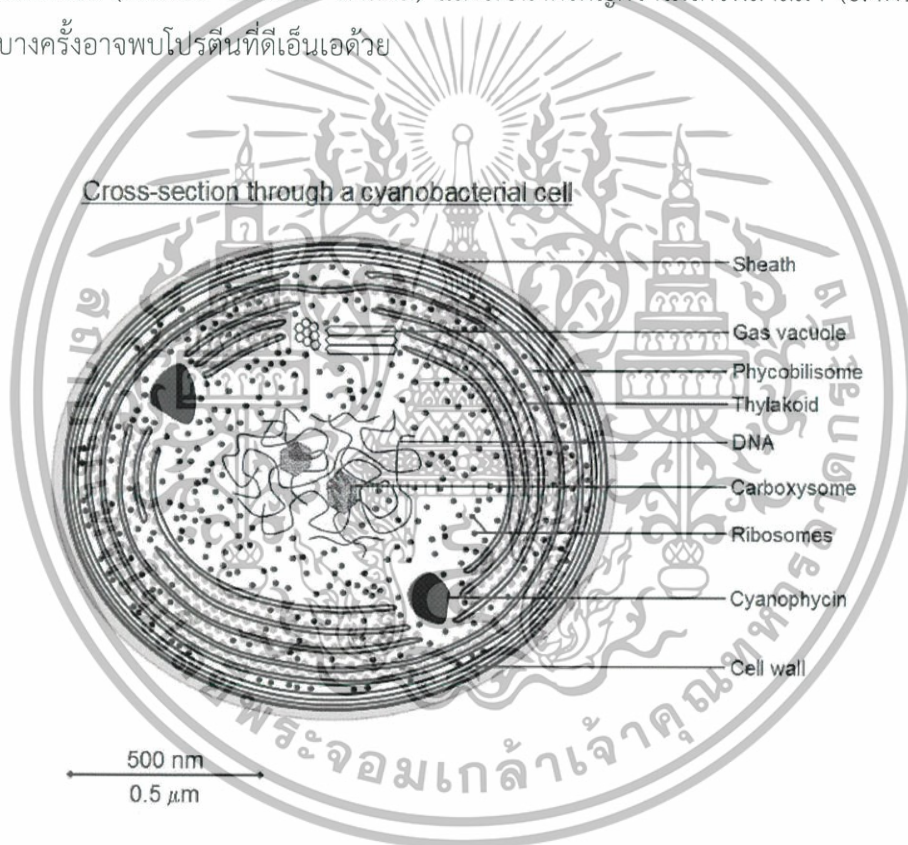
ไซโทพลาสซึมมีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มเรียงเป็นชั้น หรือ บางชนิดจัดเรียงเป็นวงที่เรียกว่า ลามลเล (Lamellae) ลามลเลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis lamellae) เป็นที่อยู่ของเม็ดสีไฟโคบิลิซอม (Phycobilisome) ประกอบด้วยเม็ดสี 2 ชนิด คือ เม็ดสีแดง คือ ไฟโคอีริทริน (Phycocerythrin) และ เม็ดสีน้ำเงิน คือ ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ซึ่งเม็ดสีทั้งสองจะอยู่รวมกันเป็นก้อนเรียกว่า ไซยาโนโซม (Cyanosome) หรือ ไฟโคบิลิซอม (Phycobilisome) ในไซโทพลาสซึม ยังพบอาหารสะสมจำพวกแป้งชนิดหนึ่ง คือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (Cyanophycean starch) ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปในไซยาโนไฟซินแกรนูล (Cyanophycin granule) นอกจากนี้ ยังพบคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll a) รงควัตถุสีเขียว และสารสีสำหรับการสังเคราะห์แสงอื่นๆ เช่น แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) รงควัตถุสีส้ม เป็นต้น

ในไซโทพลาสซึม พบไรโบโซมขนาด 70S กระจายอยู่ทั่วไป โดยจะพบมากที่สุดบริเวณศูนย์กลางรอบๆ นิวคลีโอพลาสซึม (Nucleoplasm) และมีแก๊สแวกิวโอล (Gas vacuole) ลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กกระจายอยู่ในไซโทพลาสซึม ถ้าส่องดูแก๊สแวกิวโอลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ จะเห็นเป็นเม็ดสีดำ แต่เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง จะเห็นเป็นเม็ดสีแดงเนื่องจากการสะท้อนแสงโดยทั่วไป แก๊สแวกิวโอลมีรูปร่างไม่แน่นอน แวกิวโอลที่มีก๊าซอยู่จะช่วยพยุงในการลอยตัว ทำให้รับแสงได้ดี ในไซโทพลาสซึม มีถุงเยื่อหุ้มที่บรรจุเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation) เรียกว่า คาร์บอกซิโซม (Carboxysome) มีขนาด 200-300 นาโนเมตร ประกอบด้วยเอนไซม์ที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการทำงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง และ กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น RuBisCO (Ribulose - 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) เป็นต้น นอกจากนี้ มีการสะสมพอลิเมอร์ คาร์โบไฮเดรต และ โปรตีน รวมทั้ง อนินทรีย์ฟอสเฟต เพื่อทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานหรือวัตถุดิบของการสังเคราะห์กรด นิวคลีอิกและพอลิฟอสโฟลิปิด

2.6.3.4 สารพันธุกรรม

ไซยาโนแบคทีเรียมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอที่ไม่มีโปรตีนฮีสโตนเกาะอยู่ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส สารพันธุกรรมจะอยู่ในบริเวณที่เรียกว่า นิวคลีอยด์ (Nucleoid) สารพันธุกรรมจะเป็นดีเอ็นเอวงแหวนเกลียวคู่ มีขนาดประมาณ 1.6×10^9 - 8.6×10^9 ดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอในแบคทีเรีย (1.0×10^9 - 1.6×10^9 ดาลตัน) และมีขนาดใหญ่กว่าไมโครพลาสมา (0.4×10^9 - 0.5×10^9 ดาลตัน) บางครั้งอาจพบโปรตีนที่ดีเอ็นเอด้วย



รูปที่ 2.12 องค์ประกอบภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : <http://cronodon.com/BioTech/Cyanobacteria.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.4 เซลล์พิเศษ (Specialized Cell)

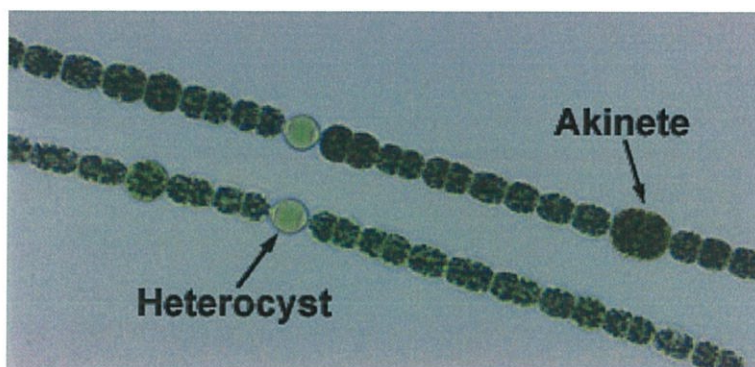
2.6.4.1 เซลล์อะคินีท (Akinete cell)

เซลล์อะคินีท (Akinete หรือ Resting spore) เป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์ปกติ (Vegetative cell) เพื่อทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ เซลล์อะคินีทมีผนังเซลล์หนา มีโรโบโซม และอาหารสะสมพวกไคยาโนไฟซิน ไกลโคเจน ไขมัน และสารสีจำพวกแคโรทีนอยด์ อยู่ในเซลล์ (รูปที่ 2.13) เซลล์อะคินีทที่เจริญเต็มที่จะมีขนาดที่ใหญ่กว่าเซลล์ปกติมาก โดยจะประกอบด้วยโปรโตพลาซึมที่อุดมไปด้วยการสะสมอาหารในปริมาณสูง และมีผนังเซลล์ปกติที่ล้อมรอบด้วยโค้ท (Coat) ถึง 3 ชั้น ทำให้เซลล์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และเมื่อเซลล์อะคินีทอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เซลล์จะสามารถเจริญต่อไปได้ โดยส่วนใหญ่ พบว่าจะมีเซลล์อะคินีทเรียงตัวอยู่ใกล้ๆ กับเฮเทอโรซิสต์ ในไคยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะพบเซลล์อะคินีทใน Order Nostocales และ Stigonematales เช่น *Nostoc* sp. *Gloeotrichia* sp. และ *Anabeana* sp. เป็นต้น (Lee, 2004)

2.6.4.2 เซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst cell)

เซลล์เฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์พิเศษที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน และเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ ภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายชนิด เนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์ เอ เซลล์เฮเทอโรซิสต์อาจเกิดอยู่ระหว่างเซลล์ปกติในเส้นสาย หรือ ตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายหรือทั้งสองข้างของเส้นสาย (รูปที่ 2.14) เซลล์เฮเทอโรซิสต์มักพบในไคยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้น โดยจะพบเมื่ออยู่ในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน คือปราศจากแอมโมเนีย ไนเตรท หรือ ยูเรีย เมื่อสองเซลล์เฮเทอโรซิสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเซลล์เฮเทอโรซิสต์มีผนังเซลล์ที่หนา ประกอบด้วยชั้นของพอลิแซคคาไรด์ และ ไกลโคโปรตีน โดยผนังเซลล์ที่หนาจะช่วยลดการแพร่ของก๊าซออกซิเจน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากออกซิเจน เซลล์เฮเทอโรซิสต์จะไม่มีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ จึงทำให้ไม่มีการผลิตออกซิเจน แต่พบว่ามีการใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้นผ่านทางกระบวนการหายใจที่สูงขึ้น เพื่อรักษาระดับออกซิเจนภายในเซลล์ให้มีระดับต่ำเพียงพอที่จะยอมให้มีการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ แม้ว่าเซลล์เฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่มีการสังเคราะห์แสง แต่ขาดระบบแสงที่ 2 ดังนั้น จึงไม่เกิดออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายในเซลล์ ภายหลังการตรึงไนโตรเจนจะมีการขนส่งสารประกอบต่างๆ เช่น กลูตามีน หรือ กรดอะมิโน จากเซลล์เฮเทอโรซิสต์ไปยังเซลล์ปกติ ส่วนเซลล์ปกติจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากการสังเคราะห์แสงแล้วขนส่งคาร์โบไฮเดรตเข้าสู่เฮเทอโรซิสต์ (รูปที่ 2.14) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและนำไปรีดิวซ์สารต่างๆ ภายในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 เซลล์อะคินีท (Akinete) และเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst) ของไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : http://fmp.conncoll.edu/Silicasecchidisk/LucidKeys/Carolina_Key/html/anabaena_Main.html



รูปที่ 2.14 ลักษณะเส้นสายของ *Anabaena* sp. PCC 7120 ในสถานะที่มีแหล่งไนโตรเจน (N+) และไม่มีแหล่งไนโตรเจน (N-) ด้านล่างแสดงตำแหน่งการขนส่งสารประกอบระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์เฮเทอโรซิสต์

ที่มา : <http://www2.hawaii.edu/~scallaha/SMCsite/styled/index.html>

2.7 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย

การเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ (1) เก็บตัวอย่างโดยวิธีการใช้ถุงลากแพลงก์ตอน (Plankton net) ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายอาจเก็บโดยการชูดตามก้อนหิน ชูดตามส่วนของพืชน้ำ เช่น ลำต้น และ ใบ เป็นต้น (2) เก็บตัวอย่างจากดิน โดยให้นำดินหรือทรายแห้งๆ จากบริเวณขายน้ำมาผึ่งให้แห้งสนิท จากนั้น นำตัวอย่างดินใส่จานแก้ว (Petridish) หยดน้ำลงบนดินนี้เล็กน้อย นำจานแก้วไปวางในที่มืดสว่าง ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียหรือโปรโตซัวจะเกิดขึ้นภายในเวลา 2

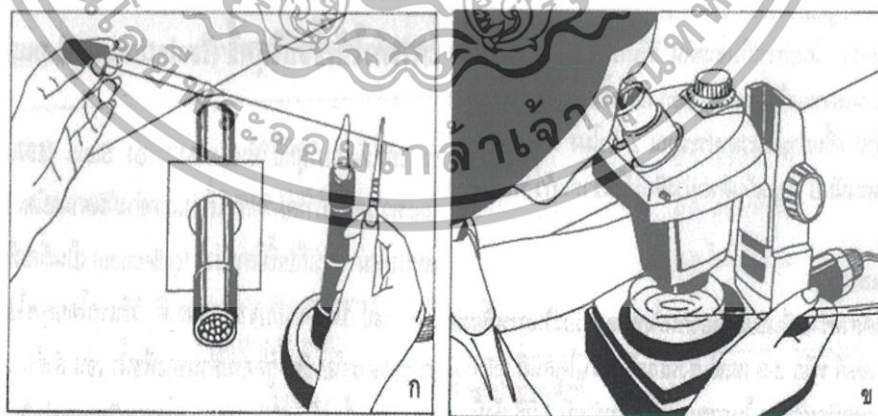
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง วิธีนี้สามารถเก็บสาหร่ายในสภาพสปอร์ตัวอ่อน หรือ ในสภาพอื่นนานนับปี โดยเก็บไว้ในขวดแก้ว หรือถุงพลาสติกที่ปิดสนิท

2.7.1 เทคนิคการแยกเชื้อ

การแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์สามารถทำได้ 3 วิธี ดังนี้

1) เทคนิคการล้างเซลล์ด้วยไมโครปิเปต (Micropipette washing) เป็นวิธีการแยกเชื้อที่ง่ายที่สุด เหมาะสำหรับการแยกไซยาโนแบคทีเรียขนาดเล็ก โดยจะทำการแยกไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตขนาดเล็กดูดไซยาโนแบคทีเรียทีละเซลล์หรือจำนวนเซลล์ไม่มากนัก แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง วิธีการ คือ นำตัวอย่างน้ำที่มีไซยาโนแบคทีเรียมาทำการคัดแยกเชื้อ โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตเพื่อทำเป็นอุปกรณ์สำหรับดูดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ใช้ปากคีบจับปลายด้านหนึ่งของพาสเจอร์ปิเปต แล้วเผาปลายหลอดด้วยตะเกียงเบนสัน จนกระทั่งพาสเจอร์ปิเปตอ่อนตัว ขณะเดียวกันให้ใช้ปากคีบดึงหลอดแก้วเพื่อให้หลอดยาวขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดจะเล็กลง (รูปที่ 2.15) เมื่อได้ขนาดตามที่ต้องการแล้ว ใช้ปากคีบดึงส่วนที่ไม่ต้องการทิ้ง ส่วนอีกด้านหนึ่ง ใส่จุกยางเพื่อใช้ในการดูดเซลล์ นำตัวอย่างที่มีไซยาโนแบคทีเรียหยดลงบนสไลด์ ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบไซยาโนแบคทีเรียให้จุ่มปลายพาสเจอร์ปิเปต จะให้ปลายพาสเจอร์ปิเปตอยู่บนเซลล์พอดี แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตกดลงบนเซลล์ที่ต้องการ เซลล์นั้นจะถูกดูดขึ้นมาโดยอัตโนมัติ (รูปที่ 2.15) นำเซลล์ที่ถูกดูดขึ้นมาใส่ในหลุม Tissue culture plate ที่บรรจุอาหารเรียบร้อยแล้ว ทำการดูดอาหารขึ้นลงอย่างน้อย 3-4 ครั้ง จากนั้น ทำการล้างปิเปต ทำการดูดขึ้นลงในหลุมที่เตรียมไว้สำหรับการล้างปิเปต วาง Tissue culture plate ที่แต่ละหลุมมีเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ไปวางในที่ที่มีแสงสว่างเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต



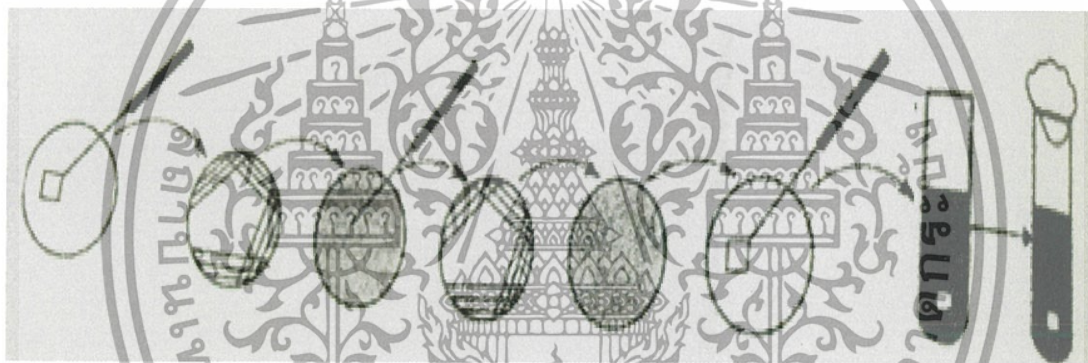
รูปที่ 2.15 การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปต (ก) และ การดูดเชื้อภายใต้กล้อง Inverted microscope (ข)

ที่มา : ลัดดา (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) เทคนิคการเลือกใช้สูตรอาหารคัดเลือก (Selective media) เทคนิคนี้เหมาะกับการคัดเลือกสาหร่ายขนาดใหญ่ ทำโดยเลือกชิ้นส่วนสาหร่ายที่ต้องการเลี้ยงมาจัดสิ่งมีชีวิตที่เกาะบนเส้นสาหร่ายออกให้หมด แล้วตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำอีกครั้ง ถ้ายังไม่หมด ให้ใช้แปลงเขียนออกจนหมด ต่อจากนั้น จึงใช้ขอขนาดเล็กที่เตรียมจากหลอดแก้วเผาไฟเกี่ยวเส้นสาหร่าย ล้างสาหร่ายให้สะอาดในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ใส่ตัวอย่างสาหร่ายในภาชนะที่มีสารอาหารผสมด้วยเจอมานีเยมออกไซด์ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดไดอะตอมหรือสาหร่ายที่ต้องใช้ซิลิกาเพื่อการเจริญเติบโต

3) การแยกเชื้อบนอาหารวุ้น (Agar pour plate) โดยการผสมตัวอย่างน้ำเล็กน้อยกับอาหารวุ้นที่ยังไม่แข็งตัวดีนัก เขย่าให้เข้ากัน เทอาหารวุ้นลงบนจานแก้ว ทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว ภายใน 5-7 วัน จะมีสาหร่ายเกิดขึ้นบนอาหารวุ้น จากนั้น ใช้มีดตัดอาหารวุ้นชิ้นเล็กๆ นำไปเลี้ยงในหลอดแก้วที่มีอาหาร (รูปที่ 2.16)



รูปที่ 2.16 การแยกเชื้อโดยการเพาะบนอาหารวุ้น
ที่มา : ลัดดา (2543)

2.7.2 การทำให้ไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์

การทำให้ไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

1) การล้างด้วยเทคนิคการปั่นให้ตกตะกอน (Washing by centrifugation technique) เป็นการแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากไซยาโนแบคทีเรียโดยการปั่นให้ตกตะกอน แล้วล้างด้วยสารละลายที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยทำการปั่นตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ความเร็วประมาณ 2,000 รอบต่อนาที นาน 45-90 วินาที รินน้ำใส่ออกให้หมด เทตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียลงในน้ำหรือสารละลายอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำเช่นนี้จนครบอย่างน้อย 12 ครั้ง

2) เทคนิคการใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic technique) โดยใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน สเตรปโตมัยซิน เตตราซัยคลิน และ กานามัยซิน เป็นต้น ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนที่ปนอยู่กับไซยาโนแบคทีเรีย แต่ไซยาโนแบคทีเรียจะทนต่อยาปฏิชีวนะเหล่านี้ได้ ในขณะที่แบคทีเรียอื่นจะตายไป อย่างไรก็ตาม การใช้ยาปฏิชีวนะอาจมีผลข้างเคียงต่อไซยาโนแบคทีเรียได้ ดังนั้น ควรใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่เหมาะสม และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซยาโนแบคทีเรีย แต่ต้องใช้ขนาดที่พอเหมาะเพื่อจะได้ไม่ทำอันตรายแก่ตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากนี้ การใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดผสมกันสามารถทำให้เชื้อตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียปลอดจากเชื้ออื่นได้

3) เทคนิคการใช้แสงอุลตราไวโอเลต (UV light technique) เทคนิคนี้เหมาะสำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่มีเมือกหนาๆ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตขนาด 2,750 อังสตรอม วางหลอดเหนือภาชนะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียประมาณ 25 เซนติเมตร ใช้เวลาประมาณ 8-16 นาที ต่อจากนั้น ทำการย้ายเซลล์ไปเลี้ยงบนจานวันใหม่

4) เทคนิคการกรอง (Filter technique) จะใช้เครื่องกรองชนิดมิลลิพอร์ หรือ Membrane filter แยกไซยาโนแบคทีเรียออกจากแบคทีเรีย ต่อจากนั้น ตัดเส้นไซยาโนแบคทีเรียออกเป็นท่อนสั้นๆ ใส่ขึ้นไซยาโนแบคทีเรียลงในภาชนะเลี้ยงที่มีกรวยพร้อมกระดาษกรองขนาด 8 ไมครอนติดอยู่ อุปกรณ์สำหรับกรองนี้จะต่อกับปั๊มสุญญากาศ นำขึ้นไซยาโนแบคทีเรียที่กรองแล้วจากแผ่นกรองใส่ลงในอาหารใหม่ เขย่าขวดให้ไซยาโนแบคทีเรียกระจายกันอย่างสม่ำเสมอ แล้วเทขึ้นลงในจานแก้ว ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วัน ต่อจากนั้น จึงตัดวันเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วย้ายขึ้นวันซึ่งมีไซยาโนแบคทีเรียที่ปราศจากแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารที่ปลอดเชื้อต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ไชยาโนแบคทีเรีย

ไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 54 ไอโซเลท โดยคัดแยกได้จาก น้ำทะเล หิน ทราย และ เปลือกหอย จากทะเลฝั่งอ่าวไทย และ ทะเลฝั่งอันดามันของประเทศไทย ดังนี้

1. P-SH8.2.1 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดพลา จังหวัดระยอง
2. P-SA1.1 คัดแยกมาจากทรายของในหาดพลา จังหวัดระยอง
3. P-W2.1 คัดแยกมาจากน้ำทะเลในหาดพลา จังหวัดระยอง
4. ST-ST1.5.1 คัดแยกมาจากหินในหาดทรายทอง จังหวัดระยอง
5. VD-W คัดแยกมาจากน้ำทะเลในอ่าววงเดือน จังหวัดระยอง
6. VD-SH2.3 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในอ่าววงเดือน จังหวัดระยอง
7. SKR-W2.2 คัดแยกมาจากน้ำทะเลในหาดทรายแก้ว จังหวัดระยอง
8. PKR-W3 คัดแยกมาจากน้ำทะเลในอ่าวปะการัง จังหวัดระยอง
9. PKR-ST1 คัดแยกมาจากหินในอ่าวปะการัง จังหวัดระยอง
10. PI-SA1.1 คัดแยกมาจากทรายในอ่าวไผ่ จังหวัดระยอง
11. PR-SH1 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในอ่าวพร้าว จังหวัดระยอง
12. PR-SH9 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในอ่าวพร้าว จังหวัดระยอง
13. MP-W คัดแยกมาจากน้ำทะเลในอ่าวมะขามป้อม จังหวัดระยอง
14. MP-SA1 คัดแยกมาจากทรายในอ่าวมะขามป้อม จังหวัดระยอง
15. WI-SH3 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในอ่าวหวาย จังหวัดระยอง
16. WI-SA1 คัดแยกมาจากทรายในอ่าวหวาย จังหวัดระยอง
17. SS-ST6 คัดแยกมาจากหินในเสมสาร จังหวัดชลบุรี
18. SK-ST2.1 คัดแยกมาจากหินในหาดทรายแก้ว จังหวัดชลบุรี
19. SK-ST1.1 คัดแยกมาจากหินในหาดทรายแก้ว จังหวัดชลบุรี
20. SK-ST1.2 คัดแยกมาจากหินในหาดทรายแก้ว จังหวัดชลบุรี
21. NR-SH2 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดนางรำ จังหวัดชลบุรี
22. NR-ST2.2 คัดแยกมาจากหินในหาดนางรำ จังหวัดชลบุรี
23. TG-W2.3.3 คัดแยกมาจากน้ำทะเลในหาดเตยงาม จังหวัดชลบุรี
24. JL-SA1 คัดแยกมาจากทรายในหาดเจ้าหลาว จังหวัดจันทบุรี
25. JL-SH1 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดเจ้าหลาว จังหวัดจันทบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26. LS-W2 คัดแยกมาจากน้ำทะเลในแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี
27. KVM-W1 คัดแยกมาจากน้ำทะเลในหาดคู้วิมาน จังหวัดจันทบุรี
28. LSD-W3 คัดแยกมาจากน้ำทะเลในแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี
29. LSD-SH1 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี
30. KK คัดแยกมาจากน้ำทะเลในเกาะกูด จังหวัดตราด
31. Y-SH8 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดยาว จังหวัดตรัง
32. CHL-SH1 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดฉางกลาง จังหวัดตรัง
33. CHL-SH10 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดฉางกลาง จังหวัดตรัง
34. JM-SH2 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดเจ้าไหม จังหวัดตรัง
35. RMK-SH10 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดราชมงคล จังหวัดตรัง
36. SR-SH2 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดสำราญ จังหวัดตรัง
37. MTN-SH5 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดมดตะนอย จังหวัดตรัง
38. MTN-SH9 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดมดตะนอย จังหวัดตรัง
39. YL-SH4 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดหยงหลิน จังหวัดตรัง
40. PM-SH13 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดปากเมง จังหวัดตรัง
41. S-S คัดแยกมาจากน้ำทะเลในหาดสั้น จังหวัดตรัง
42. S-SH3 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดสั้น จังหวัดตรัง
43. KM-SH3 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดคลองม่วง จังหวัดกระบี่
44. KM-ST9 คัดแยกมาจากหินในหาดคลองม่วง จังหวัดกระบี่
45. NM-SH1 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดน้ำเมา จังหวัดกระบี่
46. NM-SA1 คัดแยกมาจากทรายในหาดน้ำเมา จังหวัดกระบี่
47. N-ST1 คัดแยกมาจากหินในอ่าวนาง จังหวัดกระบี่
48. N-ST2 คัดแยกมาจากหินในอ่าวนาง จังหวัดกระบี่
49. NTR-S คัดแยกมาจากหินในหาดนพรัตน์ธารา จังหวัดกระบี่
50. SSH-SH5 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในสุสานหอย จังหวัดกระบี่
51. SSH-SH12 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในสุสานหอย จังหวัดกระบี่
52. TL-S คัดแยกมาจากน้ำทะเลในหาดท่าเลน จังหวัดกระบี่
53. TL-SH2 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในหาดท่าเลน จังหวัดกระบี่
54. LK-SH2 คัดแยกมาจากเปลือกหอยในแหลมกรวด จังหวัดกระบี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ASN III (ภาคผนวก ก)
- 3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ข)
- 3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution (ภาคผนวก ค)
- 3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (ภาคผนวก ง)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.2.1 กรดบอริก (H_3BO_3)
- 3.2.2.2 กรดซิตริก (Citric Acid)
- 3.2.2.3 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- 3.2.2.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- 3.2.2.5 โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)
- 3.2.2.6 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.2.2.7 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- 3.2.2.8 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)
- 3.2.2.9 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)
- 3.2.2.10 ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)
- 3.2.2.11 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 3.2.2.12 เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$ citrate)
- 3.2.2.13 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.2.2.14 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)
- 3.2.2.15 โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$)
- 3.2.2.16 วิตามินบี 12 (Cyanocobalamin)

3.2.3 สารเคมีสำหรับสกัดจีโนมทีเอ็นเอ

- 3.2.3.1 คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.3.2 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) (Merck, Germany)
- 3.2.3.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) (SDS) (Merck, Germany)
- 3.2.3.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (Sodium lauryl sarcosine) (SLS) (Merck, Germany)
- 3.2.3.5 ทริส (Tris) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.3.6 ฟีนอล (Phenol) (USB corporation, USA)
- 3.2.3.7 เม็ดแก้ว (Glass bead) (Sigma, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.8 เอทานอล (Ethanol) (Fisher, USA)

3.2.3.9 เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.3.10 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol) (Carlo Erba, Italy)

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันและวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

3.2.4.1 ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxyribonucleotide triphosphates) (dNTPs) (Promega, USA)

3.2.4.2 บัฟเฟอร์ PCR (Fermentas, USA)

3.2.4.3 บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer)

3.2.4.4 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Fermentas, USA)

3.2.4.5 เอธิเดียมโบรมไนด์ (Ethidium bromide) (Carlo Erba, Italy)

3.2.4.6 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)

3.2.4.7 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์ (Oligonucleotide primer) (Bio Basic Inc., Thailand)

3.2.4.8 อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.2.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.5.1 GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas, USA)

3.2.5.2 ฝาฉลามบัตตา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ($\lambda/HindIII$) (Fermentas, USA)

3.2.6 ชุดทดสอบ (Kit)

ชุดทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันให้บริสุทธิ์ (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit) (Geneaid, Taiwan)

3.2.7 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

เมทานอล (CH_3OH) (Analytical grade, Univar, Australia)

3.2.8 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.2.8.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซนต์ในอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co. Ltd., Thailand)

3.2.8.2 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999%) (Thailand Industrial Gas Co. Ltd., Thailand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
- 3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)
- 3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
- 3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 3.3.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z38K, Germany)
- 3.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 3.3.8 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.3.9 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.3.10 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 3.3.11 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.3.12 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)
- 3.3.13 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)
- 3.3.14 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (National Scientific, USA)
- 3.3.15 เข็มฉีดยาก๊าซ (Gas syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.4 วิธีการคัดแยกเชื้อและทดสอบความบริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อจะเริ่มจากการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจาก น้ำทะเล หิน หวาย และ เปลือกหอย จากทะเลฝั่งอ่าวไทยจำนวน 24 หาด ได้แก่ แหลมเสด็จ แหลมสิงห์ อ่าวกระทิง หาดเจ้าหลาว และ หาดคุ้งวิมาน ที่อยู่ในจังหวัดจันทบุรี หาดแม่รำพึง หาดทรายแก้ว อ่าวไผ่ อ่าวซ้อ อ่าววงเดือน อ่าวปะการัง อ่าวหวาย อ่าวพร้าว อ่าวมะขามป้อม หาดทรายทอง หาดน้ำริน หาดปลา ที่อยู่ในจังหวัดระยอง เกาะกูดในจังหวัดตราด แสมสาร หาดนางรำ อ่าวดวงตาล หาดเตยงาม หาดทรายแก้ว และ หาดจอมเทียน ที่อยู่ในจังหวัดชลบุรี จากทะเลฝั่งอันดามันจำนวน 16 หาด ได้แก่ หาดฉางกลาง หาดเจ้าไหม หาดราชมงคล หาดสำราญ หาดมดตานอย หาดหยงหลิน หาดปากเมง และ หาดสัน ที่อยู่ในจังหวัดตรัง หาดคลองม่วง หาดนพรัตน์ธารา หาดยาว อ่าวนาง อ่าวน้ำเมา อ่าวท่าเลน แหลมกรวด และสุสานหอย ที่อยู่ในจังหวัดกระบี่ นำตัวอย่างมาคัดแยกไฮยาโนแบคทีเรีย โดยนำมาใส่ในอาหารเหลว ASNIII เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งไฮยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตและมีสีเขียวเข้ม จากนั้น นำตัวอย่างน้ำที่มีไฮยาโนแบคทีเรียมาหยดลงบนสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรีย ให้ดูด้วยพาสเจอร์ปิเปต นำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่ถูกดูดขึ้นมาใส่ในงานหลุมเลี้ยงสาหร่ายที่บรรจุอาหาร ASNIII ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และวางจานเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่แต่ละหลุมมีเซลล์สาหร่ายในที่มีแสงสว่าง ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายนำมาเลี้ยงต่อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นที่อุณหภูมิห้องในที่มีแสงเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต จากนั้น นำไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate บนอาหารแข็ง ASNIII จนกระทั่งได้โคโลนีเดียว เมื่อเชื้อเจริญเติบโตจนได้โคโลนีเดียวแล้ว จึงนำโคโลนีเดียวที่ได้มาทดสอบความบริสุทธิ์ โดยนำมา Streak บนอาหารแข็ง LB นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเพื่อใช้เป็น Starter เริ่มจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียบนจานอาหารแข็ง ASNIII จากนั้น จึงนำโคโลนีเดียว 1 โคโลนีบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงต่อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรประมาณ 0.1 จากนั้น นำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที

3.6 วิธีการศึกษาชนิดของไซยาโนแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

3.6.1 วิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ASNIII มากระจายในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ที่มีบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติมเม็ดแก้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมไดเดคซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมลอริลซาร์โคซิน 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ TE ที่อิมิตด้วยฟินอล ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้ว vortex 10 วินาที สลับกับการแช่แข็ง 30 วินาที (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมฟินอลต่อคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 25 ต่อ 24 ต่อ 1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24 ต่อ 1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ สกัดด้วยคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อีก 1 ครั้ง ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมฟอสฟอริกเป็นเอ็กสทราฟอสฟอรัสให้ครบการแข็งในเฟอิก 1 ครั้ง เติมน้ำเย็นที่เย็นไปใช้ประจักษ์ชนิดนี้การคัดไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้น เติมน้ำเค็มมอร์แซ่เตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายและเติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง เทสารละลายทิ้ง รอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จากนั้น ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.6.2 วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำสารละลายดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม นำมาละลายในบัฟเฟอร์ TBE (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้เจลละลายและนำสารละลายเจลเทลงในถาดที่เสียบหัวไว้ รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที นำเจลใส่ลงในอ่าง (Chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ TBE จากนั้น หยอดตัวอย่างลงในหลุมของแผ่นอะกาโรส ผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ย้อมเจลในเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 30 นาที แช่น้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที นำแผ่นเจลไปส่องดูลักษณะและขนาดของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพ

3.6.3 วิธีการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรียด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สด้วยไพรเมอร์ F16S rDNA cyano (5'-GCTCAGGATGAACGCTGGCG-3') และ R16S rDNA cyano (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTCCA-3') (Rasoul-Amini et al., 2009) โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียเป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สแสดงในตารางที่ 3.1 และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งมีสถานะดังแสดงในตารางที่ 3.2 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5 เท่าของบัฟเฟอร์ PCR	10
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์)	3
ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (10 มิลลิโมลาร์)	1
ไพรเมอร์ Forward (5 ไมโครโมลาร์)	2.5
ไพรเมอร์ Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	2.5
เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
น้ำปราศจากไอออน	28.5
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	60	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1 รอบ

3.6.4 วิธีการทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันให้บริสุทธิ์

หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน จะต้องนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมาใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เติมน้ำบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 5 เท่าของตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน จากนั้น นำ DF column ใส่ลงใน Collection tube แล้วดูดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ผสมกับ DF buffer ข้างต้นใส่ลงใน DF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดีเอ็นเอจะติดอยู่ใน DF column จากนั้น เทส่วนใสใน Collection tube ทิ้งแล้วเติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง DF column เพื่อล้างชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ย้าย DF column ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับชะ (Elution buffer) 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่บริสุทธิ์

3.6.5 วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่บริสุทธิ์ไปส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR มาใช้ในการทำปฏิกิริยา Sequencing นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีน 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blastn

3.7 วิธีการวัดการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และให้แสงความเข้ม 30 ไมโครไอน์สไต้นต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของไซยาโนแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

3.8 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

นำไซยาโนแบคทีเรียปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เติมน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นในที่มีดเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้น นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee and Shen (2004)

3.9 วิธีการวัดปริมาณเซลล์แห้ง

นำไซยาโนแบคทีเรียปริมาณ 10 มิลลิลิตรมากรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้น ล้างซ้ำด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไซยาโนแบคทีเรียที่กรองได้ไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำไซยาโนแบคทีเรียที่อบแห้งแล้วไปทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำน้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลล์ลบลด้วยน้ำหนักกระดาษกรอง

3.10 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียตามหัวข้อ 3.5 แล้วนำไซยาโนแบคทีเรียมาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งในอาหารทดสอบและกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปใส่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นในที่มีดโดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์เอกสารถังเป็นเอกสารถังที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) เทียบกับก๊าซมาตรฐานอาร์กอน สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph–Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]

Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Column	Packed SS Column 2m x 4mm OD x 3mm ID p/w Molecular sieve 5 ⁰ A 60/80 mesh
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Column temperature: 50 °C Detector temperature: 100 °C
Argon Carrier gas	Flow rate 20 ml/min (99.999% purity)

3.11 วิธีการศึกษาการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโคโนสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไฮโดรเจน และเขย่าต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปไล่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที ใน 4 สภาวะ คือ (1) สภาวะไร้อากาศในที่มืด (2) สภาวะไร้อากาศในที่มิแสง (3) สภาวะที่มีอากาศในที่มืด และ (4) สภาวะที่มีอากาศในที่มิแสง (Allahverdiyeva et al., 2010) จากนั้น นำไปบ่มตามสภาวะโดยการเขย่าไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.12 วิธีการศึกษาผลของชนิดอาหารต่อการเจริญเติบโตในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเหลว BG11, BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ ASN III ในฟลาสกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครโคโนสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้น ทำการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์ โดยวัดการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ถ้าเป็นไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายจะทำการวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.13 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโอสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน และเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปไล่อากาศโดยการพ่นอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืดโดยการเขย่าขวด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

3.14 วิธีการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว ASNIII โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำฟลาสก์ไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโอสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนโดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 4-10 และเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตรและนำไปไล่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดแก้วในที่มืดโดยการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

3.15 วิธีการศึกษาผลอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำฟลาสก์ไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโอสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และนำตะกอนเซลล์มากระจายในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน และเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำขวดไปไล่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดแก้วในที่มืดโดยแปรผันอุณหภูมิตั้งแต่ 20-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.16 วิธีการศึกษาผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีความการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และนำตะกอนเซลล์มากระจายในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน และเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปใส่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดแก้วในที่มืดและที่สว่างโดยการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.17 วิธีการศึกษาผลความเค็มที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีความการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน โดยแปรผันความเค็มตั้งแต่ 0.25-3 โมลาร์ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตรและนำไปใส่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดแก้วในที่มืดโดยเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.18 วิธีการศึกษาผลของแหล่งอาหารและความเข้มข้นของแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว ASNIII ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำพลาสติกไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ถ่ายเซลล์ลงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารต่างๆ ดังนี้ แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0, 0.176, 1.76, 17.6 และ 176 มิลลิโมลาร์ แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตเท่ากับ 0, 1.5, 15, 30 และ 150 มิลลิโมลาร์ แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 0, 0.0189, 0.189, 1.89 และ 18.9 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร แปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออนโดยให้มีความเข้มข้นของ Fe^{3+} เท่ากับ 0, 0.04, 0.4, 4, 40 และ 400 ไมโครโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของนิกเกิลไอออน โดยให้มีความเข้มข้นของ Ni^{2+} เท่ากับ 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากนั้น นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมตัวอย่างที่คัดเลือกเพื่อนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจน โดยเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปไล่อากาศโดยการฟองอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืด โดยการเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.19 วิธีการศึกษาการเพาะเลี้ยงของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารน้ำทะเล เพื่อการผลิตไฮโดรเจน

3.19.1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารน้ำทะเล

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียใน (1) น้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ (2) อาหารเหลว BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ (3) ASNIII ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้น ทำการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวจะวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสายจะทำการวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.19.2 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารน้ำทะเล

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่ปราศจากไนโตรเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปไล่อากาศโดยการฟองอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืดโดยการเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทะเลในประเทศไทย

จากการเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวแบบสุ่มจากน้ำทะเล หิน ทราย และเปลือกหอย จากทะเลฝั่งอ่าวไทย จำนวน 24 หาด ได้แก่ หาดแหลมเสด็จ แหลมสิงห์ อ่าวกระทิง หาดเจ้าหลาว และ หาดคู้วิมาน ที่อยู่ในจังหวัดจันทบุรี หาดแม่รำพึง หาดทรายแก้ว อ่าวไผ่ อ่าวช่อ อ่าววงเดือน อ่าวปะการัง อ่าวหวาย อ่าวพร้าว อ่าวมะขามป้อม หาดทรายทอง หาดน้ำริน หาดปลา ที่อยู่ในจังหวัดระยอง เกาะกูดในจังหวัดตราด แสมสาร หาดนางรำ อ่าวตงตาล หาดเตยงาม หาดทรายแก้ว และ หาดจอมเทียน ที่อยู่ในจังหวัดชลบุรี จากทะเลฝั่งอันดามันจำนวน 16 หาด ได้แก่ หาดฉางหลวง หาดเจ้าไหม หาดราชมงคล หาดสำราญ หาดมดตานอย หาดหยงหลิน หาดปากเมง และ หาดสัน ที่อยู่ในจังหวัดตรัง หาดคลองม่วง หาดนพรัตน์ธารา หาดยาว อ่าวนาง อ่าวน้ำเมา อ่าวท่าเลน แหลมกรวด และ สุสานหอย ที่อยู่ในจังหวัดกระบี่ พบจุลสาหร่ายทั้งหมด 74 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากในน้ำทะเลมีลักษณะทางกายภาพและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย ทำให้สามารถพบการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวอยู่ทั่วไปในน้ำทะเล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 จำนวนจุลสารร้ายที่ได้จากแหล่งเก็บตัวอย่างต่างๆ ที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลฝั่งอ่าวไทยและอันดามันในประเทศไทย

สถานที่	แหล่งที่มา	น้ำทะเล	หิน	ทราย	เปลือกหอย	รวม
หาดปลา จ.ระยอง		1	1	1	1	4
หาดทรายทอง จ.ระยอง		-	1	-	-	1
อ่าววงเดือน จ.ระยอง		1	1	-	1	3
หาดทรายแก้ว จ.ระยอง		1	-	1	-	2
อ่าวปะการัง จ.ระยอง		1	1	-	-	2
อ่าวไผ่ จ.ระยอง		-	-	1	-	1
อ่าวพร้าว จ.ระยอง		-	-	-	2	2
อ่าวมะขามป้อม จ.ระยอง		1	1	1	-	2
อ่าวหวาย จ.ระยอง		-	-	-	2	2
หาดแม่รำพึง จ.ระยอง		-	-	-	-	0
แหลมสารจ.ชลบุรี		-	1	-	-	1
อ่าวนวล จ.ชลบุรี		1	-	-	-	1
หาดทรายแก้ว จ.ชลบุรี		1	3	-	-	4
หาดจอมเทียน จ.ชลบุรี		1	-	-	-	1
หาดนางรำ จ.ชลบุรี		-	1	-	1	2
หาดเตยงาม จ.ชลบุรี		2	-	-	-	2
หาดเจ้าหลาว จ.จันทบุรี		1	-	1	1	3
แหลมสิงห์ จ. จันทบุรี		2	-	-	-	2
หาดคู้้งวิมาน จ. จันทบุรี		1	2	-	-	3
อ่าวกระทิง จ. จันทบุรี		2	-	-	-	2
แหลมเสด็จ จ. จันทบุรี		2	-	-	1	3
เกาะกูด จ. ตราด		1	-	-	-	1
รวม		19	11	5	9	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 จำนวนจุลสารหายที่ได้จากแหล่งเก็บตัวอย่างต่างๆ ที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลฝั่งอ่าวไทยและอันดามันในประเทศไทย (ต่อ)

สถานที่	แหล่งที่มา	น้ำทะเล	หิน	ทราย	เปลือกหอย	รวม
หาดยาว จ.ตรัง	-	-	-	-	1	1
หาดฉางหลวงจ.ตรัง	-	-	-	-	2	2
หาดเจ้าไหมจ.ตรัง	1	-	-	-	1	2
หาดหาดราชมงคลจ.ตรัง	-	-	-	-	1	1
หาดสำราญจ.ตรัง	1	-	-	-	1	2
หาดมดตะนอยจ.ตรัง	-	-	-	-	2	2
หาดหยงหลิงจ.ตรัง	-	-	-	-	1	1
หาดปากเมงจ.ตรัง	-	-	-	-	2	2
หาดสั้นจ.ตรัง	1	-	-	-	1	2
หาดคลองม่วงจ.กระบี่	-	-	1	-	1	2
หาดน้ำเมาจ.กระบี่	-	-	-	1	1	2
อ่าวนางจ.กระบี่	1	-	-	-	2	3
หาดนพรัตน์ธาราจ.กระบี่	2	-	-	-	-	2
สุสานหอยจ.กระบี่	-	-	-	-	2	2
อ่าวท่าเลนจ.กระบี่	1	-	-	-	2	3
แหลมกรวดจ.กระบี่	-	-	-	-	1	1
รวม	7	-	1	1	21	30


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลท แบ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.2) และสาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท จากนั้นนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียตามลักษณะรูปร่างออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายยาว ไม่แตกแขนง ไม่พบเซลล์พิเศษอย่างเซลล์เฮเทอโรซิสต์และเซลล์อะคินีท กลุ่มที่ 2 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้น เซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายลูกบิด กลุ่มที่ 3 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมรี กลุ่มที่ 4 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมีรูปร่างกลม และกลุ่มที่ 5 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นกลุ่มแผ่นขนาดใหญ่ ส่วนสาหร่ายสีเขียวสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว และกลุ่มที่ 2 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ในงานวิจัยนี้ สนใจศึกษาเฉพาะไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลเท่านั้น การจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถสรุปชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ยาก จึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรม โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA



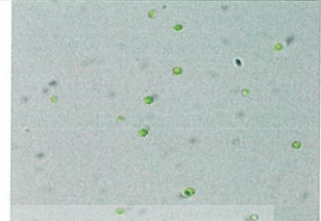
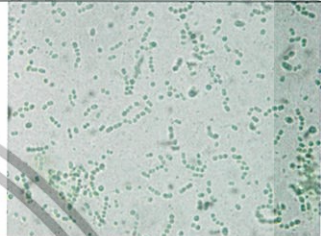
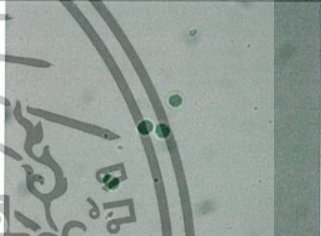
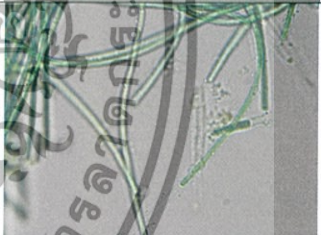
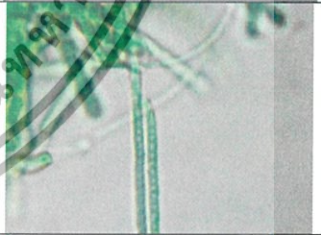
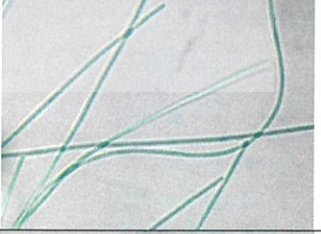

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
P-SH8.2.1	หาดปลา	เปลือกหอย	ระยอง	เซลล์เดี่ยว มีลักษณะกลมรี	
P-SA1.1	หาดปลา	ทราย	ระยอง	ลักษณะคล้ายเม็ดลูกบิดต่อกันเป็นเส้น สายขนาดเล็ก	
P-W2.1	หาดปลา	น้ำทะเล	ระยอง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี gas vesicle	
P-ST2.3	หาดปลา	หิน	ระยอง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
ST-ST1.5.1	หาดทรายทอง	หิน	ระยอง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
VD-W	อ่าววงเดือน	น้ำทะเล	ระยอง	เป็นเซลล์เดี่ยว ลักษณะกลมค่อนข้างรี เซลล์ต่อกัน 3-6 เซลล์	
VD-SH2.3	อ่าววงเดือน	เปลือกหอย	ระยอง	เส้นสายตรงขนาดใหญ่ ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle อยู่ภายใน	

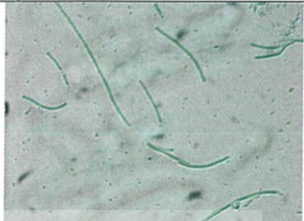
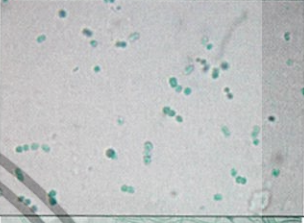
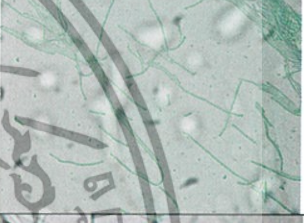
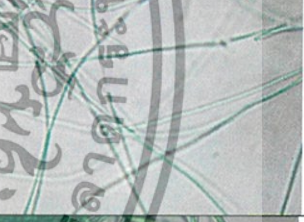
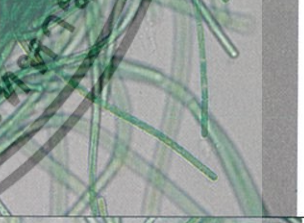
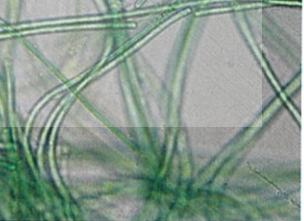
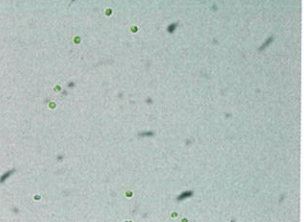
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
VD-ST2.1	อ่าววงเดือน	หิน	ระยอง	สาหร่ายสีเขียว เซลล์เดี่ยว รูปร่าง กลม	
SKR-SA1	หาดทราย แก้ว	ทราย	ระยอง	เซลล์เดี่ยว รูปร่าง กลม เซลล์เรียงต่อกัน 2-5 เซลล์	
SKR-W2.2	หาดทราย แก้ว	น้ำทะเล	ระยอง	เซลล์เดี่ยวสีเขียว เข้ม มีรูปร่างกลม มีการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2	
PKR-W3	อ่าว ปะการัง	น้ำทะเล	ระยอง	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
PKR-ST1	อ่าว ปะการัง	หิน	ระยอง	ลักษณะคล้ายเม็ด ลูกปัดต่อกันเป็น เส้นสายขนาดเล็ก	
PI-SA1.1	อ่าวไผ่	ทราย	ระยอง	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	
PR-SH1	อ่าวพร้าว	เปลือก หอย	ระยอง	เซลล์รูป ทรงกระบอกเป็น ท่อนเรียงต่อกัน	

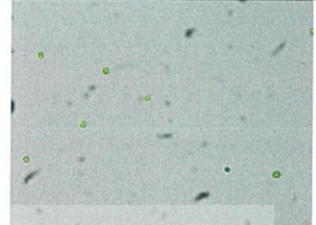
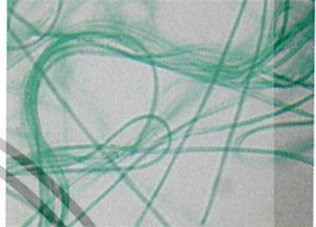

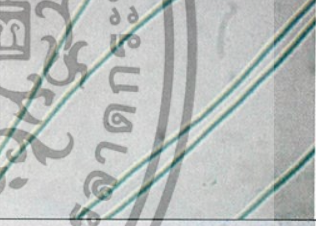


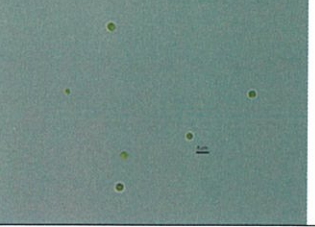
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
PR-SH9	อ่าวพร้าว	เปลือกหอย	ระยอง	เซลล์รูปทรงกระบอกเป็นท่อนเรียงต่อกัน	
MP-W	อ่าวมะขามป้อม	น้ำทะเล	ระยอง	เป็นเซลล์เดี่ยว ลักษณะกลมค่อนรี เซลล์ต่อกัน 3-4 เซลล์	
MP-SA1	อ่าวมะขามป้อม	ทราย	ระยอง	เส้นสายยาว เซลล์เรียงต่อกันเป็นท่อน	
WI-SH3	อ่าวหวาย	เปลือกหอย	ระยอง	เส้นสายตรงขนาดเล็ก ไม่มีผนัง ไม่มี Gas vesicle	
WI-SA1	อ่าวหวาย	เปลือกหอย	ระยอง	เส้นสายตรงขนาดเล็ก เซลล์เรียงกันเป็นท่อน ไม่มีผนัง	
SS-ST6	แสมสาร	หิน	ชลบุรี	เส้นสาย ไม่มีผนัง ไม่มี Gas vesicle	
NE-W	อ่าวฉนวน	น้ำทะเล	ชลบุรี	สาหร่ายสีเขียว เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม	

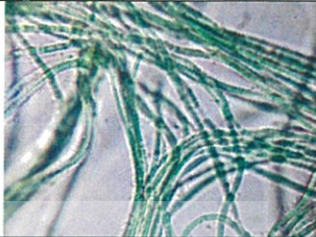
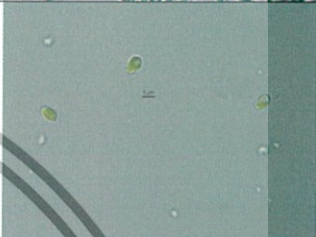


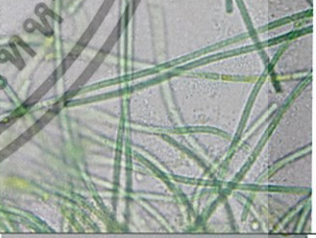
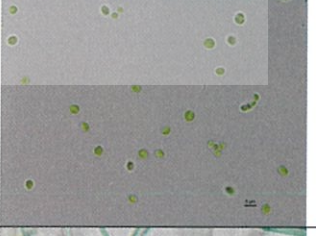
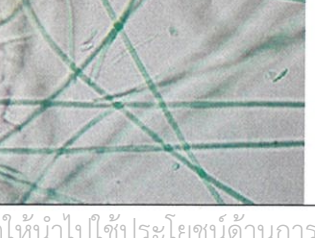
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
SK-W	หาดทรายแก้ว	น้ำทะเล	ชลบุรี	สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม	
SK-ST2.1	หาดทรายแก้ว	หิน	ชลบุรี	เส้นสายตรงขนาดเล็ก ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	
SK-ST1.1	หาดทรายแก้ว	หิน	ชลบุรี	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	
SK-ST1.2	หาดทรายแก้ว	หิน	ชลบุรี	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	
JT-W	หาดจอมเทียน	น้ำทะเล	ชลบุรี	ลักษณะคล้ายเม็ดลูกบิดต่อกันเป็นเส้นสายเส้นขนาดเล็ก	
NR-SH2	หาดนางรำ	เปลือกหอย	ชลบุรี	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
NR-ST2.2	หาดนางรำ	หิน	ชลบุรี	สาหร่ายสีเขียวเป็นเซลล์เดี่ยวแบบไม่เกาะกลุ่มกัน รูปร่างกลม	

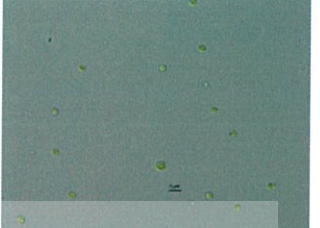
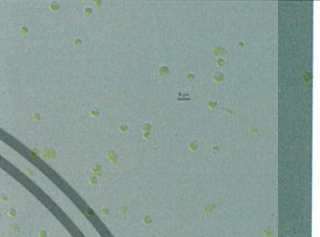
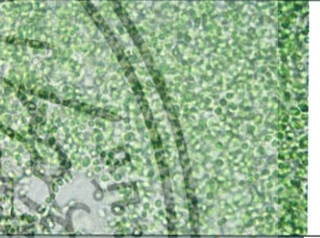
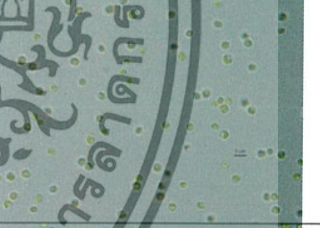
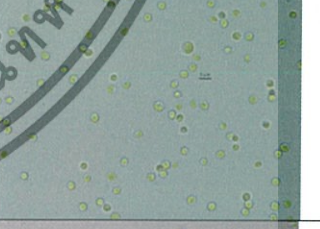
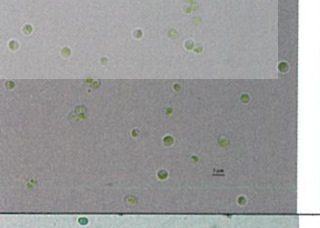
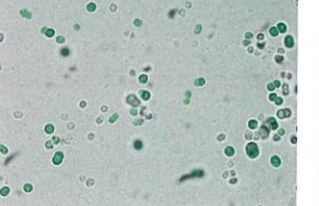
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียว จำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
TG-W2.3.3	หาดเตยงาม	น้ำทะเล	ชลบุรี	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
TG-W2.3	หาดเตยงาม	น้ำทะเล	ชลบุรี	สาหร่ายสีเขียว เป็นเซลล์เดี่ยว แบบไม่เกาะกลุ่มกัน รูปร่างกลมรี	
JL-W2	หาดเจ้าหลาว	น้ำทะเล	จันทบุรี	เซลล์เดี่ยว กลม เซลล์เรียงต่อกัน	
JL-SA1	หาดเจ้าหลาว	ทราย	จันทบุรี	เส้นสายตรงขนาดกลาง เซลล์เป็นท่อนต่อกัน ไม่มี Gas vesicle	
JL-SH1	หาดเจ้าหลาว	เปลือกหอย	จันทบุรี	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มี Gas vesicle	
LS-W1	แหลมสิงห์	น้ำทะเล	จันทบุรี	สาหร่ายสีเขียว เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม	
LS-W2	แหลมสิงห์	น้ำทะเล	จันทบุรี	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
KVM-ST4.2	หาดคั้ง วิมาน	หิน	จันทบุรี	สาหร่ายสีเขียว เป็นเซลล์เดี่ยว แบบไม่เกาะกลุ่ม กัน รูปร่างกลม	
KVM-ST4	หาดคั้ง วิมาน	หิน	จันทบุรี	สาหร่ายสีเขียว เป็นเซลล์เดี่ยว แบบไม่เกาะกลุ่ม กัน รูปร่างกลม	
KVM-W1	หาดคั้ง วิมาน	น้ำทะเล	จันทบุรี	รูปร่างกลม เซลล์ เดี่ยว อยู่รวมกัน เป็นกลุ่ม	
KT-W2	อ่าวกระทิง	น้ำทะเล	จันทบุรี	สาหร่ายสีเขียว มี รูปร่างกลม เซลล์ กระจายอยู่แบบ เซลล์เดี่ยว	
KT-W3	อ่าวกระทิง	น้ำทะเล	จันทบุรี	สาหร่ายสีเขียว เซลล์เดี่ยว มี รูปร่างค่อนข้าง กลมคล้าย KT-W3	
LSD-W2	แหลมเสด็จ	น้ำทะเล	จันทบุรี	สาหร่ายสีเขียว เป็นเซลล์เดี่ยว แบบไม่เกาะกลุ่ม กัน รูปร่างกลม	
LSD-W3	แหลมเสด็จ	น้ำทะเล	จันทบุรี	เซลล์เดี่ยว รูปร่าง กลม และกลมรี	

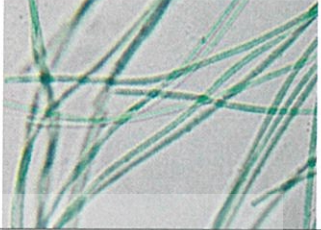
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
LSD-SH1	แหลมเสด็จ	เปลือก หอย	จันทบุรี	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
KK	เกาะกูด	น้ำทะเล	ตราด	คล้ายลูกบิดขนาด เล็กเรียงต่อกัน	
Y-SH8	หาดยาว	เปลือก หอย	ตรัง	ลักษณะคล้ายเม็ด ลูกบิดต่อกันเป็น เส้นสายขนาดเล็ก	
CHL-SH1	หาดฉาง กลาง	เปลือก หอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
CHL-SH10	หาดฉาง กลาง	เปลือก หอย	ตรัง	ลักษณะคล้ายเม็ด ลูกบิดต่อกันเป็น เส้นสายขนาดเล็ก	
JM-W	หาดเจ้า ไหม	น้ำทะเล	ตรัง	เซลล์เดี่ยวกลม ขนาดเล็ก	
JM-SH2	หาดเจ้า ไหม	เปลือก หอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	

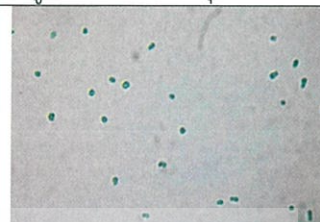
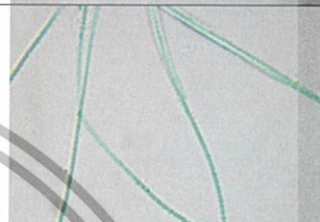



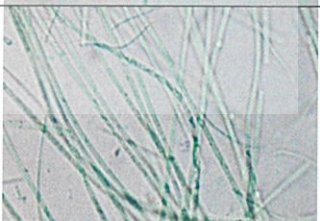

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
RMK-SH10	หาดราชมงคล	เปลือกหอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	
SR-W	หาดสำราญ	น้ำทะเล	ตรัง	เป็นเซลล์เดี่ยว ลักษณะกลมค่อนรี เซลล์ต่อกัน 3-6 เซลล์	
SR-SH2	หาดสำราญ	เปลือกหอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี gas vesicle	
MTN-SH5	หาดมดตะนอย	เปลือกหอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	
MTN-SH9	หาดมดตะนอย	เปลือกหอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
YL-SH4	หาดหยงหลิน	เปลือกหอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี gas vesicle	
PM-SH13	หาดปากเมง	เปลือกหอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	

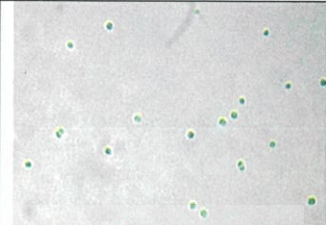
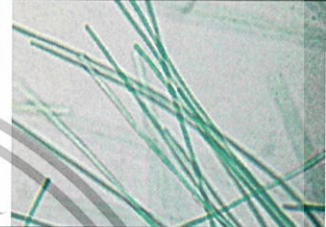

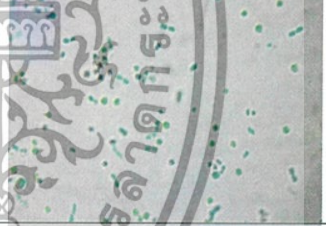



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
PM-SH14	หาดปากเมง	เปลือกหอย	ตรัง	เป็นเซลล์เดี่ยว ลักษณะกลมค่อนรี	
S-S	หาดสัน	น้ำทะเล	ตรัง	ลักษณะคล้ายเม็ด ลูกบิดต่อกันเป็น เส้นสายขนาดเล็ก	
S-SH3	หาดสัน	เปลือกหอย	ตรัง	เส้นสายตรงขนาดใหญ่ ไม่มีผนังกัน มี gas vesicle	
KM-SH3	หาดคลองม่วง	เปลือกหอย	กระบี่	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
KM-ST9	หาดคลองม่วง	หิน	กระบี่	ลักษณะคล้ายเม็ด ลูกบิดต่อกันเป็น เส้นสายขนาดเล็ก	
NM-SH1	หาดน้ำเมา	เปลือกหอย	กระบี่	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
NM-SA1	หาดน้ำเมา	ทราย	กระบี่	เส้นสายตรงขนาด ใหญ่ ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	


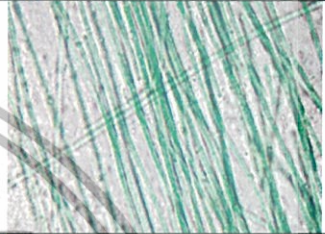


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างไตกล้องจุลทรรศน์
N-W	อ่าวนาง	น้ำทะเล	กระบี่	เป็นเซลล์เดี่ยว ลักษณะกลม	
N-ST1	อ่าวนาง	เปลือก หอย	กระบี่	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
N-ST2	อ่าวนาง	เปลือก หอย	กระบี่	เส้นสายคดไปมา ไม่มีผนังกัน	
NTR-W	หาด นพรัตน์ ธารา	น้ำทะเล	กระบี่	เซลล์เดี่ยวกลม ขนาดเล็ก เซลล์ต่อ กัน 3-6 เซลล์	
NTR-S	หาด นพรัตน์ ธารา	น้ำทะเล	กระบี่	ลักษณะคล้ายเม็ด ลูกบิดต่อกันเป็น เส้นสายขนาดเล็ก	
SSH-SH5	สุสานหอย	เปลือก หอย	กระบี่	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน ไม่มี Gas vesicle	
SSH-SH12	สุสานหอย	เปลือก หอย	กระบี่	เส้นสายตรงขนาด กลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และ สาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า) (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ลักษณะที่พบ	รูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์
TL-S	อ่าวท่าเลน	น้ำทะเล	กระบี่	ลักษณะคล้ายเม็ดลูกปัดต่อกันเป็นเส้นสายขนาดเล็ก	
TL-SH2	อ่าวท่าเลน	เปลือกหอย	กระบี่	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	
TL-SH4	อ่าวท่าเลน	เปลือกหอย	กระบี่	เซลล์เดี่ยวมีลักษณะกลมรีเรียงต่อกัน 2-3 เซลล์	
LK-SH2	แหลมกรวด	เปลือกหอย	กระบี่	เส้นสายตรงขนาดกลาง ไม่มีผนังกัน มี Gas vesicle	

4.2 ผลการศึกษาชนิดของไซยาโนแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

จากการนำตัวอย่างของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลทมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate บนอาหารแข็ง ASNIII จนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว แล้วทำการเช็คความบริสุทธิ์ของไซยาโนแบคทีเรียด้วยวิธีการเช็คบนอาหารแข็ง LB ว่าปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียพบว่า ได้ไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ปราศจากแบคทีเรียปนเปื้อนจำนวน 27 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท ST-ST1.5.1, SK-ST1.1, SK-ST1.2, PI-S1.1, VD-W, Y-SH8, TL-S, KM-ST9, KM-SH3, SR-SH2, S-SH3, TL-SH2, LK-SH2, MTN-SH5, MTN-SH9, RMK-SH10, PM-SH13, NM-SA4, N-ST1, N-ST2, JM-SH2, SSH-SH5, SSH-SH12, CHL-SH1, TL-SH4, NTR-S และ KK จากนั้น นำไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-chloroform-isoamylalcohol และวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล นำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า ปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย 1 แถบ และพบแถบอาร์เอ็นเอที่อยู่ต่ำกว่าแถบจีโนมิกดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ เมื่อเปรียบเทียบขนาดและปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียมีขนาดที่มากกว่า 23,000 คู่เบส และเมื่อคำนวณปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอพบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอมีความเข้มข้น 12-24 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.1)

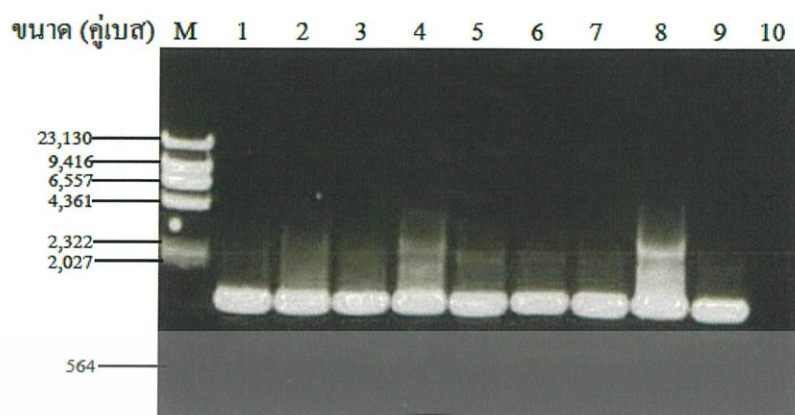
ขนาด (คู่เบส) M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



รูปที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III เลน 1-9 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท SR-SH2 (1) PL-S1.1 (2) KM-SH3 (3) MTN-SH5 (4) PM-SH13 (5) LK-SH2 (6) N-ST1 (7) NTR-S (8) และ RMK-SH10 (9)

จากนั้น นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 16S rDNA cyano F และ 16S rDNA cyano R ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์พบว่า ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรียมีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.2) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ผลผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* เลน N คือ Negative control ปราศจากการเติมจีโนมดีเอ็นเอ เลน 1-9 คือ ผลผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไอโซเลท PM-SH13 (1) S-SH3 (2) KM-SH3 (3) TL-SH2 (4) NM-SH1 (5) NTR-S (6) N-ST1 (7) PI-S1.1 (8) และ SR-SH2 (9)

จากนั้น นำผลผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction (Geneaid, Taiwan) และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม 16S rDNA cyano F และ 16S rDNA cyano R หยุดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye™ Terminator Reactions kit วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI PRISM 3700 DNA Analyzer และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากทะเลฝั่งอ่าวไทยและอันดามันมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน โดยมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Geitlerinema* sp. ทั้งหมด 20 ไอโซเลท *Synechococcus* sp. 1 ไอโซเลท *Dilabifilum* sp. 1 ไอโซเลท *Pseudanabaena* sp. 1 ไอโซเลท *Leptolyngbya* sp. 2 ไอโซเลท และ *Phormidium* sp. 2 ไอโซเลท โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนถึงร้อยละ 93-99 (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทะเลในประเทศไทยกับไซยาโนแบคทีเรียอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน

ไอโซเลท	แหล่งทะเล	แหล่งที่มา	จังหวัด	ไซยาโนแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
VD-W	อ่าววงเดือน	น้ำทะเล	ระยอง	<i>Synechococcus</i> sp.	98
TL-SH4	อ่าวท่าเลน	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Dilabifilum</i> sp.	99
TL-SH2	อ่าวท่าเลน	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Pseudanabaena</i> sp.	93
NTR-S	หาดนพรัตน์ธารา	น้ำทะเล	กระบี่	<i>Leptolyngbya</i> sp.	96
SSH-SH5	สุสานหอย	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Leptolyngbya</i> sp.	98
Y-SH8	หาดยาว	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Phormidium</i> sp.	97
KM-ST9	หาดคลองม่วง	หิน	กระบี่	<i>Phormidium</i> sp.	97
KM-SH3	หาดคลองม่วง	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Geitlerinema</i> sp.	98
SR-SH2	หาดสำราญ	เปลือกหอย	ตรัง	<i>Geitlerinema</i> sp.	98
S-SH3	หาดสั้น	เปลือกหอย	ตรัง	<i>Geitlerinema</i> sp.	99
TL-SH2	อ่าวท่าเลน	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Geitlerinema</i> sp.	96
LK-SH2	แหลมกรวด	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Geitlerinema</i> sp.	99
MTN-SH5	หาดมุดตานอย	เปลือกหอย	ตรัง	<i>Geitlerinema</i> sp.	98
MTN-SH9	หาดมุดตานอย	เปลือกหอย	ตรัง	<i>Geitlerinema</i> sp.	96
RMK-SH10	หาดราชมงคล	เปลือกหอย	ตรัง	<i>Geitlerinema</i> sp.	98
PM-SH13	หาดปากเมง	เปลือกหอย	ตรัง	<i>Geitlerinema</i> sp.	96
NM-SA4	อ่าวน้ำเมา	ทราย	กระบี่	<i>Geitlerinema</i> sp.	98
NM-SH1	อ่าวน้ำเมา	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Geitlerinema</i> sp.	99
N-ST1	อ่าวนาง	หิน	กระบี่	<i>Geitlerinema</i> sp.	97
N-ST2	อ่าวนาง	หิน	กระบี่	<i>Geitlerinema</i> sp.	96
SK-ST1.1	หาดทรายแก้ว	หิน	ชลบุรี	<i>Geitlerinema</i> sp.	99
SK-ST1.2	หาดทรายแก้ว	หิน	ชลบุรี	<i>Geitlerinema</i> sp.	99
CHL-SH1	หาดฉางกลาง	เปลือกหอย	ตรัง	<i>Geitlerinema</i> sp.	98
ST-ST1.5.1	หาดทรายทอง	หิน	ชลบุรี	<i>Geitlerinema</i> sp.	98
PI-S1.1	อ่าวไผ่	น้ำทะเล	ระยอง	<i>Geitlerinema</i> sp.	99
JM-SH2	หาดเจ้าไหม	เปลือกหอย	ตรัง	<i>Geitlerinema</i> sp.	97
SSH-SH12	สุสานหอย	เปลือกหอย	กระบี่	<i>Geitlerinema</i> sp.	98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวทั้งหมดจำนวน 74 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายในอาหารเหลว ASNIII และ ASNIII ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน นำไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์อีกครั้งและกระจายเซลล์ในอาหาร ASNIII และ ASNIII ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ใส่ในขวดแก้วและนำไปปรับตัวในสภาวะต่างๆ 4 สภาวะ ได้แก่ สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด สภาวะปราศจากอากาศในที่ที่มีแสง สภาวะที่มีอากาศในที่มืด และสภาวะที่มีอากาศในที่ที่มีแสง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำก๊าซด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท JM-W, JT-W, KT-W2, KVM-ST4, NR-ST2.2, SKR-SA1 และ TL-SH4 และไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท PKR-ST1 เป็นจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวที่ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มืดมากกว่าสภาวะอื่นๆ (ตารางที่ 4.5) นอกจากนี้ ยังพบว่าไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1, P-SA1.3, S-S และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงในสภาวะที่ปราศจากอากาศทั้งในที่มืดและในที่ที่มีแสง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 171.728 ± 2.291 , 114.206 ± 7.376 , 241.597 ± 2.715 , 103.658 ± 0.188 , 135.013 ± 5.670 , 121.332 ± 7.783 และ 168.432 ± 3.610 , 141.252 ± 11.845 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1, P-SA1.3, S-S และ RMK-SH10 ในสภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มืดและในที่ที่มีแสง ตามลำดับ ในกรณีของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวไอโซเลท LSD-W2 มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 66.47 ± 5.44 และ 67.69 ± 1.77 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในสภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มืดและในที่ที่มีแสง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

จากการศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทยนี้ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการผลิตไฮโดรเจนที่สูงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากการขาดไนโตรเจนส่งผลให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนอย่างเห็นได้ชัด แต่จะส่งผลเพียงเล็กน้อยกับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว การขาดแหล่งไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรียจะทำให้เกิดการสะสมไกลโคเจนเพิ่มมากขึ้น เมื่อบ่มเซลล์ในที่มืดและปราศจากอากาศ เซลล์จะเกิดสลายไกลโคเจนได้น้ำตาลรีดิวซ์จำนวนมาก เพื่อใช้ในกิจกรรมของเซลล์และเป็นแหล่งรีดักแทนท์สำหรับการผลิตไฮโดรเจน การเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารจะไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เซลล์สูญเสียอิเล็กตรอนไปในกระบวนการรีดักชันไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และยังมีผลต่อการสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในบางสายพันธุ์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ทำให้ภายในเซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบในไซยาโนแบคทีเรียเป็นเอกสารที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Oscillatoria* sp. Miami BG7 (Kumazawa and Mitsui, 1981), *Gloeocapsa alpicola* (Serebryakova et al., 1998; Troshina et al., 2002), *Arthrospira maxima* (Ananyev et al., 2008) และ *Aphanothece halophytica* (Taikhao et al., 2013) ในสาหร่ายสีเขียวมีรายงานการศึกษาพบว่า การขาดแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวจะส่งผลทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (Maneeruttanarungroj et al., 2011) จากการทดลองไฮยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1, P-SA1.3, S-S และ RMK-SH10 ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงทั้งในปราศจากอากาศทั้งในที่มืดและที่มีแสง ดังนั้นจึงนำไฮยาโนแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทมาทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในระยะเวลายาว เพื่อคัดเลือกไฮยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

จากการนำไฮยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1, P-SA1.3, S-S และ RMK-SH10 มาทำการศึกษาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASN III เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำเซลล์มากระจายในอาหารเหลว ASN III ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์อีกครั้งและกระจายเซลล์ในอาหาร ASN III และ ASN III ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้วพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปรับตัวในที่มืดและสว่างภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เป็นเวลา 1 สัปดาห์พบว่า ไฮยาโนแบคทีเรียไอโซเลท RMK-SH10 และ ไอโซเลท P-SH8.2.1 มีการผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงกว่า ไอโซเลท P-SA1.3 และไอโซเลท S-S ทั้งในสภาวะที่มืดและสว่าง โดยมีการผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงที่สุดที่เวลา 24-48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3 และ 4.4) ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกไฮยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดมาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกมาจากน้ำทะเลในประเทศไทย

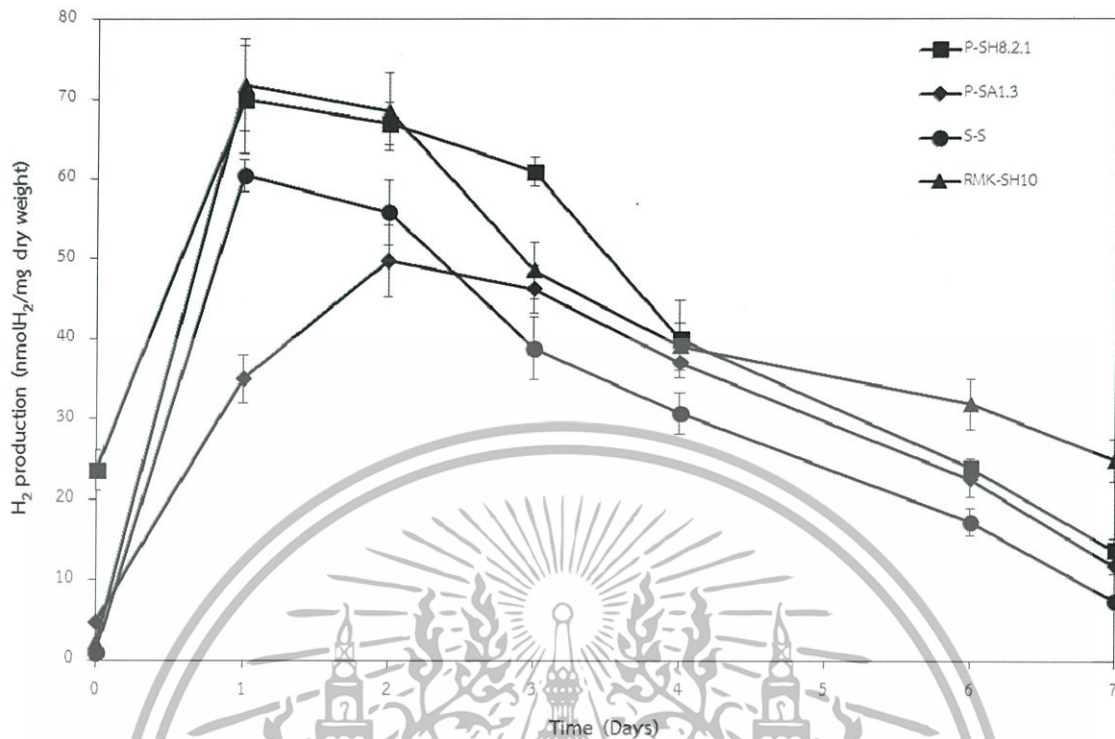
Strains	Origin	Habitat	H ₂ production yields (nmolH ₂ mg dry wt. ⁻¹)			
			Anaerobic		Aerobic	
			darkness	light	darkness	light
JM-W	Jaomai, Trang	seawater	0	0	0	0
JT-W	Jomtien, Chonburi	seawater	0	0	0	0
KT-W2	Krating, Chanthaburi	seawater	0	0	0	0
KT-W3	Krating, Chanthaburi	seawater	64.13±3.20	2.84±0.07	0.71±0.04	0
KVM-ST4	Kungviman, Chanthaburi	stone	0	0	0	0
KVM-ST4.2	Kungviman, Chanthaburi	stone	0.08±0.01	0	0	0
LS-W1	Laemsing, Chanthaburi	seawater	1.33±0.01	0	0.42±0.04	0
LSD-W2	Laemsadet, Chanthaburi	seawater	66.47±5.44	67.69±1.77	0	0
N-W	Nang, Krabi	seawater	0.58±0.03	0	0	0
NE-W	Neun, Chonburi	seawater	0.50±0.04	0.11±0.01	0	0
NR-ST2.2	Nangram, Chonburi	stone	0	0	0	0
NTR-W	Nopparattara, Krabi	seawater	18.23±0.80	16.72±0.81	1.98±0.180	0.40±0.030
P-ST2.3	Phla, Rayong	stone	24.75±0.11	1.70±0.07	0	0
PM-SH14	Pakarang, Trang	shell	14.45±0.29	1.05±0.04	0	0
SK-W2.2	Saikeaw, Chonburi	seawater	0.70±0.02	0	0	0
SKR-SA1	Saikeaw, Rayong	sand	0	0	0	0
SR-W	Samran, Trang	seawater	0.68±0.03	0	0	0
TG-W2.3	Toeingam, Chonburi	seawater	14.12±0.35	27.50±0.69	0	0
TL-SH4	Talan, Krabi	shell	0	0	0	0
VD-ST2.1	Vongdeuan, Rayong	stone	64.00±1.15	1.00±0.05	0	0
SKR-W2.2	Saikeaw, Rayong	seawater	108.679±3.127	11.121± 0.806	59.751±4.290	0
P-SH8.2.1	Phla, Rayong	shell	171.728±2.291	114.206± 7.376	142.422±0.806	5.978±0.326
JL-SH1	Jaolao, Chanthaburi	shell	5.908 ±0.112	83.764± 5.069	0	0.626±0.075
JL-W2	Jaolao, Chanthaburi	seawater	5.440±1.045	1.789± 0.141	3.964±0.021	0.170±0.010
MP-W	Makhampom, Rayong	seawater	8.582±0.694	0	3.455±0.057	0
LSD-W3	Laemsadet, Chanthaburi	seawater	3.394±0.366	2.849±0.013	0	0
P-SA1.1	Phla, Rayong	sand	241.597± 2.715	103.658±0.188	5.440±0.120	1.087±0.006
S-S	San, Trang	seawater	135.013±5.670	121.332±7.783	0.312±0.029	0.327±0.018
WI-SH3	Wai, Rayong	shell	64.227±4.639	1.620±0.107	0	0
VD-SH2.3	Vongdeuan, Rayong	shell	46.967±1.261	18.585±1.051	0.176±0.005	0.337±0.017
SS-ST6	Samaesan, Chonburi	stone	56.501±3.779	10.836±0.195	0	0
SK-ST2.1	Saikeaw, Chonburi	stone	69.551±5.604	13.862±0.261	0.223±0.015	1.229±0.013
P-W2.1	Phla, Rayong	seawater	74.9137±4.819	9.375±0.565	4.7512±0.113	0.738±0.028
YL-SH4	Yonglin, Trang	shell	68.3565±3.539	1.953±0.056	0	0
PKR-ST1	Pakarang, Rayong	stone	0	0	0	0
LSD-SH2	Laemsadet, Chanthaburi	shell	193.313±1.006	22.087±0.120	94.484±6.360	6.287±0.076
MTN-SH9	Modtanoy, Trang	shell	114.670±9.476	64.232±2.309	21.366±1.577	1.146±0.064

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

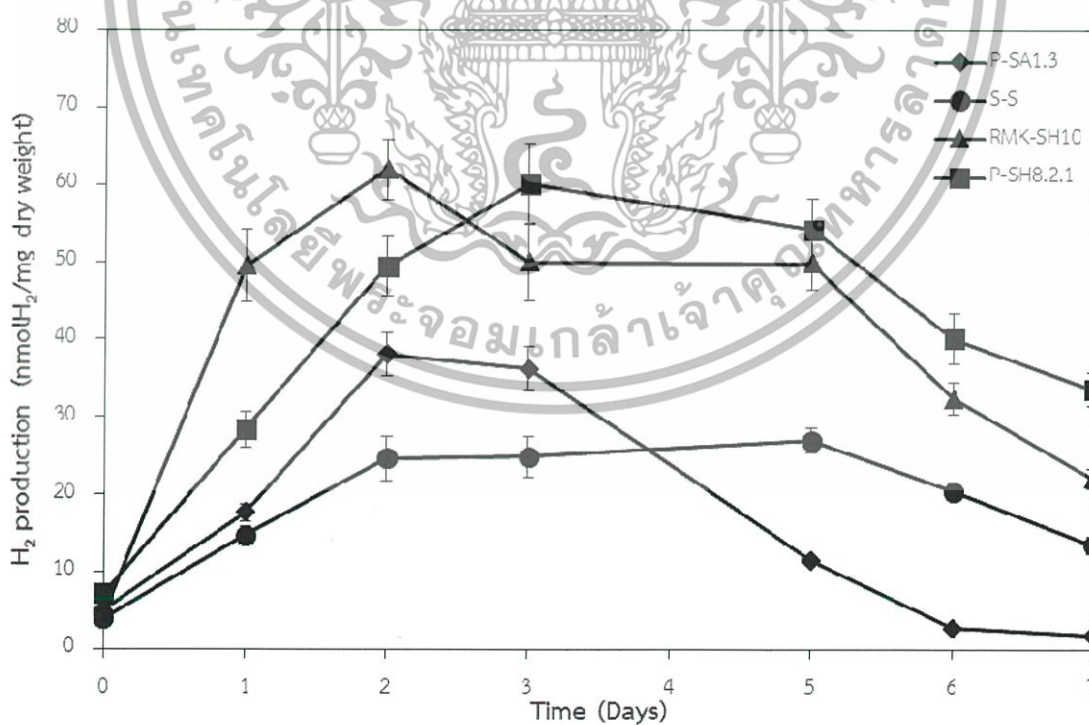
ตารางที่ 4.4 ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกมาจากน้ำทะเลในประเทศไทย (ต่อ)

Strains	Origin	Habitat	H ₂ production yields (nmolH ₂ mg dry wt. ⁻¹)			
			Anaerobic		Aerobic	
			darkness	Light	darkness	light
NR-SH2	Nangram, Chonburi	shell	56.624±2.439	24.769±1.596	0	0
LS-W2	Laelsing, Chanthaburi	seawater	30.240±1.541	4.520±0.220	1.658±0.155	0.674±0.050
P-ST2.3	Phla, Rayong	stone	34.371±2.159	1.552±0.076	0	0
MP-SA1	Makhampom, Rayong	sand	5.378±0.451	3.849±0.163	0	0
JL-SA1	Jaolao, Chanthaburi	sand	28.312±1.669	1.679±0.141	0	0
CHL-SH10	Changlang, Trang	shell	0.761±0.009	0	0	0
PR-SH1	Prao, Rayong	shell	112.989±8.679	0	0	0
PR-SH9	Prao, Rayong	shell	59.473±3.799	0	0	0
PKR-W3	Pakarang, Rayong	seawater	75.150±3.045	0	0	0
KVM-W1	Kungviman, Chanthaburi	seawater	212.098±5.221	2.871±0.178	23.055±1.187	0
TG-W2.3.3	Toeingam, Chonburi	seawater	113.827±0.556	0.919±0.076	1.495±0.124	0
WI-SA1	Wai, Rayong	sand	5.719±0.114	0	0	0
LK-SH2	Laemkruat, Krabi	shell	150.999±12.776	7.2733±0.726	0	0
PI-S1.1	Phai, Rayong	seawater	34.668±2.840	0	0	0
PM-SH13	Pakarang, Trang	shell	102.968±6.595	0.573±0.025	0	0
NM-SA4	Nummao, Krabi	sand	38.550±3.707	5.581±0.191	0	0
RMK-SH10	Rachmonkol, Trang	shell	168.432±3.610	141.252±11.845	1.251±0.050	1.408±0.013
N-ST2	Nang, Krabi	stone	109.765±5.980	13.034±0.836	51.399±3.973	5.106±0.249
NM-SH1	Nummao, Krabi	shell	181.428±6.218	20.722±1.653	2.734±0.230	2.033±0.179
MTN-SH5	Modianoy, Trang	shell	82.610±6.230	1.453±0.018	4.928±0.086	2.514±0.033
N-ST1	Nang, Krabi	stone	83.135±1.037	6.886±0.346	0.888±0.013	1.702±0.133
SSH-SH12	Susanhoi, Krabi	shell	285.358±2.704	33.308±0.595	7.598±0.388	3.435±0.144
SK-ST1.1	Saikaew, Chonburi	stone	95.843±3.282	31.183±2.286	25.553±1.133	3.072±0.204
SR-SH4	Samran, Trang	shell	98.530±6.263	8.615±0.657	3.270±0.075	1.323±0.064
S-SH3	San, Trang	shell	114.066±1.244	2.015±0.147	0	0
JM-SH2	Jaomai, Trang	shell	160.957±4.656	46.904±1.283	0	0
KK	Koh Kood, Trad	seawater	19.167±0.849	30.497±1.671	1.300±0.093	0
NTR-S	Nopparattara, Krabi	seawater	87.613±2.600	8.186±0.523	0	0
SSH-SH5	Susanhoi, Krabi	shell	70.399±2.927	0	0	0
KM-ST9	Klongmuang, Krabi	stone	41.230±2.666	5.506±0.202	0	0
Y-SH8	Yao, Trang	shell	75.963±2.641	12.803±1.045	13.112±0.751	3.371±0.181
TL-S	Thalane, Krabi	seawater	25.208±0.606	5.146±0.086	0	0
VD-W	Vongdeuan, Rayong	seawater	0.258±0.006	0	0	0
SK-ST1.2	Saikaew, Chonburi	stone	119.4534±7.086	7.607±0.373	0	0.292±0.003
ST-ST1.5.1	Saitong, Rayong	stone	108.694±1.847	120.970±2.814	1.251±0.050	1.418±0.001
KM-SH3	Klongmuang, Krabi	shell	109.765±5.980	13.034±0.836	43.644±1.717	5.106±0.249
TL-SH2	Thalane, Krabi	shell	126.327±5.250	32.422±0.753	2.075±0.007	2.033±0.179

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ในสภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์



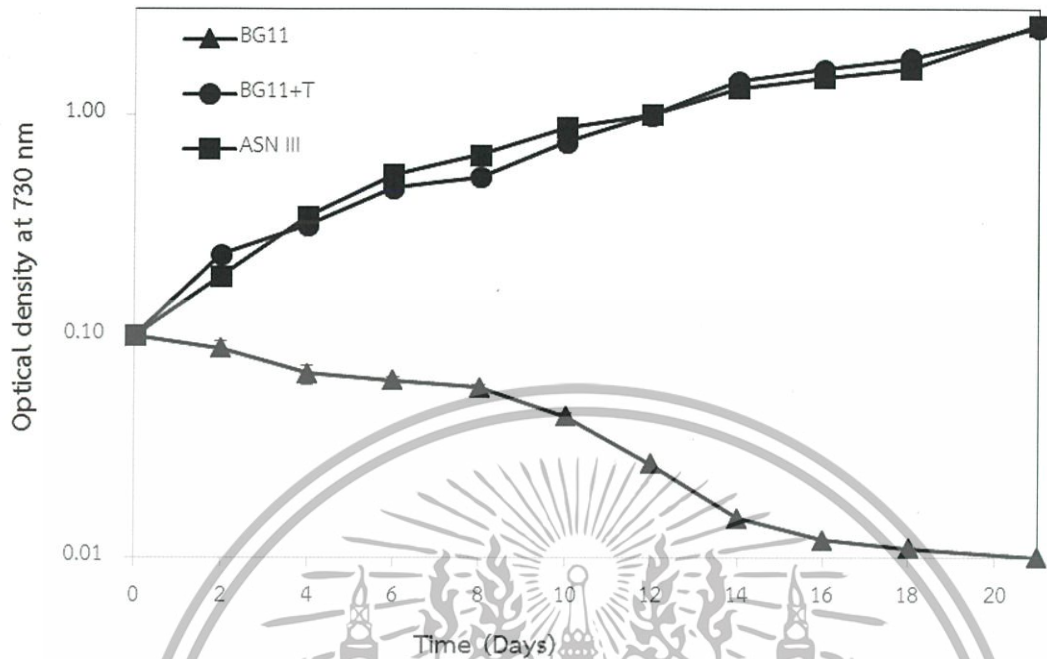
รูปที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ในสภาวะที่ปราศจากอากาศในที่สว่างเป็นเวลา 1 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

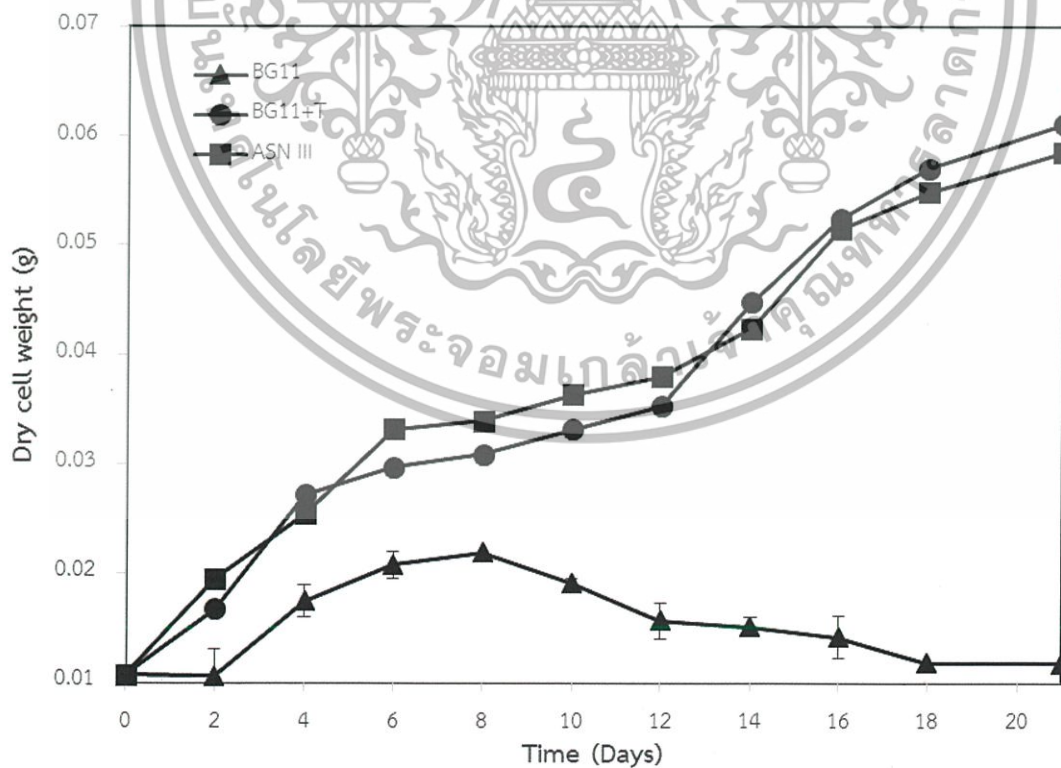
4.4 ผลของชนิดของอาหารต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11, BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครโอสโตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นทำการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 ที่เป็นโคลนนี้เดี่ยวจะทำการวัดการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ในขณะที่ไอโซเลท RMK-SH10 ซึ่งเป็นเส้นสายจะทำการวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลการทดลองพบว่าไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ ASN III มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร BG11 (รูปที่ 4.5 และ 4.6) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากน้ำทะเล จึงไม่สามารถสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ได้ ดังนั้น จึงทำการเลือกอาหาร ASNIII เป็นอาหารคัดเลือกในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป เนื่องจากอาหาร ASNIII หรือ ASNIII seawater medium เป็นอาหารสากลที่ใช้เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีน้ำเค็ม (Rippka et al., 1979) ซึ่งมียุทธศาสตร์การศึกษาคือเป็นจำนวนมากที่ใช้อาหาร ASNIII มาทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีน้ำเค็ม เช่น ในไซยาโนแบคทีเรีย *Phormidium valderianum* BDU 20041 (Prabaharan and Subramanian, 1996) และ *Oscillatoria willei* BDU 130511 (Saha et al., 2003) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 ในอาหาร BG11, BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ ASNIII



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท RMK-SH10 โดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

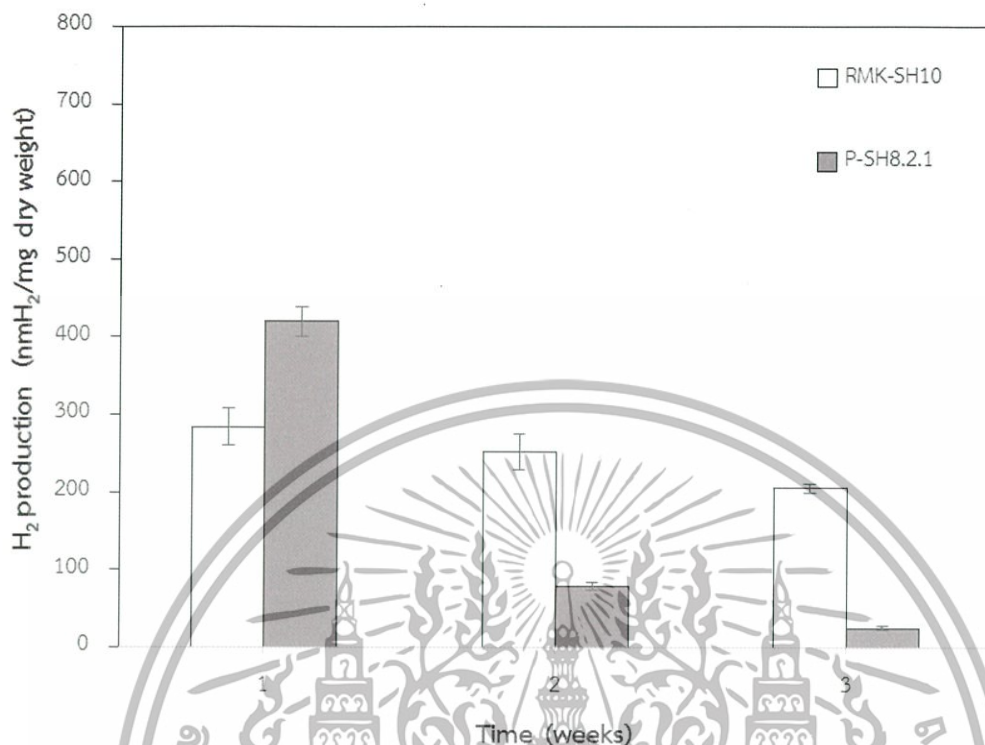
ในอาหาร BG11, BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ ASN III

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโรงเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไฮโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไฮโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครโวนส์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้วและนำไปปรับตัวในที่มืดภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไฮโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 3 สัปดาห์ โดยผลิตไฮโดรเจนได้ 420.222 ± 19.033 และ 284.166 ± 23.846 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.7) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในสัปดาห์ที่ 1 เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่อยู่ในระยะ log phase มีการผลิตพลังงานที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง และสะสมสารประกอบคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์มากขึ้น พลังงานและคาร์โบไฮเดรตที่สะสมนี้จะกลายเป็นแหล่งอิเล็กตรอนในสถานะที่เซลล์อยู่ในระยะการปรับตัวภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตไฮโดรเจนที่มากขึ้น ทั้งนี้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้ออีกด้วย ด้วยเหตุนี้ ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

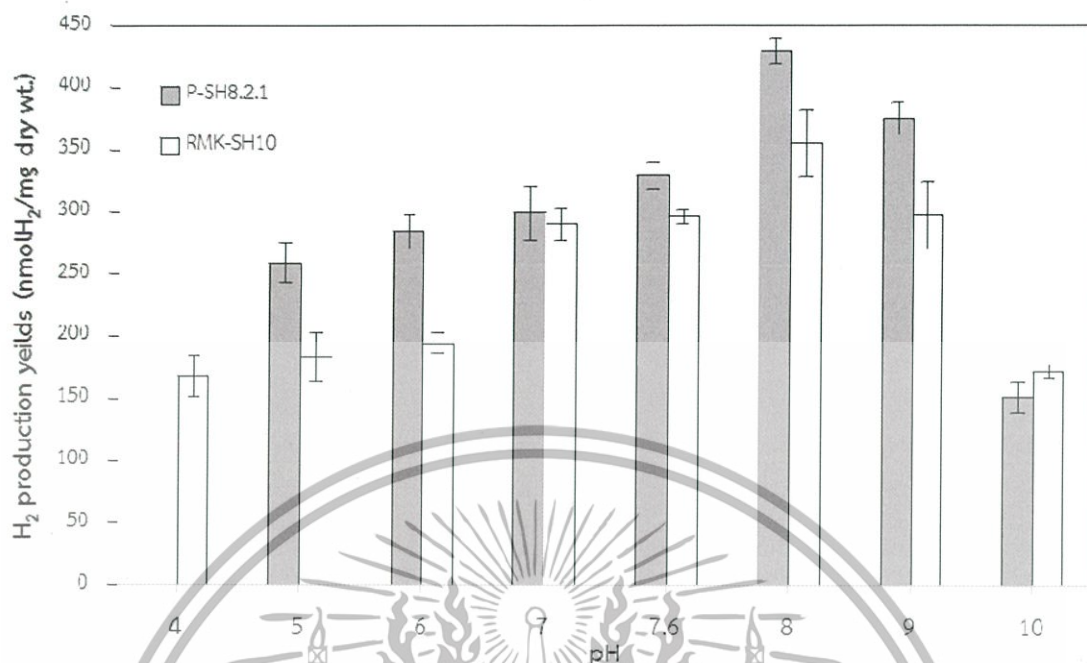


รูปที่ 4.7 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์

4.6 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโอสไนต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASN III ที่ปราศจากไนโตรเจน เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเติมปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารตั้งแต่ 4, 5, 6, 7, 7.6, 8, 9 และ 10 (ปรับพีเอชด้วย Universal buffer) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนและมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีการผลิตเท่ากับ 429.802 ± 10.335 และ 355.706 ± 27.341 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูป 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



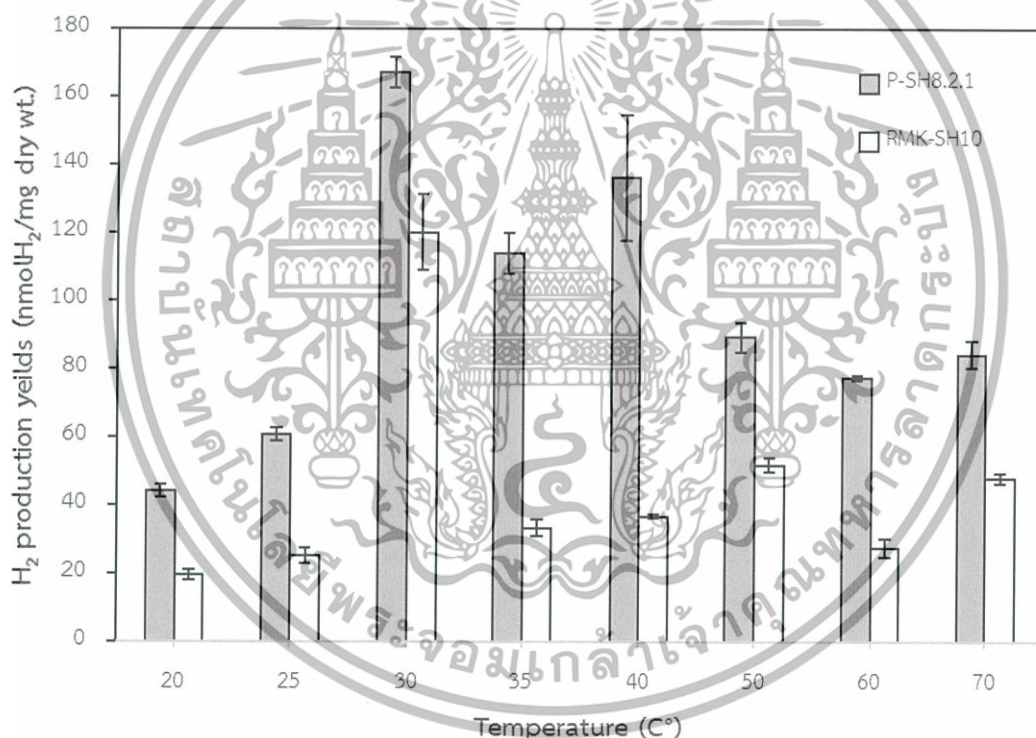
รูปที่ 4.8 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

ปัจจัยทางกายภาพหรือปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น ความเข้มของแสง อุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ล้วนมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ในไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนเช่นกัน มีรายงานพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมการทำงานของไฮโดรจีเนส โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนอยู่ระหว่าง 5 ถึง 9 (Troshi et al., 2002; Antal and Linblad, 2005; Baebprasert et al., 2010) ซึ่งจากรูปที่ 4.8 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 น่าจะเท่ากับ 8 โดยจะส่งผลต่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ดีที่สุด ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มขวดที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีการผลิตเท่ากับ 167.175 ± 4.422 และ 120.184 ± 11.016 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูป 4.9)



รูปที่ 4.9 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเช่นเดียวกับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยปกติอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย ส่วนมากจะอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส เช่น *Nostoc muscorum* SPU004 ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Datta et al., 2000) *Anabeana variabilis* SPU003 ผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Serebryakova et al., 2000) ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดที่อุณหภูมิ

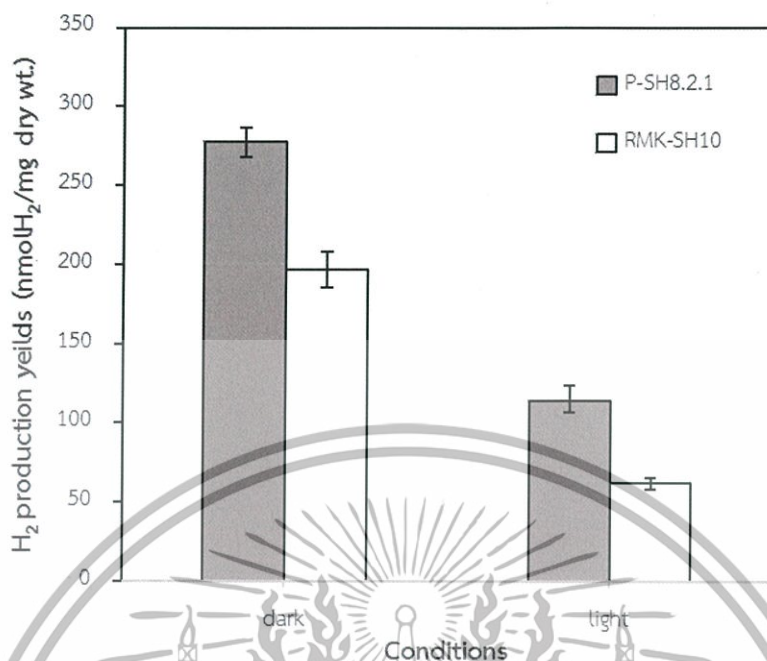
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่แจ้งชื่อของนักวิจัย
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50-70 องศาเซลเซียส (Baebprasert et al., 2010) ในไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม เช่น *Phormidium valderibilis* BDU 20041 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส (เปรียบเทียบระหว่างอุณหภูมิ 20, 27 และ 30 องศาเซลเซียส) (Prabaharan and Subramanian, 1996) และ *Aphanothece halophytica* ผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Taikhao et al., 2013)

4.8 ผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยบ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศในที่มืดและไม่มีแสง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีพบว่าไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASN III ปราศจากไนโตรเจนในสภาวะไร้อากาศในที่มืด มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 277.296 ± 9.449 และ 196.788 ± 11.158 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (รูป 4.10) แสงเป็นปัจจัยทางด้านกายภาพปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและการผลิตไฮโดรเจน โดยส่วนใหญ่ ไซยาโนแบคทีเรียจะสามารถผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในสภาวะไร้อากาศในที่มืด เนื่องจากภายใต้สภาวะที่มีแสง จะมีปริมาณออกซิเจนมากขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยการแตกตัวของในระบบแสงสอง (PSII) ซึ่งออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการนี้มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไร้อากาศในที่มืด มีรายงานพบว่า *Spirulina* (*Arthrosira platensis*) ผลิตไฮโดรเจนได้ดีในสภาวะปราศจากอากาศทั้งที่มีแสงและไม่มีแสง แต่มี *Spirulina* บางชนิด สามารถผลิตได้ในสภาวะที่มีแสงเท่านั้น (Aoyama et al., 1997) *Synechococcus* sp. PCC942 ผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะปราศจากอากาศและไม่มีแสงเท่านั้น (Asada and Miyake, 1999) และ *Nostoc muscorum* ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณมากเมื่ออยู่ในสภาวะไม่มีแสงเท่านั้น (Shah et al., 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

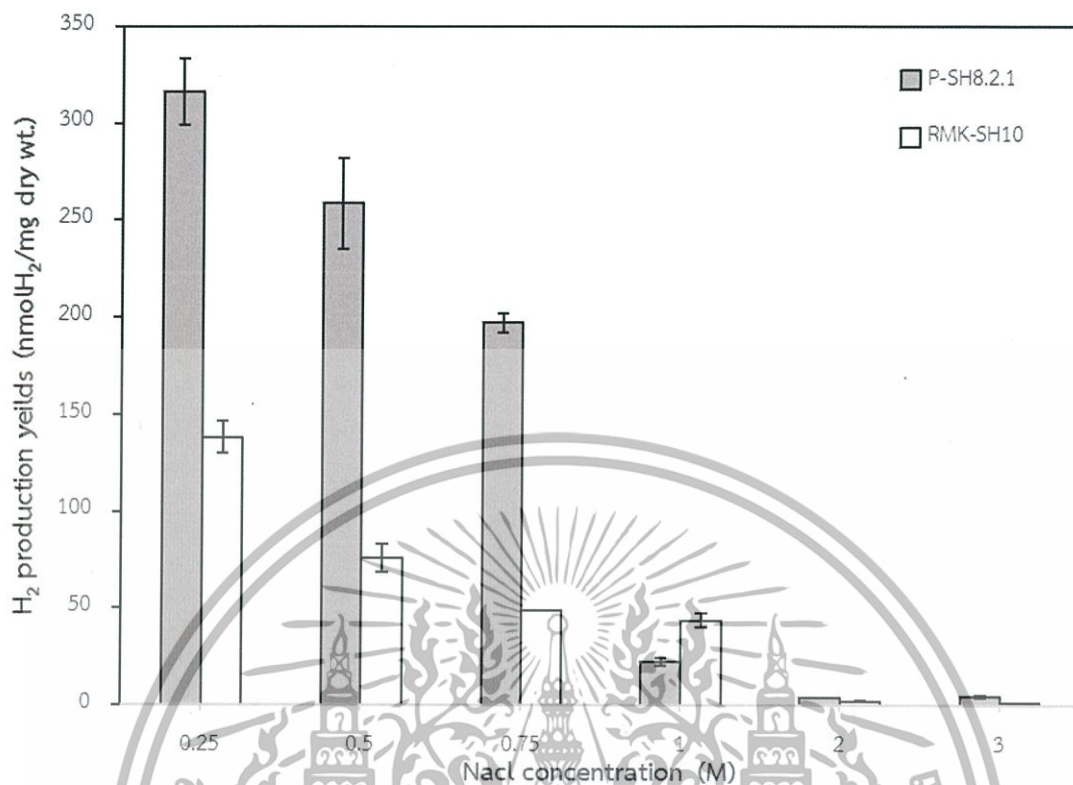


รูปที่ 4.10 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนในสภาวะไร้อากาศในที่มืดและมีแสง

4.9 ผลของไซเตียมคลอไรด์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินส์ไตนิตต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของไซเตียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 และ 3 โมลาร์ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASN III ที่ปราศจากไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของไซเตียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์ มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 316.253 ± 17.369 และ 138.267 ± 8.442 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูป 4.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



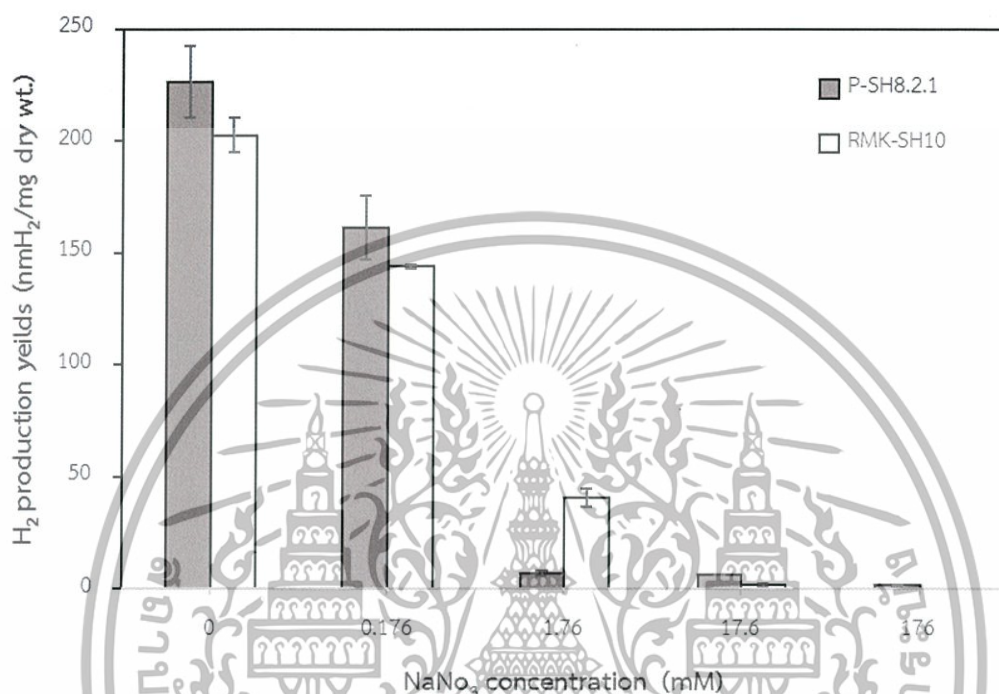
รูปที่ 4.11 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

มีรายงานพบว่า ความเค็มมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนเช่นกัน โดยเมื่อความเค็มเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (Stah et al., 2003) เนื่องมีการนำพลังงานที่ได้จาก Reductant ไปใช้เพื่อขับไอออนของโซเดียมออกจากเซลล์ เพื่อป้องกันการเกิดการพองตัวในเซลล์ และป้องกันไอออนของโซเดียมไซโตแพธเข้าสู่เซลล์ (Rai et al., 1995) จากรูปที่ 4.16 แสดงให้เห็นว่ามีความเค็มสูงขึ้น ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 คือ 0.25 โมลาร์

4.10 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิม ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดตั้งแต่ 0, 0.176, 1.76, 17.6 และ 176 มิลลิเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมลาร์ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASN III ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรดผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 226.468 ± 15.945 และ 202.497 ± 7.868 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.12)



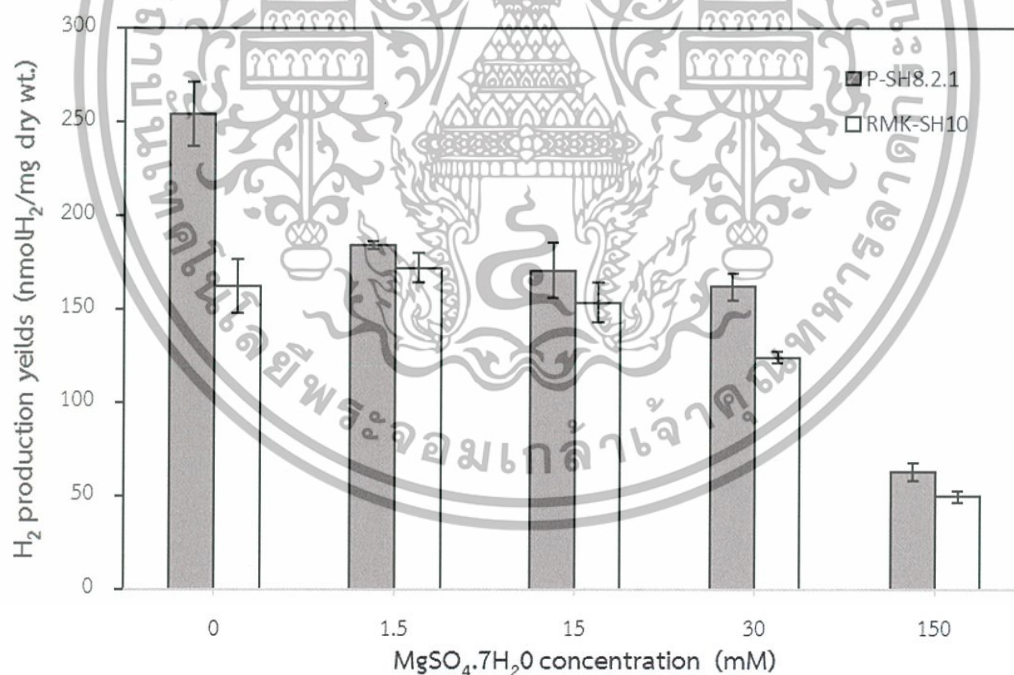
รูปที่ 4.12 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรด

ไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญสำหรับไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำงานภายในเซลล์ การขาดไนโตรเจนจะสามารถเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากการขาดไนโตรเจนทำให้เกิดการสะสมของคาร์โบไฮเดรตในรูปของไกลโคเจนซึ่งในสภาวะที่ปราศจากอากาศ ไกลโคเจนที่สะสมนี้จะสลายและให้อิเล็กตรอนจำนวนมากสำหรับเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะไร้อากาศแบบนี้เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบ Indirect photolysis (Yu and Takahashi, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.11 ผลของความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียโอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียโอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASN III โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวน์สไต้น์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิม ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตตั้งแต่ 0, 1.5, 15, 30 และ 150 มิลลิโมลาร์ และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียโอโซเลท P-SH8.2.1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนและปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 254.387 ± 17.208 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ส่วนไซยาโนแบคทีเรียโอโซเลท RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASN III ที่ปราศจากไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 1.5 มิลลิโมลาร์ มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 172.170 ± 7.724 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียโอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

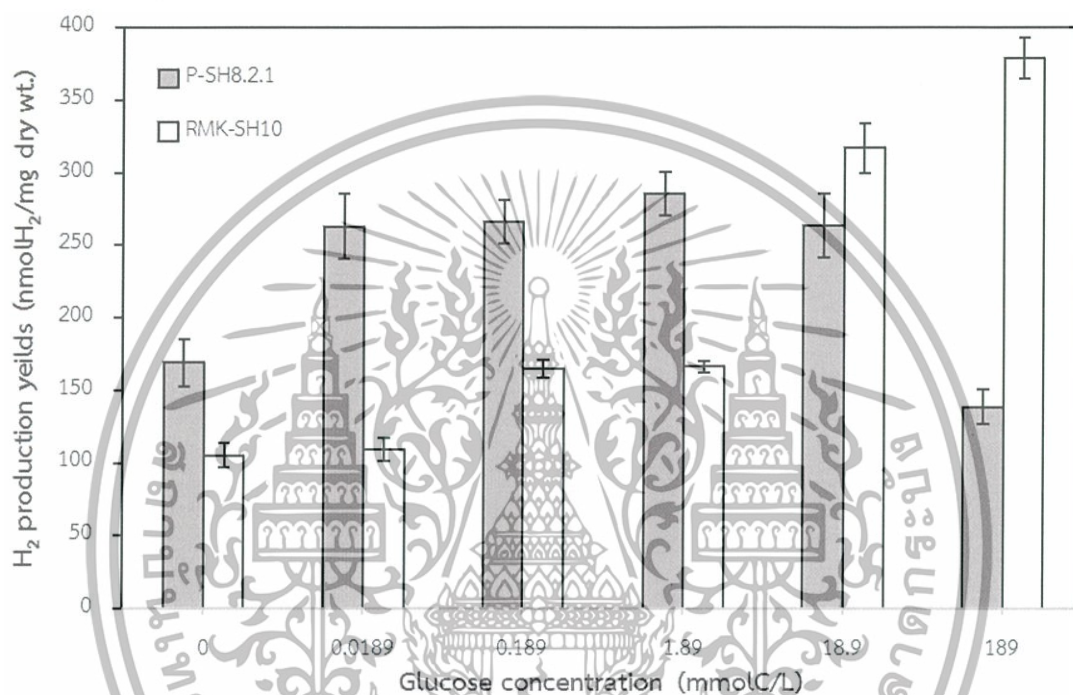
ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารหลักชนิดหนึ่งที่สำคัญสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์และมีความสำคัญต่อการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ โดยซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมทไทโอนีน การขาดแหล่งซัลเฟอร์จะทำให้การสังเคราะห์โปรตีนเป็นไปอย่างไม่ถูกต้องและสมบูรณ์ ทำให้เซลล์มีกิจกรรมต่างๆ ลดลง รวมถึงการสังเคราะห์แสงด้วย มีรายงานว่า การขาดซัลเฟอร์ทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น เนื่องจากขาดการซ่อมแซมโปรตีนในระบบแสงสอง (PSII) จึงส่งผลให้เกิดการผลิตออกซิเจนน้อยลง (Antal and Lindblad, 2005)

4.12 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนและแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 0, 0.189, 1.89, 18.9 และ 189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำเซลล์มากระจายในอาหารเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร เปิดสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว นำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำใบวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1.89 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 285.390 ± 14.938 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีค่าการผลิตไฮโดรเจนใกล้เคียงกับที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ และผลิตไฮโดรเจนลดลงในอาหารที่ปราศจากน้ำตาลกลูโคส และที่ความเข้มข้นของกลูโคส 189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ส่วนไอโซเลท RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 379.068 ± 13.995 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 4.14) โดยทั่วไปแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกออโตโทรฟ (Autotroph) ซึ่งสามารถสังเคราะห์สารอาหารได้เองจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ ทั้งนี้ไซยาโนแบคทีเรียมีความหลากหลาย บางชนิดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากภายนอกได้ แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทำให้เกิดความแตกต่างของตัวให้อิเล็กตรอนที่แตกต่างกันและมีการผลิตไฮโดรเจน (Datta et al., 2000) จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1.89 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ไอโซเลท P-SH8.2 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 285.390 ± 14.938 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง และพบว่าการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 4.14) น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากจะไปเพิ่มการรีดิวซ์ NAD(P)H ให้เอนไซม์ไปไดเรกชันนาลไฮโดรจีนเนสผลิตไฮโดรเจน ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง ทำให้เซลล์ใช้พลังงานในการขับน้ำตาลที่มากเกินไปออกนอกเซลล์ จึงทำให้ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Baebprasert et al., 2010) อย่างไรก็ตาม ในไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท RMK-SH10 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลับพบว่ามีการผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคาร์บอนสูงขึ้น และสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร (รูปที่ 4.14) แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท RMK-SH10 สามารถใช้ NAD(P)H และอิเล็กตรอนจากน้ำตาลกลูโคสได้ดีกว่าไอโซเลท P-SH8.2 โดยมีรายงานพบว่าไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่ตรึงไนโตรเจนมีการใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และใช้ ATP มาผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Datta et al., 2000)

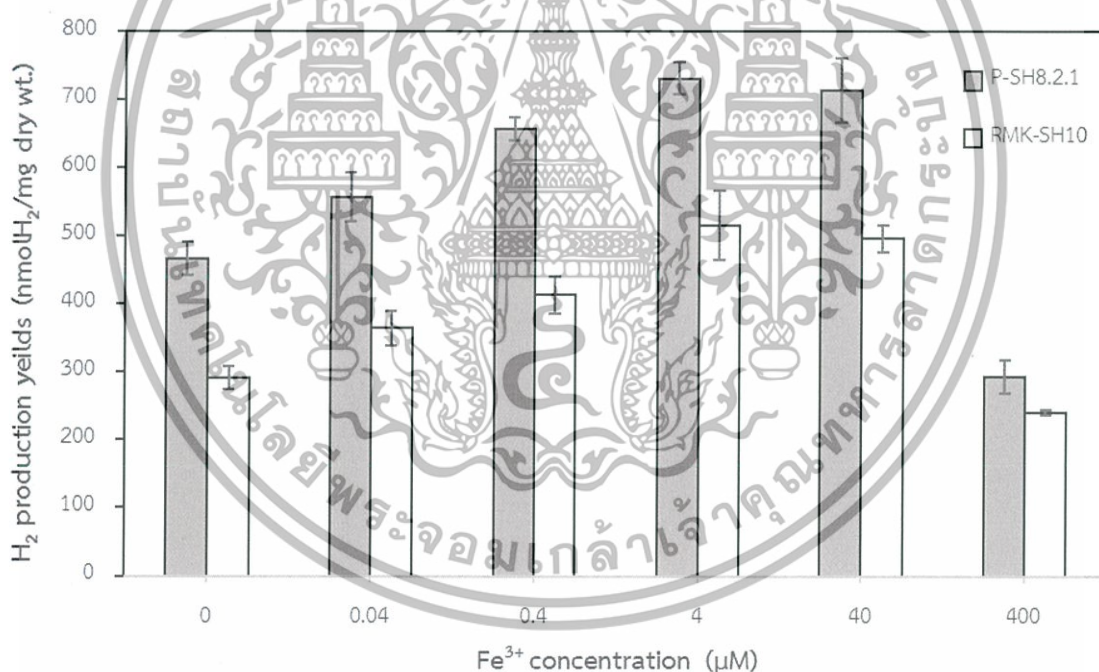


รูปที่ 4.14 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส

4.13 ผลของความเข้มข้นของเหล็กไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันความเข้มข้นของ Fe^{3+} ตั้งแต่ 0, 0.04, 0.4, 4, 40 และ 400 ไมโครโมลาร์ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเต็มปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว และนำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของ Fe^{3+} 4 ไมโครโมลาร์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 729.967 ± 23.646 และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

514.407±50.868 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกับการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของ Fe^{3+} 40 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.15) เหล็กเป็นธาตุอาหารรองอนินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเกือบทุกชนิด เป็นธาตุที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อเซลล์สำหรับ นอกจากนี้ เหล็กเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการหายใจ กระบวนการตรึงไนโตรเจน และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และเหล็กยังเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสโดยเอนไซม์จะรับอิเล็กตรอนจากตัวรีดิวซ์และถ่ายทอดไปยังโมเลกุลของเหล็ก ซึ่งจะส่งไปยังโปรตอนเพื่อเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนต่อไป (Kupper et al., 2008) ดังนั้น การขาดเหล็กจึงทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานลดลง จากการทดลองนี้พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Fe^{3+} 4 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Fe^{3+} เป็น 40 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง และลดลงอย่างมากที่ความเข้มข้นของ Fe^{3+} 400 ไมโครโมลาร์ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนคือ 4 ไมโครโมลาร์



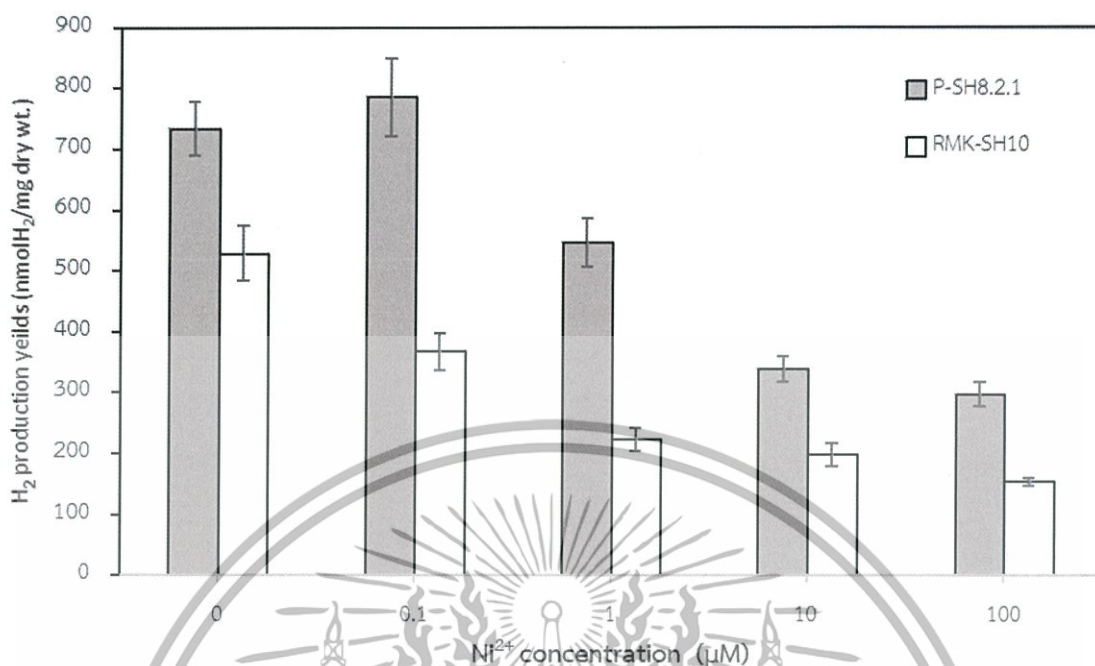
รูปที่ 4.15 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของ Fe^{3+}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.14 ผลของความเข้มข้นของนิกเกิลไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท

P-SH8.2.1 และ RMK-SH10

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ASNIII เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเหลว ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจน ที่แปรผันความเข้มข้นของ Ni^{2+} ตั้งแต่ 0, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลาย เซลล์ลงในขวดแก้ว และนำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นของ Ni^{2+} เท่ากับ 0.1 ไมโครโมลาร์ มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 733.750 ± 43.565 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ไม่มีความแตกต่างของการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนโตรเจนและปราศจาก Ni^{2+} (รูปที่ 4.16) ส่วนไอโซเลท RMK-SH10 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ASN III ที่ปราศจากไนโตรเจนและปราศจาก Ni^{2+} โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 528.080 ± 44.698 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง นิกเกิลมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (NiFe-hydrogenase) เช่นเดียวกับเหล็กไอออน (Axelsson and Lindblad, 2002; Gutekunst et al., 2006) จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ Ni^{2+} ในระดับต่ำ (0.1 ไมโครโมลาร์) เพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท โดยสามารถกระตุ้นการทำงานของบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Ni^{2+} เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง แสดงว่าความเข้มข้นของ Ni^{2+} ที่สูงขึ้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Daddy et al., 1995) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของ Ni^{2+} ที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนคือ 0.1 และ 0 ไมโครโมลาร์ในไอโซเลท P-SH8.2.1 และไอโซเลท RMK-SH10 ตามลำดับ



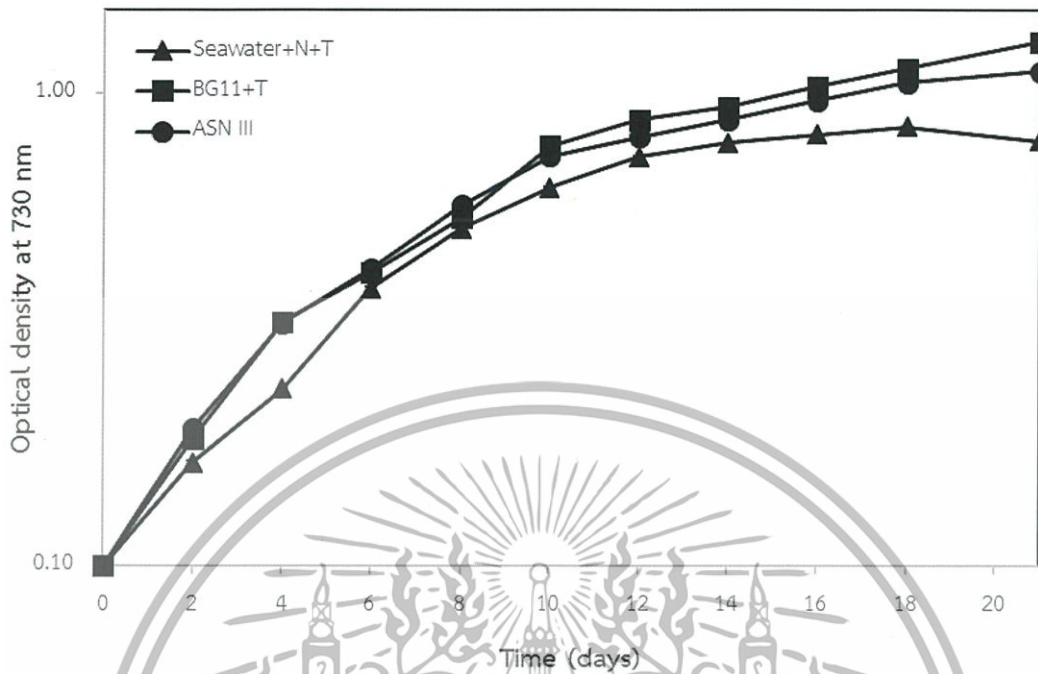
รูปที่ 4.16 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 จากการแปรผันความเข้มข้นของ Ni²⁺

4.15 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำทะเลมาใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน

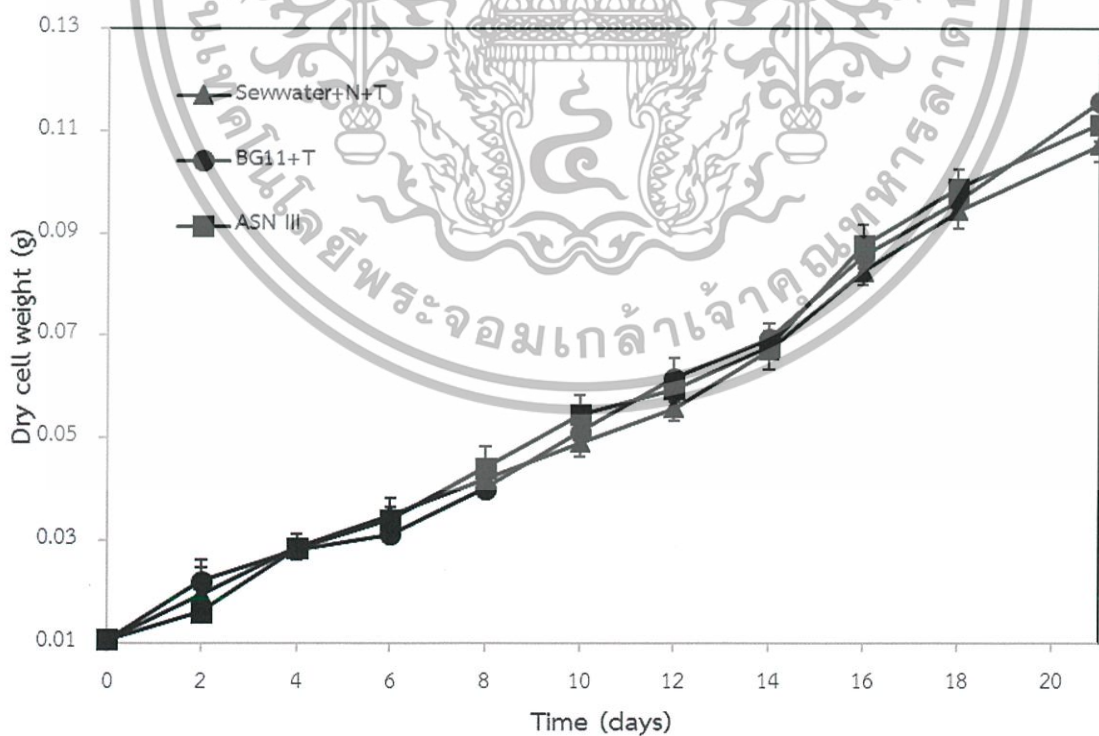
4.15.1 การศึกษาการเจริญเติบโตในไซยาโนแบคทีเรีย P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มาเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 17.6 มิลลิโมลาร์, อาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution และ อาหาร ASNIII โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 วัดการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ในขณะที่ไอโซเลท RMK-SH10 ทำการวัดการเจริญเติบโตจากการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท P-SH8.2.1 และไอโซเลท RMK-SH10 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารทั้ง 3 ชนิด รวมถึงน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.17 และ 4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

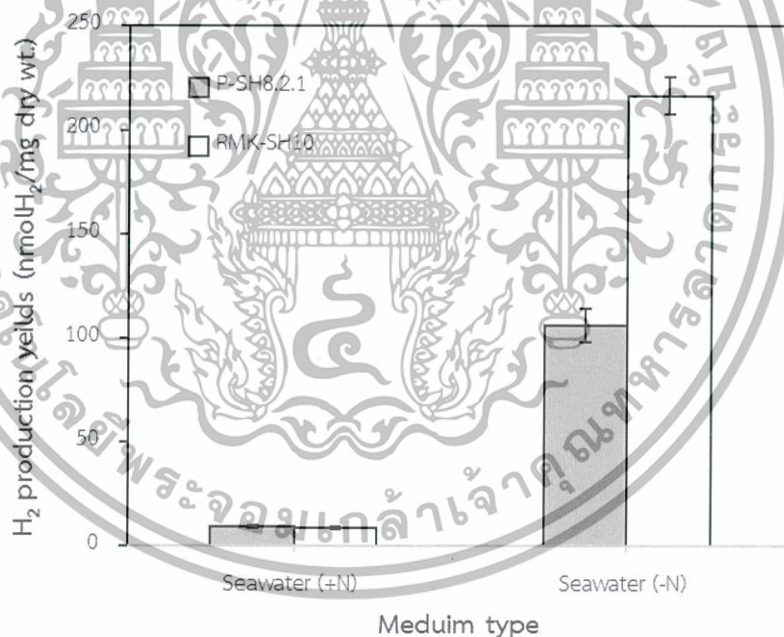


รูปที่ 4.18 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท RMK-SH10 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.15.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ และน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่ปราศจากไนโตรเจน บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิมปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ในอาหารเดิมลงในขวดแก้ว และนำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่าไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในอาหารน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่ปราศจากไนโตรเจน โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 106.061 ± 7.833 และ 216.662 ± 8.733 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.19)



รูปที่ 4.19 การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ และอาหารน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลอง สามารถเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลทในอาหารน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ ดังนั้น จึงสามารถใช้น้ำทะเล ซึ่งมีแร่ธาตุและสารอาหารมากมายที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย (Harrison and Berges, 2005) มาใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ นอกจากนี้ ยังสามารถนำไซยาโนแบคทีเรียทั้งไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มาผลิตไฮโดรเจนได้อีกด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากทะเลในประเทศไทย สามารถสรุปได้ดังนี้

1. จากการแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากน้ำทะเลของประเทศไทย สามารถแยกได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลท แบ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลท และสาหร่ายสีเขียวจำนวน 20 ไอโซเลท โดยจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบไซยาโนแบคทีเรีย 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายยาว ไม่แตกแขนง ไม่พบเซลล์พิเศษอย่างเซลล์เฮเทอโรซิสต์และเซลล์อะคินิท กลุ่มที่ 2 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้น เซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายลูกบิด กลุ่มที่ 3 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมหรือรี กลุ่มที่ 4 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมีรูปร่างกลม และกลุ่มที่ 5 มีลักษณะเป็นกลมแบนขนาดใหญ่ ส่วนสาหร่ายสีเขียวสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว และกลุ่มที่ 2 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

2. จากการศึกษานิตของไซยาโนแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าเป็นไซยาโนแบคทีเรียจีส *Geitlerinema* sp., *Phormidium* sp., *Leptolyngba* sp., *Pseudoanabeana* sp., และ *Syneccoccus* sp.

3. ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อเทียบกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นที่ศึกษา

4. ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อใช้เซลล์ที่มีอายุ 1 สัปดาห์

5. ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ภายหลังจากการปรับตัวให้อยู่ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด ที่พีเอช 8 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

6. ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์ โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 316.253 ± 17.369 และ 138.267 ± 8.442 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ

7. จากการศึกษากการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนเตรท แหล่งซัลเฟอร์ แหล่งคาร์บอน เหล็ก ไอออน และนิกเกิลไอออนในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนเตรทต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ASNIII ที่ปราศจากไนเตรท ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0-1.5 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของกลูโคส 1.89 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ในไอโซเลท P-SH8.2.1 และ 189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท RMK-SH10 ความเข้มข้นของ Fe^{3+} 4 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นของ Ni^{2+} 0.1 ไมโครโมลาร์ ในไอโซเลท P-SH8.2.1 และ 0 ไมโครโมลาร์ในไอโซเลท RMK-SH10

8. จากการศึกษาการความเป็นไปได้ในการนำน้ำทะเลมาใช้ในการเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 เพื่อผลิตไฮโดรเจน พบว่าไฮยาโนแบคทีเรีย P-SH8.2.1 และ RMK-SH10 สามารถเจริญเติบโตในน้ำทะเลที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ที่มีโซเดียมไนเตรท 17.6 มิลลิโมลาร์ และสามารถผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. สาขาวิทยาศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 122 – 155.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. พิมพ์ครั้งที่ 3. (ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 1) กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 774-785.
- Allahverdiyeva Y, Leino H, Saari L, Fewer DP, Shunmugam S, Sivonen K, Aro EM. (2010) Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. *Int J Hydrogen Energy* 35:1117-27
- Ananyev G, Carrieri D, Dismukes GC (2008) Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium "*Arthrospira maxima*". *Appl Environ Microbiol* 74:6102–6113
- Antal TK, Lindblad P (2005) Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J Appl Microbiol* 98:114–120
- Aoyama K, Uemura I, Miyake J, Asada Y (1997) Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J Ferment Bioeng* 83:17–20
- Asada Y, Miyake J (1999) Photobiological hydrogen production. *J Biosci Bioeng* 88:1–6
- Axelsson R, Lindblad P (2002) Transcriptional regulation of *Nostoc* hydrogenases: effects of oxygen, hydrogen, and nickel. *Appl Environ Microbiol* 68: 444–447
- Baebprasert W, Lindblad P, Incharoensakdi A (2010) Response of H₂ production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Int J Hydrog Energy* 35:6611–6616
- Daddy A, Mackerras AH, Smith GD (1995) The Effect of Nickel on Hydrogen Metabolism and Nitrogen Fixation in the Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J Gen Microbiol* 131:231-238.
- Datta M, Nikki G, Shah V (2000) Cyanobacterial hydrogen production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16:8-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gutekunst K, Hoffmann D, Lommer M, Egert M, Suzuki I, Schulz-Friedrich R, Appel J (2006) Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int J Hydrogen Energy* 31:1452–1459
- Harrison PJ, Berges JA (2005) Marine culture media. In: Andersen RA (ed) *Algal culturing techniques*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, pp21–33
- Hallenbeck PC (2012) Hydrogen production by cyanobacteria. *Microbial Technologies in advance biofuels production*. 212 p. ISBN 978-1-4614-1207-6.
- Kosaric, N and Lyng, RP, (1988) Microbial production of hydrogen. In : Rehm, HJ [Eds], *Biotechnology Vol. 6b (special microbial processes)*. VCH. pp. 101-134.
- Kumazawa S, Mitsui A (1981) Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by saltwater blue-green algae, *Oscillatoria* sp. Miami BG7. I. Enhancement through limiting the supply of nitrogen nutrients. *Int J Hydrog Energy* 6:339–348
- Kupper H *et al* (2008) Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation. *New Phytol* 179:784-798
- Lee YK, Shen H (2004) Basic culturing techniques. In: Richmond, A. [Eds], *Handbook of microalgal culture*. IS Press. p40-50
- Lindberg M (2003) Cyanobacterial hydrogen metabolism-uptake hydrogenase and hydrogen production by nitrogenase in filamentous cyanobacteria. Ph.D. Thesis of Uppsala University.
- Maneeruttanarungroj C, Lindblad P, Incharoensakdi A (2011) A newly isolated green algae, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 35:13193-13199
- Prabaharan D, Subramanian G, (1996) Oxygen-free hydrogen production by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 20041. *Bioresource Technol* 57:111-116
- Rasoul-Amini S, Ghasemi Y, Morowvat MH, Mohagheghzadeh A (2009) PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. *Food Chemistry* 116:129-136
- Rai AK, Abraham G (1995) Relationship of combined nitrogen sources to salt tolerance in freshwater cyanobacterium *Anabena doliolum*. *J Appl Bacteriol* 78:501–506

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol.* 1979:1-61
- Saha SK, Uma L, Subramanian G, (2003) Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. *FEMS Microbiol Ecol* 45:263-272
- Serebryakova LT, Sheremetieva M, Tsygankov AA (1998) Reversible hydrogenase activity of *Gloeocapsa alpicola* in continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* 166:89-94
- Serebryakova LT, Sheremetieva ME, Lindblad P (2000) H₂-uptake and evolution in the unicellular cyanobacterium *Chroococoidopsis thermalis* CALU 758. *Plant Physiol Biochem* 38:525-530
- Taikhao S, Junyapoon S, Incharoensakdi A, Phunpruch S (2013) Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *J Appt Phycol* 25:575-585
- Tamagnini P, Axelsson R, Lindberg P, Oxelfelt E, Wünschiers R and Lindblad P (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 66:1-20
- Tiwari A, and Pandey A (2012) Cyanobacterial hydrogen production -A step towards clean environment. *Int. J. Hydrogen Energy.* 37:139-150
- Triplett EW (2000) Prokaryotic nitrogen fixation : A model system for the analysis of a biological process. Norfolk: Horizon Scientific Press
- Troshina O, Serebryakova LT, Sheremetieva M, Lindblad P (2002) Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa atpicota* CALU743 during fermentation. *Int J Hydrog Energy* 27:1283-1289
- Yeager CM, Milliken CE, Bagwell CE, Staples L, Berseth PA and Sessions HT (2011) Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous Cyanobacteria *Int. J. Hydrogen Energy.* 36:7487-7499
- Yu J, Takahashi P (2007) Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green algae. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology.* A. Méndez-Vilas (Ed)
- <http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html>
- <http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php>
- <http://cronodon.com/BioTech/Cyanobacteria.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ASNIII (Seawater medium) (Rippka et al., 1979)

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร ASNIII

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	8.82	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	14.20	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	9.84	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	3.4	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	6.7	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	0.14	มิลลิโมลาร์
ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	1.2	ไมโครโมลาร์
วิตามิน B ₁₂ (cyanocobalamin)	4×10^{-9}	โมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	1	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (2กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
FeNH ₄ Citrate (0.30 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับพีเอชของอาหารเป็น 7.5 โดยการเติม 2 N NaOH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (Blue-green medium) (Rippka et al., 1979)

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดอะมีโนเอทเทนเตตระอะซิดิกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
$FeNH_4$ Citrate (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15

นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Sail Solution

ส่วนประกอบอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Sail Solution

อาหาร BG11 100 เท่า (ภาคผนวก ก)	10	มิลลิลิตร
*Stock A solution	100	มิลลิลิตร
*Stock B solution	100	มิลลิลิตร
Na ₂ CO ₃ (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K ₂ HPO ₄ (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
FeNH ₄ .Citrate (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	28.16	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับพีเอชของอาหารเป็น 7.6 โดยการเติม 2 N NaOH

*Stock A solution

ส่วนประกอบต่อลิตร

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	6.6	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	55	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	14.66	กรัม

*Stock A solution

ส่วนประกอบต่อลิตร

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	74.48	กรัม
--	-------	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani medium) (Bertani et al., 1951)

ส่วนประกอบอาหาร

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับปริมาตรโดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร LB ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้