

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจาก
การเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย

OPTIMIZATION OF HYDROGEN PRODUCTION FROM
BACTERIAL CO-CULTIVATION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMIZATION OF HYDROGEN PRODUCTION FROM BACTERIAL CO-CULTIVATION



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยง
ร่วมกันของแบคทีเรีย

ชื่อนักศึกษา นางสาว ชุติกาญจน์ สมสิน รหัสนักศึกษา 62050586
นางสาว วลัยพร พุดซ้อน รหัสนักศึกษา 62050648

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย	
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ชุตติกาญจน์ สมสิน	รหัสนักศึกษา 62050586
	นางสาว วลัยพร พุดซ้อน	รหัสนักศึกษา 62050648
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2565	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์	

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากการเผาไหม้ไฮโดรเจนให้พลังงานสูงและไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้หลายวิธี อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดในการผลิต เช่น มีค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงและประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตต่ำ การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียและการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย งานวิจัยนี้ ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ที่ได้จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้จากดินที่คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผลการทดลองพบว่า *Staphylococcus aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับไอโซเลต EJ1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ *Bacillus* sp. ดังนั้น จึงตั้งชื่อ EJ1 เป็น *Bacillus* sp. EJ1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 คือ บ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีอัตราส่วนของปริมาตรหัวเชื้อในหน่วยมิลลิลิตรของ *S. aureus* ต่อ *Bacillus* sp. EJ1 เป็น 4.5 ต่อ 0.5 และมีความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อทั้งสองที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3.520 ± 0.034 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.393 ± 0.004 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 253.447 ± 2.447 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 28.287 ± 0.273 ไม

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครโมไลโดรเจนต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 72 ชั่วโมงของการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ การผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สูงขึ้นกว่าการเพาะเลี้ยงเดี่ยวของ *S. aureus* ถึง 180 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน แบบทีเรีย การเพาะเลี้ยงร่วมกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Optimization of Hydrogen Production from Bacterial Co-cultivation
Students	Miss Chutikarn Somsin Student ID 62050586 Miss Walaiporn Pudsorn Student ID 62050648
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Applied Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Asst.Prof.Dr. Saranya Phunpruch

Abstract

Hydrogen (H₂) is a renewable energy that is gaining considerable attention since H₂ combustion provides high energy and produces no greenhouse gases. H₂ can be generated in several ways; however, there are still limitations, such as high production costs and poor producing efficiency. More attention has been paid to biohydrogen production by microorganisms, especially by bacteria and co-cultivation of bacteria. In this study, screening of H₂ producing bacteria from twelve strains obtained from the department of Biology, School of Science, KMITL and six bacterial strains isolated from soils at School of Science, KMITL, was investigated. The result showed that *Staphylococcus aureus* co-cultured with isolate EJ1 in LB gave the highest H₂ production. From 16S rDNA sequence analysis, nucleotide sequences of isolate EJ1 was similar to those of *Bacillus* sp. Therefore, EJ1 was called *Bacillus* sp. EJ1. The optimum conditions for H₂ production of *S. aureus* co-cultured with *Bacillus* sp. EJ1 were incubation in LB containing glycerol as a carbon source at a concentration of 100 mmolC-atom/L, inoculum volume ratio of *S. aureus* to *Bacillus* sp. EJ1 as 4.5 : 0.5 (v/v), and the cell density of both strains at OD₆₀₀ as 2.0. The highest H₂ production rate was 3.520 ± 0.034 mL/L/h and 0.393 ± 0.004 μmolH₂/mgDCW/h and the highest accumulative H₂ production was 253.447 ± 2.447 mL/L and 28.287 ± 0.273 μmolH₂/mgDCW at 72 h of anaerobic incubation. H₂ production by co-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cultivation of *S. aureus* and *Bacillus* sp. EJ1 under the optimal conditions was approximately 180% higher than that by single cultivation of *S. aureus*.

Keywords : Hydrogen production, Bacteria, Co-cultivation



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ ความกรุณาและการถ่ายทอดวิชาความรู้จาก รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ให้คำแนะนำและให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมทั้งตรวจแก้ไขงานวิจัยเล่มนี้ ทำให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความเมตตาและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการอบรมให้ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำด้านต่างๆ ตลอดเวลาของการศึกษา

ในสถาบันฯ

ขอขอบคุณพี่น้องวิทยุ ที่มีความตั้งใจในการช่วยให้เอกสารที่ใช้ในการทดลอง ทำให้เกิดผลสำเร็จในงานวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้ความช่วยเหลือปรึกษาในทุกเรื่อง

ประโยชน์และคุณค่าของงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่ บิดา มารดา ครูอาจารย์ ที่ได้สั่งสอนอบรม ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่เฝ้าเลี้ยงดู และให้ทุนทรัพย์ในการศึกษาเล่าเรียน รวมทั้งเป็นกำลังใจในการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่างๆ เสมอมา งานวิจัยเล่มนี้คงไม่สามารถสำเร็จได้ด้วยดี ถ้าไม่มีบุคคลที่เอื้อนามมานี้

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าหวังว่า โครงการพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับสถานะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงและพัฒนางานวิจัยด้านพลังงานทดแทนต่อไปในอนาคต

ชุติกานุจน์ สมสิน

วลัยพร พุดซ้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 พลังงานทดแทน.....	5
2.2 พลังงานไฮโดรเจน.....	5
2.3 การผลิตไฮโดรเจน.....	6
2.3.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล.....	7
2.3.1.1 กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ.....	7
2.3.1.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วน.....	8
2.3.1.3 กระบวนการร่วมระหว่างกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำกับออกซิเดชันบางส่วน.....	9
2.3.1.4. กระบวนการไพโรไลซิส.....	9
2.3.1.5 การรีฟอร์มมิงด้วยพลาสมา.....	10
2.3.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากพลังงานหมุนเวียน.....	11
2.3.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการแยกสลายน้ำ.....	11
2.3.2.1.1 การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า.....	11
2.3.2.1.2 การแยกสลายน้ำโดยใช้ความร้อน.....	11
2.3.2.1.3 การแยกสลายน้ำโดยใช้แสง.....	12
2.3.2.2 พลังงานชีวมวล.....	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2.1	กระบวนการทางความร้อนเคมี.....	12
2.3.2.2.2	กระบวนการทางชีวภาพ.....	12
2.4	จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน.....	13
2.4.1	จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟิกายคาร์ิโอต.....	13
2.4.2	จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟิโกโพรคาร์ิโอต.....	13
2.4.2.1	แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้และให้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์.....	14
2.4.2.2	แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ แต่ไม่ให้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์.....	14
2.5	การเพาะเลี้ยงร่วม.....	17
2.6	ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย.....	18
2.6.1	ปัจจัยทางกายภาพ.....	18
2.6.2	ปัจจัยทางเคมี.....	20
2.7	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	24
3.1	เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ.....	24
3.1.1	แบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ที่ได้จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.....	24
3.1.2	แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 6 ไอโซเลท.....	24
3.2	สารเคมี.....	24
3.2.1	อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	24
3.2.2	เคมีภัณฑ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ.....	25
3.2.3	เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม.....	25
3.2.4	เคมีภัณฑ์สำหรับย้อมสีแกรม.....	25
3.3	ก๊าซที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน.....	25
3.4	อุปกรณ์.....	25
3.5	วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	27
3.5.1	การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ในการทดลอง.....	27
3.5.1.1	การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.....	27
3.5.1.2	การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย.....	27
3.5.2	วิธีการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน.....	28

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 3.5.3 วิธีการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านก 28
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน	
สูงที่สุด.....	29
3.5.4.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB.....	29
3.5.4.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิด ในอาหารเลี้ยง	
เชื้อ LB.....	29
3.5.5 การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ	
แบคทีเรียที่คัดเลือก.....	30
3.5.5.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB,	
Basal และ M9.....	30
3.5.5.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยง	
เชื้อ LB, Basal และ M9.....	31
3.5.6 การคัดเลือกการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย.....	31
3.5.7 การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง	
ร่วมกัน.....	32
3.5.7.1 การคัดเลือกจำนวนของเซลล์แบคทีเรียตัวรอง.....	32
3.5.7.2 การคัดเลือกอัตราส่วนของปริมาตรหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ	
แบคทีเรีย.....	33
3.5.8 การคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต	
ไฮโดรเจนของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน.....	34
3.5.8.1 การคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน.....	34
3.5.8.2 การคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน.....	35
3.5.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการภาควิชา	
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	
และแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอม	
เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.....	35
3.5.10 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	
ของยีน 16S rDNA.....	36
3.5.10.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Whole-cell PCR.....	36
3.5.10.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	36
3.5.10.3 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์.....	37
3.5.10.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	37

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 3.5.11 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น 37 คำ
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	38
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการและแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน.....	38
4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร LB.....	43
4.2.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	43
4.2.2 ผลการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย.....	45
4.3 ผลการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ส่งเสริมการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย.....	50
4.3.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของ <i>S. aureus</i> ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9.....	50
4.3.2. ผลการผลิตไฮโดรเจนของ <i>S. aureus</i> ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9.....	51
4.4 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกัน.....	55
4.5 ผลการตรวจสอบชนิดของไอโซเลต EJ1 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.....	60
4.5.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต EJ1 ด้วยเทคนิค Whole-cell PCR.....	60
4.5.2 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต EJ1 ให้บริสุทธิ์.....	61
4.5.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1.....	61
4.6 ผลการศึกษาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>S. aureus</i>	65
4.7 ผลการศึกษาอัตราส่วนของปริมาตรหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> และ <i>Bacillus</i> sp. EJ1.....	70
4.8 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1.....	74
4.9 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1.....	79
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	85
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	85
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	87
เอกสารอ้างอิง.....	89
ภาคผนวก.....	98

ภาคผนวก ค.....	101
ภาคผนวก ง.....	102



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ค่าพลังงานความร้อนสูงสุดและต่ำสุดของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ.....	6
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ.....	28
3.2 ขั้นตอนและสภาวะการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR.....	34
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการ 12 ไอโซเลต.....	38
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 6 ไอโซเลต.....	39
4.3 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะการทวีคูณของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลต ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ LB.....	45
4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด.....	49
4.5 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะการทวีคูณของเชื้อ <i>S. aureus</i> ในอาหารเหลว LB Basal และ M9.....	51
4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด.....	55
4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> เป็นตัวหลัก เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , EJ1 และ EJ9.....	59
4.8 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต EJ1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นในธนาคารยีน.....	63
4.9 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรที่แตกต่างกัน.....	66
4.10 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> มาเพาะ เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 โดยปรับความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ค่า OD ₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ส่วน <i>Bacillus</i> sp. EJ1 เท่ากับ 0.1, 1.0, 2.0 และ 3.0.....	69
4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ 1 โดยมีสัดส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อ แบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกเป็น 4.99 : 0.01, 4.9 : 0.1, 4.5 : 0.5, 4 : 1, 3.33 : 1.67 และ 2.5 : 2.54.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด.....	73
4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ที่เพาะ เลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ 1 ในอาหาร LB ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส, กรดอะซิติก, กรดซิตริก และกลีเซอรอล ซึ่งแต่ ละแหล่งคาร์บอนที่เติมเข้าไปจะมีความเข้มข้นอยู่ที่ 100 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอม/ลิตร.....	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.14 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 เพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลว LB ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เติมเข้าไปคือ กรดอะซิติก และกลีเซอรอลโดยแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิโมลาร์..... 84
- 4.15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อในอาหาร LB ที่มีค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่างๆและ pH ของอาหารเหลวที่ 120 ซม. ภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกัน.....85



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนรูปแบบต่างๆ.....	7
4.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลต จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร.....	44
4.2 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต.....	46
4.3 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต.....	47
4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ของแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต.....	47
4.5 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต.....	48
4.6 การเจริญเติบโตของ <i>S. aureus</i> ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9 จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร.....	49
4.7 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ <i>S. aureus</i> ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9.....	53
4.8 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ <i>S. aureus</i> ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9.....	53
4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>S. aureus</i> ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9.....	54
4.10 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>S. aureus</i> ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9.....	54
4.11 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน.....	56
4.12 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน.....	57
4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียเพาะเลี้ยงร่วมกัน.....	57
4.14 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของแบคทีเรียเพาะเลี้ยงร่วมกัน.....	58
4.15 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1 จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....	60
4.16 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของไอโซเลต EJ1 จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....	61
4.17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1.....	62
4.18 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน.....	64
4.19 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ในแต่ละค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.20 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรต่างๆ.....	67
4.21 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ในแต่ละค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	67
4.22 การผลิตไฮโดรเจนของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ 1 ในแต่ละค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	68
4.23 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ที่อัตราส่วนต่างๆ.....	71
4.24 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ที่อัตราส่วนต่างๆ.....	71
4.25 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ที่อัตราส่วนต่างๆ.....	72
4.26 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ 1 ที่อัตราส่วนต่างๆ.....	72
4.27 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	75
4.28 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	76
4.29 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	76
4.30 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ 1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	77
4.31 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ.....	81
4.32 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ....	81
4.33 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ.....	82
4.34 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>S. aureus</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>Bacillus</i> sp. EJ 1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ.....	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบัน มีการใช้พลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลกันอย่างแพร่หลาย ทั้งการผลิตพลังงานไฟฟ้า ผลิตพลังงานความร้อน ใช้ในด้านการคมนาคมขนส่ง เกษตรกรรม และการผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสติก จากการพัฒนาด้านเศรษฐกิจและการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกอย่างต่อเนื่อง ทำให้ความต้องการพลังงานมากขึ้นตามไปด้วย แต่เนื่องจากพลังงานฟอสซิล ได้แก่ ถ่านหิน น้ำมัน และก๊าซธรรมชาติ เป็นพลังงานสิ้นเปลืองที่ใช้แล้วหมดไป โดยคิดเป็นแหล่งพลังงานประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของโลก ทำให้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลมีราคาสูงและขาดแคลน นอกจากนี้ การใช้พลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลยังปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซเรือนกระจกอื่นๆ (Greenhouse gases) ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากมาย ดังนี้ 1) ภาวะเรือนกระจก (Greenhouse effect) 2) การเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ (Climate change) เช่น อุณหภูมิโลกเพิ่มสูงขึ้น ภาวะแวดล้อมหรือภัยธรรมชาติรุนแรง การเพิ่มสูงขึ้นของระดับน้ำทะเล การทำลายระบบนิเวศ และ 3) มลพิษทางอากาศ (Toxic emissions) เช่น การปล่อยสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) PM 2.5 เขม่าดำ (Black carbon)ปรอท (Hg) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_x) สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile organic compounds; VOCs) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้เกิดผลกระทบต่อด้านสุขภาพและคุณภาพชีวิตของประชาชน (สืบพงศ์, 2554; Perera, 2017; Nunez, 2019) จากงานวิจัยของ Perera (2017) ได้รายงานว่า PM 2.5, PAHs และโอโซน (Ozone; O₃) มีความเกี่ยวข้องต่อการพัฒนาปอดและเด็ก ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลเสียระยะยาวต่อสุขภาพของเด็กได้ และมลพิษทางอากาศจะส่งผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพลดลง จากที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ต้องมีการค้นหาพลังงานแหล่งใหม่ มาทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลอย่างเร่งด่วน

พลังงานทดแทน (Renewable energy) หรือ พลังงานสะอาด (Clean energy) คือ พลังงานที่สร้างมาจากสิ่งที่ได้จากธรรมชาติ หรือมาจากกระบวนการที่สามารถเกิดขึ้นได้เรื่อยๆ จากทรัพยากรธรรมชาติที่มีไม่จำกัด เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ (Solar energy) พลังงานลม (Wind energy) พลังงานน้ำ (Water energy) พลังงานความร้อนใต้พิภพ (Geothermal energy) พลังงานชีวภาพ (Bioenergy) พลังงานนิวเคลียร์ (Nuclear energy) และพลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen)

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่ให้พลังงานสูง จึงถูกนำมาใช้ในการเผาไหม้และให้ความร้อน และใช้

ในการแปลงพลังงานเคมีให้เป็นพลังงานไฟฟ้าที่เรียกว่า เซลล์ไฟฟ้าเคมี พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทดแทนทางเลือกชนิดหนึ่ง ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำที่ไม่ว่ากรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีแหล่งผลิตแบบยั่งยืน และต้องอย่างองส่งเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาเก็บ

มีมากที่สุดบนโลก นอกจากนี้ ยังเป็นธาตุที่รวมอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน (HC) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ ไฮโดรเจนได้รับการยอมรับว่าจะเป็นแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงที่สำคัญอย่างมากในอนาคต จึงทำให้พลังงานไฮโดรเจนกลายเป็นที่นิยมของเทคโนโลยีที่จะเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงในอนาคต ในปัจจุบัน ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้หลายวิธีเช่น การสลายน้ำด้วยความร้อน กระบวนการเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง การรีฟอร์มด้วยพลาสมา การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า และการสังเคราะห์ด้วยแสง แต่ยังคงมีข้อจำกัดอยู่เช่นเดียวกัน คือ ความคงทนของอุปกรณ์หรือวัสดุในกระบวนการที่ต้องทำงานที่อุณหภูมิสูงและค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงและประสิทธิภาพของกระบวนการต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการให้ความสนใจต่อการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นการผลิตไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูงจากกระบวนการทางชีวภาพผ่านเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ (Microorganism) ซึ่งสารตั้งต้นหลักของกระบวนการ ได้แก่ น้ำ สารอินทรีย์ หรือชีวมวล จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต ได้แก่ สาหร่ายซึ่งสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง และแบคทีเรียจากกลไกการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพมีหลากหลายรูปแบบ เช่น Direct biophotolysis, Fermentation, Microbial electrolysis ข้อดีของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวล ได้แก่ การช่วยลดการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และลดปัญหาภาวะโลกร้อน ฯลฯ

ในบรรดาสสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย แบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากสามารถนำเอาทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ แต่เนื่องด้วยการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ซึ่งจะไปยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Takagi และคณะ, 2016) ในขณะที่การผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกันหลายชนิดสามารถลดการยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนนี้ได้ และการเพาะเลี้ยงร่วมกันยังมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน ลดระยะเวลาการปรับตัวของแบคทีเรียในระยะพัก (Lag phase) มีความยืดหยุ่นต่อความผันผวนของสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมเพิ่มความเสถียรของการผลิตไฮโดรเจน และเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด COD (Chemical oxygen demand) ในการบำบัดน้ำเสีย (Tao และคณะ, 2007; Pachapur และคณะ, 2015)

โครงการพิเศษนี้จึงสนใจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกัน นอกจากนี้ ยังศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงและพัฒนางานวิจัยด้านพลังงานทดแทนต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการและที่แยกได้จากดินในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน
- 2) เพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียร่วมกัน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 6 ไอโซเลต และเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากห้องปฏิบัติการจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *Acetobacter xylinum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* TISTR1248, *Escherichia coli* TISTR074, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* TISTR2374, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2370, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica* serovar Weltevreden, *Serratia marcescens* TISTR1354, *Staphylococcus aureus* TISTR746 และ *Vibrio parahaemolyticus* จากห้องปฏิบัติการ บนอาหารแข็ง LB และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด ในอาหารเหลว LB (Luria-Bertani broth) โดยการวัดการเจริญด้วยการวัดค่า OD₆₀₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิด ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขวด vial 12.5 มิลลิลิตร โดยวิธี Gas chromatography โดยทำการวัดค่าไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120
- 2) ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว LB, Basal broth และ M9 broth โดยการวัดการเจริญด้วยการวัดค่า OD₆₀₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจสอบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวชนิด LB, Basal broth และ M9 broth โดยวิธี Gas chromatography โดยทำการวัดค่าไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120
- 3) ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ทั้งแบบเพาะเลี้ยงเดี่ยวและแบบเพาะเลี้ยงร่วมกัน
- 4) ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ทั้งการเพาะเลี้ยงเดี่ยวและการเพาะเลี้ยงร่วมกัน
- 2) ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานทดแทน

การค้นหาและคิดค้นพลังงานทดแทนที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด สะอาด และปลอดภัยนั้นเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจกันอย่างแพร่หลายในหลายทศวรรษที่ผ่านมา จากการที่พลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้กันในปัจจุบันนั้นเป็นพลังงานสิ้นเปลือง จึงไม่สามารถใช้ได้เพียงพอนในอนาคต และการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจก อันนำไปสู่ภาวะโลกร้อน (Nunez, 2019) ซึ่งทำให้เกิดปัญหาสุขภาพต่อประชากรโลก ทั้งมนุษย์และสัตว์ต่างได้รับผลกระทบจากมลพิษทางอากาศ สภาวะภูมิอากาศที่รุนแรง และสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Perera, 2017) จากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกมาในปริมาณมหาศาล เริ่มตั้งแต่ยุคปฏิวัติอุตสาหกรรมเมื่อศตวรรษก่อนจนถึงยุคปัจจุบัน (Pirani, 2018)

พลังงานทดแทนหรือพลังงานทางเลือก (Alternative energy) เป็นพลังงานที่ได้จากแหล่งพลังงานอื่นที่ไม่ใช่เชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ และปิโตรเลียม ส่วนพลังงานหมุนเวียน (Renewable energy) คือ พลังงานสะอาดที่ได้จากแหล่งพลังงานที่ไม่มีวันหมดไป ซึ่งได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อผลิตเป็นพลังงานทางเลือกในปัจจุบันและอนาคต พลังงานหมุนเวียน ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ (Solar energy) พลังงานลม (Wind energy) พลังงานน้ำ (Water energy) พลังงานความร้อนใต้พิภพ (Geothermal energy) พลังงานชีวภาพ (Bioenergy) พลังงานนิวเคลียร์ (Nuclear energy) และพลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen and fuel cells) (Panwar และคณะ, 2011)

2.2 พลังงานไฮโดรเจน

พลังงานไฮโดรเจน (H_2) นับว่าเป็นพลังงานทางเลือกในอุดมคติ เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานสะอาด จากการที่ไม่ปล่อยมลพิษออกมาระหว่างการเผาไหม้ และไม่ก่อให้เกิดผลผลิตพลอยได้ที่เป็นพิษ (Hansel และ Lindblad, 1998) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนยังเป็นแหล่งพลังงานเดียวที่ปราศจากคาร์บอน (Carbon-free) ที่ให้พลังงานมากที่สุด เมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงอื่นๆ ดังตารางที่ 2.1 โดยให้พลังงานสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกรัม ซึ่งมากกว่าเชื้อเพลิงฟอสซิลถึง 2.75 เท่า (Kapdan และ Kargi, 2006) ก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่นำมาใช้ในการเผาไหม้และให้ความร้อน และใช้เป็นเครื่องมือในการเปลี่ยนแปลงพลังงานเคมีให้เป็นพลังงานไฟฟ้า หรือที่เรียกว่า เซลล์ไฟฟ้าเคมี เพื่อใช้ในการขับเคลื่อนยานยนต์และยานอวกาศ หรือผลิตกระแสไฟฟ้าแก่อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ต่างๆ (กระทรวงพลังงาน กรมพัฒนาพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ค่าพลังงานความร้อนสูงสุดและต่ำสุดของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ (Nikolaidis และ Poullikkas, 2017)

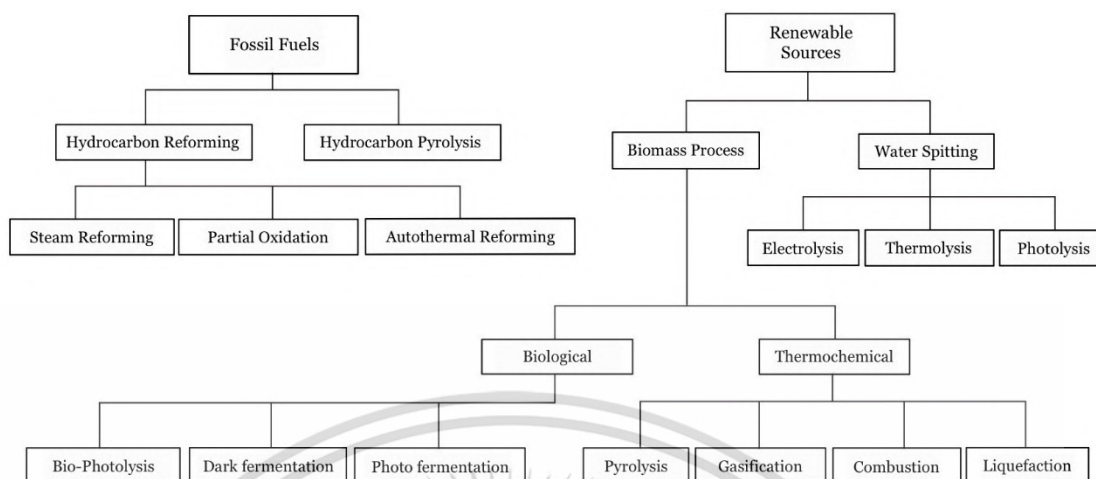
เชื้อเพลิง	สภาวะที่อุณหภูมิและความดันปกติ	ค่าความร้อนสูงสุด (เมกะจูลต่อกิโลกรัม)	ค่าความร้อนต่ำสุด (เมกะจูลต่อกิโลกรัม)
ไฮโดรเจน	ก๊าซ	141.9	119.9
มีเทน	ก๊าซ	55.5	50
อีเทน	ก๊าซ	51.9	47.8
แก๊สโซลีน	ของเหลว	47.5	44.5
ดีเซล	ของเหลว	44.8	42.5
เมทานอล	ของเหลว	20	18.1

ไฮโดรเจนอะตอมเป็นธาตุที่พบได้มากกว่าธาตุอื่นในจักรวาล แต่กลับพบเป็นอิสระบนโลกในปริมาณไม่มากนัก (Lubitz และ Tumas, 2007) เนื่องจากไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาตินั้นเกิดขึ้นค่อนข้างยาก การใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงยังคงมีปัญหาหลายประการ ได้แก่ พบก๊าซไฮโดรเจนอิสระในธรรมชาติในปริมาณน้อย ต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากขั้นตอนการผลิตและการทำให้ก๊าซไฮโดรเจนบริสุทธิ์นั้นยุ่งยากและซับซ้อน บรรพบุรุษที่ในการกักเก็บก๊าซไฮโดรเจนมีราคาสูงเพราะก๊าซไฮโดรเจนมีความหนาแน่นต่ำ จึงทำให้ต้องเก็บในลักษณะเดียวกันกับก๊าซหุงต้ม นอกจากนี้การบรรจุก๊าซไฮโดรเจนในลักษณะนี้จะมีความเสี่ยงต่อการระเบิดได้ง่าย จึงต้องทำการเก็บก๊าซไฮโดรเจนในบรรจุภัณฑ์ที่เป็นวัสดุชนิดโลหะไฮโดรด์ เนื่องจากสามารถดูดซับไฮโดรเจนได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ แต่การใช้บรรจุภัณฑ์ลักษณะนี้ก็จะทำให้ต้นทุนสูงตามไปด้วย (รัชนิกร, 2554; Kapdan และ Kargi, 2006)

2.3 การผลิตไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้หลักๆ 2 วิธี ตามการใช้วัตถุดิบในการผลิต ได้แก่ วิธีดั้งเดิมในการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน และการใช้เทคโนโลยีในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน (Nikolaidis และ Poullikkas, 2017) กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนรูปแบบต่างๆ จะแสดงในรูปที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนรูปแบบต่างๆ
(Nikolaidis และ Poullikkas, 2017)

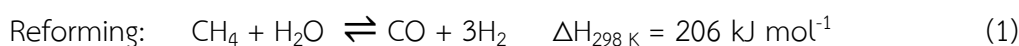
2.3.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตไฮโดรเจนแบบดั้งเดิมจากเชื้อเพลิงฟอสซิลมีอยู่ 2 รูปแบบหลัก ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิงสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon reforming) และกระบวนการไพโรไลซิส (Pyrolysis) โดยกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลจะทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลไฮโดรเจนที่อยู่ในรูปต่างๆ เช่น ก๊าซเซลีน แอมโมเนีย และเมทานอล ให้กลายเป็นก๊าซไฮโดรเจน

2.3.1.1 กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ

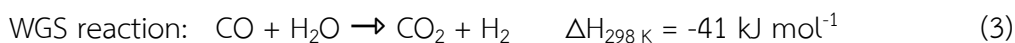
กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming) หรือเรียกว่า Steam Methane Reformation (SMR) เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติที่มีส่วนประกอบหลักเป็นมีเทน กระบวนการนี้มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของมีเทนด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 700-1,100 °C โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย (Catalytic steam reforming) ปฏิกิริยาเป็นปฏิกิริยาคูดความร้อน ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็นก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เรียกว่า ซินแก๊ส (Syngas; Synthesis gas) จากสมการเคมีที่ 1 และ 2



ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปฏิกิริยา Water-gas shift (WGS) ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาคายความร้อน จากสมการที่ 1 จะเห็นได้ว่ามีผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ร่วมด้วย จึงนำมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำอีกครั้ง เพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น (รัชนิกร, 2554; Nikolaidis และ Poullikas, 2017; Steinberg, 1999) ดังสมการเคมีที่ 3



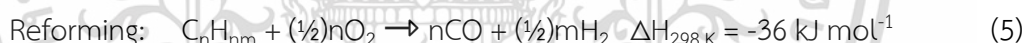
3. กระบวนการสร้างมีเทน (Methanation) เป็นกระบวนการทำให้ก๊าซไฮโดรเจนบริสุทธิ์มากขึ้น โดยก๊าซผสมจากขั้นตอนที่ 2 จะถูกกำจัด CO_2 ออกในขั้นตอนนี้ แล้วจะได้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจนเกือบถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Steinberg และ Cheng, 1989) ดังสมการเคมีที่ 4



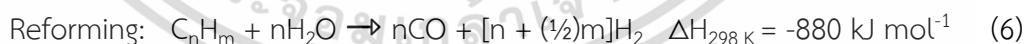
2.3.1.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วน

ปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วน (Partial oxidation; POX) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ความร้อนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการนี้มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

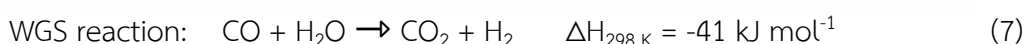
1. ปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบบางส่วน เป็นเทคนิคที่มีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย (Catalytic partial oxidation; CPOX) หรือบางครั้งเรียกว่า Gasification โดยสารตั้งต้นทั่วไปที่นิยมใช้มักเป็นสารประกอบอินทรีย์ เช่น มีเทน เอทานอล และแนฟทา เป็นต้น ปฏิกิริยานี้จะเกิดที่อุณหภูมิสูงกว่า 700°C หรืออยู่ที่ประมาณ 950°C โดยได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ดังสมการเคมีที่ 5



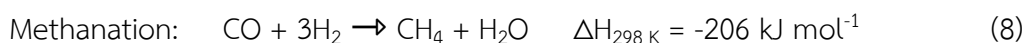
ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่มีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Thermal partial oxidation; TPOX) จะเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ $1,150\text{-}1,315^\circ\text{C}$ โดยจะใช้สารตั้งต้นเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น มีเทน น้ำมันดิบ และถ่านหิน (Steinberg และ Cheng, 1989) จะได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนเช่นกัน ดังสมการเคมีที่ 6



2. ปฏิกิริยา Water-gas shift (WGS) จะได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน ดังสมการเคมีที่ 7



3. กระบวนการสร้างมีเทน (Methanation) จะได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็นก๊าซมีเทน และน้ำ ดังสมการเคมีที่ 8



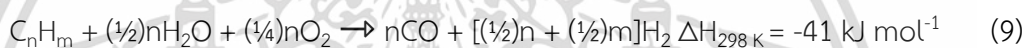
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยา Water-gas shift และ Methanation เรียกได้ว่าเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันสมบูรณ์ (Full combustion) ซึ่งตัวแปรที่ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาว่าจะเป็นส่วนบางส่วนหรือสมบูรณ์ก็คือ ปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่เข้าทำปฏิกิริยา

2.3.1.3 กระบวนการร่วมระหว่างกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำกับออกซิเดชัน

บางส่วน

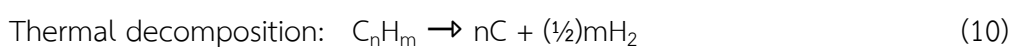
กระบวนการร่วมระหว่างกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำกับออกซิเดชันบางส่วน (Autothermal reforming, ATR) เป็นกระบวนการที่รวมข้อดีของ Steam reforming และ Partial oxidation เข้าไว้ด้วยกัน โดยจะใช้ปฏิกิริยาคายความร้อนจากกระบวนการ Catalytic partial oxidation เพื่อเพิ่มความร้อน และปฏิกิริยาคูดความร้อนจากกระบวนการ Steam reforming เพื่อเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยทั่วไป ไอน้ำ ออกซิเจน หรืออากาศที่ใส่เข้าไปในปฏิกิริยารีฟอร์มมิง จะทำให้เกิดปฏิกิริยารีฟอร์มมิงและออกซิเดชันในเวลาเดียวกัน (Chen และคณะ, 2008; Holladay และคณะ, 2009) ดังสมการเคมีที่ 9



กระบวนการ Autothermal reforming นี้มีข้อได้เปรียบสำคัญที่เหนือกว่า Steam reforming คือสามารถหยุดและเริ่มกระบวนการได้อย่างรวดเร็ว และผลิตไฮโดรเจนในปริมาณที่มากกว่า POX เพียงอย่างเดียว ซึ่งกระบวนการนี้อาจได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมก๊าซธรรมชาติ และปิโตรเลียมในอนาคต เนื่องจากองค์ประกอบของก๊าซนั้นติดต่อกับปฏิกิริยา Fischer-Tropsch synthesis หรือกระบวนการ Syngas และด้วยความกะทัดรัดของกระบวนการ ATR ต้นทุนต่ำ และมีศักยภาพในการเพิ่มการผลิตมากจนทำให้ต้นทุนต่ำลงได้ (Economies of scale) (Holladay และคณะ, 2019)

2.3.1.4 กระบวนการไพโรไลซิส

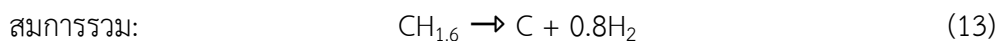
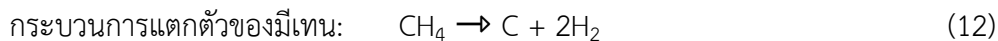
กระบวนการไพโรไลซิสของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon pyrolysis) เป็นกระบวนการที่มีแหล่งกำเนิดไฮโดรเจนเพียงแหล่งเดียวคือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยความร้อนโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Thermo-catalytic decomposition) ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหลวเบา โดยมีจุดเดือดระหว่าง 50-200 °C และได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็นก๊าซไฮโดรเจน ดังสมการเคมีที่ 10



แต่ในกรณีที่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนหนักมีจุดเดือดสูงกว่า 350 °C จะมีกระบวนการผลิตไฮโดรเจน 2 ขั้นตอนคือ Hydrogasification และกระบวนการแตกตัวของมีเทน (Muradov, 1993)

เอกสารนี้ [ดัดแปลงเนื้อหา](#) [ฉบับที่ 11-13](#) สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ $\text{Hydrogasification: } \text{C}_n\text{H}_m + 1.2\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4$ เอกสารทุกครั้งที่มีการนำ (11)



กระบวนการไพโรไลซิสต้องการพลังงานในการผลิตไฮโดรเจนเพียง 37.6 kJ/mol ซึ่งน้อยกว่ากระบวนการ Steam methane reforming ที่ใช้พลังงานกว่า 63.3 kJ/mol (Muradov, 2001) และกระบวนการนี้ยังไม่มีขั้นตอนการกำจัด CO₂ และ Water-gas shift ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงถึง 25-30% (Muradov, 1993) แต่กระบวนการนี้มีข้อเสียในกระบวนการแยกไฮโดรเจนคือ ความดันย่อยของไฮโดรเจนในปฏิกิริยาค่ำ และปัญหาความทนทานของเมมเบรนที่ต้องทนต่ออุณหภูมิสูงในสมดุลการลดการปล่อยก๊าซคาร์บอน (De-carbonization) (Falco และคณะ, 2011)

2.3.1.5 การรีฟอร์มด้วยพลาสมา

กระบวนการรีฟอร์มด้วยพลาสมา (Plasma reforming) มีปฏิกิริยารีฟอร์มมิงโดยรวมเหมือนกับปฏิกิริยารีฟอร์มมิงต่างๆ ไป โดยพลังงานและอนุภาคลิอิสระที่ใช้ในปฏิกิริยารีฟอร์มมิงมาจากพลาสมาที่ได้จากกระแสไฟฟ้าและความร้อน (Holladay และคณะ, 2009) เมื่อน้ำหรือไอน้ำฉีดเข้าไปพร้อมกับเชื้อเพลิงจะเกิดอนุมูลไฮโดรเจน (H) ไฮดรอกไซด์ (OH) และออกซิเจน (O) ได้เป็นสถานะสำหรับการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชัน (Sekiguchi และคณะ, 2003)

กระบวนการ Plasma reforming มีสองประเภทหลัก คือ แบบใช้ความร้อน (Thermal plasma reforming) และแบบไม่ใช้ความร้อน (Non-thermal reforming) โดย Thermal plasma reforming จะมีการใช้กระแสไฟฟ้าสูงมากกว่า 1 kW ทำให้อิเล็กทรอนิกส์และอนุภาคที่เป็นกลางมีอุณหภูมิสูงมาก (ประมาณ 4,700-9,700 °C) จึงต้องมีการใช้พลังงานในการลดอุณหภูมิของอิเล็กโทรดลง เพื่อป้องกันไม่ให้โลหะระเหิดเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไป ส่วน Non-thermal reforming มีเพียงอิเล็กตรอนที่มีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น โดยมีอุณหภูมิสูงมากกว่า 4,700 °C เนื่องจากอิเล็กตรอนถูกกระตุ้นเพียงอย่างเดียว จึงทำให้ต้องการพลังงานไม่กี่ร้อยวัตต์เท่านั้น ซึ่งกระบวนการ Non-thermal reforming มี 4 รูปแบบ ได้แก่ Gliding arc plasma, Dielectric barrier discharge (DBD), Microwave plasma, และ Corona discharge (Bromberg และคณะ, 1999; Paulmier และคณะ, 2005; Bromberg และคณะ, 1997; Hammer และคณะ, 2004; Biniwale และคณะ, 2004)

กระบวนการ Plasma reforming สามารถเอาชนะข้อจำกัดหลายประการของเทคนิคทั่วไป เช่น ต้นทุน การเสื่อมสภาพของตัวเร่งปฏิกิริยา ขนาดและน้ำหนักที่จำกัด ความเฉื่อยในการตอบสนอง และข้อจำกัดในการผลิตไฮโดรเจนจากไฮโดรคาร์บอนหนัก โดยกระบวนการ Plasma reforming ถูกพัฒนาเพื่อสนับสนุนกระบวนการ Partial oxidation, Autothermal reforming และ Steam reforming โดยที่ เครื่องปฏิกรณ์ส่วนใหญ่เป็นแบบ Partial oxidation และ Autothermal reforming แต่กระบวนการนี้ก็มีข้อเสียอยู่เช่นกัน ได้แก่ ความต้องการกระแสไฟฟ้า และการสึกกร่อนของอิเล็กโทรดที่ความดันสูง (Biniwale และคณะ, 2004; Paulmier และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ซึ่งเป็นการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากพลังงานหมุนเวียน

ถึงแม้ว่าการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลจะเป็นกระบวนการหลักในขณะนี้ แต่ความต้องการในการผลิตไฮโดรเจนจากพลังงานหมุนเวียนยังคงเพิ่มสูงขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ เนื่องจากพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจก และปัญหาสิ่งแวดล้อมมากมาย มหาศาล จึงทำให้มีการใช้เทคโนโลยีพลังงานหมุนเวียนเพิ่มขึ้นในอนาคต และคาดการณ์ว่าในระยะยาวนั้นอาจใช้เป็นพลังงานนี้แทนเทคโนโลยีดั้งเดิม (Nikolaidis และ Poullikas, 2017)

2.3.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการแยกสลายน้ำ

น้ำเป็นหนึ่งในแหล่งพลังงานที่มีมากที่สุดบนโลก และสามารถนำมาผลิตไฮโดรเจนได้ด้วยกระบวนการแยกสลายน้ำ (Water-splitting) จึงนับว่าเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่สะอาดที่สุดของมวลมนุษยชาติ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า การแยกสลายน้ำโดยใช้ความร้อน และการแยกสลายน้ำโดยใช้แสง (Nikolaidis และ Poullikas, 2017)

2.3.2.1.1 การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า

การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า (Electrolysis) เป็นวิธีการแยกสลายน้ำที่ง่ายที่สุด โดยใช้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านอิเล็กโทรด 2 ขั้ว เพื่อแยกน้ำให้ได้ไฮโดรเจน และออกซิเจน เทคโนโลยีอิเล็กโทรไลซิสที่นิยมกันมากที่สุดคือ การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าแบบแอลคาไลน์ (Alkaline electrolyzer) โดยเป็นระบบที่มีการพัฒนา และมีต้นทุนต่ำมากที่สุด แต่เนื่องจากมีประสิทธิภาพต่ำที่สุด จึงมีต้นทุนพลังงานไฟฟ้ามากที่สุด และยังมีกระบวนการแยกสลายน้ำด้วยการใช้เมมเบรนแลกเปลี่ยนโปรตอน (Proton exchange membrane electrolysis; PEM) และการแยกสลายน้ำด้วยเซลล์อิเล็กโทรไลต์ชนิดออกไซด์แข็ง (Solid oxide electrolysis cells; SOEC) โดย PEM จะมีประสิทธิภาพมากกว่าแบบแอลคาไลน์ และไม่มีปัญหาที่กร้อนเหมือน SOEC แต่มีต้นทุนสูงกว่าแบบแอลคาไลน์ และ SOEC เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพทางไฟฟ้ามากที่สุด แต่ได้รับการพัฒนาน้อยที่สุด (Holladay และคณะ, 2009)

2.3.2.1.2 การแยกสลายน้ำโดยใช้ความร้อน

การแยกสลายน้ำโดยใช้ความร้อน (Thermolysis หรือ Thermochemical water splitting) เป็นกระบวนการแยกน้ำโดยใช้ความร้อนสูงจนได้ไฮโดรเจน และออกซิเจนออกมา ถึงว่าจะเป็นการกระบวนการที่ง่าย แต่กระบวนการแยกสลายน้ำนั้นจะไม่มีประสิทธิภาพเลยจนกระทั่งได้ความร้อนที่สูงมากๆ ซึ่งโดยทั่วไปอุณหภูมิจะอยู่ที่ 2,500 °C เพื่อให้พลังงานอิสระของกิบส์กลายเป็นศูนย์ และสามารถแยกไฮโดรเจนออกมาได้ (Funk, 2001) แต่ด้วยอุณหภูมิที่สูงขนาดนี้ทำให้วัสดุที่มีความเสถียร และทนต่ออุณหภูมิสูงนั้นหาได้ยาก (Norbeck และคณะ, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.1.3 การแยกสลายน้ำโดยใช้แสง

การแยกสลายน้ำโดยใช้แสง (Photoelectrolysis) เป็นกระบวนการใช้แสงอาทิตย์ในการแยกสลายน้ำได้เป็นไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยใช้วัสดุเซมิคอนดักเตอร์ที่คล้ายคลึงกันกับที่มีการใช้งานในเซลล์สุริยะ (Solar cell หรือ Photovoltaic) เทคโนโลยีนี้สามารถแยกได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไฟฟ้าแสงอาทิตย์ (Photovoltaic cell) เซลล์ไฟฟ้าเคมีแสงอาทิตย์ (Photoelectrochemical cell) กระบวนการเชิงชีวภาพของจุลินทรีย์โดยใช้แสง (Photobiological system) และระบบการย่อยสลายโดยใช้แสง (Photodegradation system) (รัชนิกร, 2554)

2.3.2.2 พลังงานชีวมวล

พลังงานชีวมวลเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่ได้จากวัสดุจากพืชและสัตว์ เช่น กากพืช เศษไม้ หญ้า ของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมและมูลสัตว์ (Demirbaş, 2001) พลังงานชีวมวลที่ได้จากพืชที่เป็นสารอินทรีย์ ซึ่งจะเก็บพลังงานแสงอาทิตย์โดยใช้กระบวนการสังเคราะห์แสง (McKendry, 2002) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมาจากการใช้พลังงานในกระบวนการสังเคราะห์แสง มีปริมาณเท่าๆ กับที่ถูกดูดซึมโดยพืชนั้นขณะยังมีชีวิต (Flamos และคณะ, 2011) พลังงานชีวมวลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่ พลังงานจากกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) และพลังงานจากกระบวนการทางความร้อนเคมี (Thermochemical process)

2.3.2.2.1 กระบวนการทางความร้อนเคมี

กระบวนการทางความร้อนเคมี (Thermochemical process) เป็นเทคนิคที่สามารถเปลี่ยนสารชีวมวลให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนได้ (Liu และคณะ, 2014; Wang และคณะ, 2015) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเป็นขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพสำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่มีการปล่อยก๊าซเรือนกระจก ซึ่งจำเป็นมากสำหรับการพัฒนาที่ยั่งยืน (Fremaux และคณะ, 2015) กระบวนการทางความร้อนเคมีเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Pyrolysis และกระบวนการ Gasification ซึ่งกระบวนการทั้งสองมีการผลิตก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ท่ามกลางก๊าซอื่นๆ ซึ่งสามารถนำมาผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มเติมได้ โดยผ่านกระบวนการ Steam reforming และ Water-gas shift (Ni และคณะ, 2006)

2.3.2.2.2 กระบวนการทางชีวภาพ

กระบวนการทางชีวภาพ (Biological process) โดยส่วนใหญ่จะดำเนินการที่ความดัน และอุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงใช้พลังงานน้อยกว่า นอกจากนี้ยังใช้วัตถุดิบเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่ไม่มีวันหมด และยังสามารถใช้ของเหลือทางการเกษตร และอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นวัตถุดิบได้อีกด้วย

(Das, 2001)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีวภาพมีกระบวนการหลักๆ ได้แก่ กระบวนการไบโอโฟโตไลซิสทางตรงและทางอ้อม (Direct and Indirect bio-photolysis) กระบวนการหมักโดยไม่ใช้แสง (Dark fermentation) และกระบวนการหมักโดยใช้แสง (Photo-fermentation) โดยวัตถุดิบสำหรับการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพสำหรับกระบวนการโฟโตไลซิสคือน้ำ ไฮโดรเจนจะถูกผลิตโดยแบคทีเรียและสาหร่ายบางชนิด จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสหรือไนโตรจีเนส และการสร้างสารชีวมวลจากกระบวนการหมัก โดยคาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนรูปเป็นกรดอินทรีย์แล้วถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ (Kapdan และคณะ, 2006; Holladay, 2009)

2.4 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน

2.4.1 จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟิกยูคาริโอต

จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟิกยูคาริโอต (Phototrophic Eukaryote) ได้แก่ สาหร่าย สาหร่ายมีโครงสร้างและการจัดเรียงเซลล์อย่างง่ายและไม่ซับซ้อน อาจประกอบด้วยเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ ไม่มีเนื้อเยื่อในการทำหน้าที่อย่างจำเพาะ และไม่มีท่อลำเลียงราก ลำต้น และใบอย่างแท้จริง สาหร่ายเซลล์เดี่ยวนับว่าเป็นแพลงก์ตอนพืชกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดในกลุ่มแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด และสาหร่ายยังสามารถสร้างอาหารได้เองด้วยการสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง ซึ่งในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสง พบว่าเป็นสาหร่ายประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ (วิทวัส, 2553)

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายนั้นได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ โฟโตออโตโทรฟ (Photoautotroph) และโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photoheterotroph) (Asimov, 1968) โดยจะได้ไฮโดรเจนก็ต่อเมื่อเกิดการปรับตัวของสาหร่ายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนระหว่างนั้นเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) เร่งปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) ไปทำการรีดิวซ์โปรตอน (H^+) ให้เป็นก๊าซไฮโดรเจน แต่ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสนั้นเกิดขึ้นเพียงชั่วคราวเท่านั้น (อาจเกิดไม่กี่วินาทีจนถึงหลายนาาที) เพราะปฏิกิริยาออกซิเดชันกับน้ำในสภาวะที่มีแสง (Light-dependent oxidation) จะทำให้เกิดการสร้างออกซิเจน ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอย่างรุนแรง (Ghirardi และคณะ, 2000; Melis และ Happe, 2001)

2.4.2 จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟิกโพรคาริโอต

จุลินทรีย์กลุ่มโฟโตโทรฟิกโพรคาริโอต (Phototrophic Prokaryote) หรือกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (Photosynthetic bacteria) มีทั้งแบบที่สามารถสังเคราะห์แสงแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจนหรือไม่ก็ได้ โดยสามารถแบ่งได้จากชนิดของคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และยังแบ่งได้จากตัวให้อิเล็กตรอนในระบบการสังเคราะห์แสง (Imhoff, 2008) ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้และให้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์

แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้และให้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic photosynthetic bacteria; OPB) นี้ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae) เป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวที่สามารถสังเคราะห์แสงแล้ว ทำให้น้ำแตกตัวได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจนและโปรตอน โดยไซยาโนแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนการสร้างอิเล็กตรอนจากน้ำให้กลายเป็นการผลิตไฮโดรเจนแทนได้ภายใต้สภาวะจำเพาะ ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจน (N_2) ในอากาศให้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) และผลิตไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้อีกด้วย โดยกระบวนการผลิตไฮโดรเจนดังกล่าวจะถูกเร่งด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) (Allahverdiyeva และคณะ, 2010)

ไซยาโนแบคทีเรียมักพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และสามารถอยู่รอดได้แม้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง (Allahverdiyeva และคณะ, 2014) และยังมีรูปแบบการใช้ชีวิตหลายแบบ บางสปีชีส์อาจเป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) หรืออาจสร้างเส้นสายและโคโลนี หรืออาจอยู่ร่วมกัน (Symbiosis) กับสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอตอื่น (Bergman และคณะ, 1992)

2.4.2.2 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ แต่ไม่ให้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์

แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ แต่ไม่ให้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Anoxygenic photosynthetic bacteria; APB) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์แสงได้แต่ไม่สร้างออกซิเจนโดยใช้ตัวให้อิเล็กตรอน (Electron donor) ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์หลากหลายชนิด และยังมีคุณลักษณะที่น่าสนใจหลายประการ ประกอบด้วย ความสามารถในการเจริญแบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic growth) ความต้องการพลังงานต่ำ มีกระบวนการเมตาบอลิซึมหลากหลายรูปแบบ ต้นทุนการบำรุงรักษาและการเจริญต่ำ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อมได้หลายอย่าง อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย การนำ APB ไปประยุกต์ใช้งานนั้นยังได้รับความสนใจน้อยกว่ามาก แม้ว่าจะมีการศึกษาวิจัยชีวิตหลายๆ วิจัยก็นั้นได้เน้นย้ำและแสดงให้เห็นถึงความไม่ยั่งยืนของพลังงานชีวภาพจากสาหร่าย (Stephenson และคณะ, 2010; Batan และคณะ, 2010; Clarens และคณะ, 2010) และความเสี่ยงจากการเลี้ยงสาหร่ายหลายชนิดที่อาจเกิดการสร้างสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanotoxin) (Corbel และคณะ, 2014; George และคณะ, 2020)

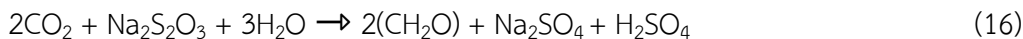
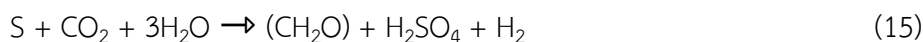
แบคทีเรียกลุ่ม APB สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

1) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มสะสมกำมะถัน

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มสะสมกำมะถัน (Purple sulfur bacteria; PSB) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ 1. *Chromatiaceae* ที่สามารถสร้างกำมะถันเก็บสะสมไว้ในเซลล์ และ 2. *Ectothiorhodospiraceae* ที่สามารถสร้างกำมะถันสะสมไว้นอกเซลล์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการขงเงินเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยู่ที่เห็นประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียกลุ่ม PSB สามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์ ซัลไฟด์ และไทโอซัลเฟตเป็นตัวให้อิเล็กตรอน เพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารในเซลล์ได้ (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2549) ดังสมการเคมีที่ 14-16



แบคทีเรียกลุ่ม PSB มีรงควัตถุคือแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll; BChl) เช่น BChl *a/b* และแคโรทีนอยด์ (Frigaard, 2016) ส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีการเจริญแบบโฟโตออโตโทรฟ แต่ *Chromatiaceae* สามารถเจริญได้ในทั้งแบบแบบโฟโตออโตโทรฟ แบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ เคโมออโตโทรฟ (Chemoautotroph) และเคโมเฮเทอโรโทรฟ (Chemoheterotroph) (Imhoff, 2008) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์แสงได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ดังนั้นจะพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ใต้น้ำนิ่ง หรือบ่อน้ำพุร้อนที่มีกำมะถัน

2) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (Purple non-sulfur bacteria; PNSB) มีทั้งหมด 6 สกุล ดังนี้ *Rhodospirillum*, *Rhodopila*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodomicrobium* และ *Rhodocyclus* โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างกำมะถันได้ เนื่องจากใช้ไฮโดรเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน เพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารในเซลล์ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถทนต่อกำมะถันได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ที่มากเกินไปก็สามารถเป็นพิษต่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ด้วยเช่นกัน

แบคทีเรียกลุ่ม PNSB มีรงควัตถุแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ เช่น BChl *a*, *b* และแคโรทีนอยด์ ได้แก่ Spirilloxanthin, Spheroidene, Lycopene และ Rhodopsin (Frigaard, 2016; Madigan และ Jung, 2009) และมีเมตาบอลิซึมที่ต่ำกว่าแบคทีเรียกลุ่ม PSB เนื่องจากสามารถเจริญได้ทั้งแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ และโฟโตออโตโทรฟ และ PNSB จะสามารถทนต่อสภาพที่มีออกซิเจน จึงสามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะแบบเฮเทอโรโทรฟที่มีอากาศ และไร้แสงได้

แบคทีเรียกลุ่ม PNSB สามารถพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีสารอินทรีย์และแสงสว่างส่องถึง แหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจนแต่มีแสงสว่างส่องถึงเล็กน้อย พบได้น้อยมากในแหล่งน้ำจืดที่มีกำมะถัน และบางชนิดก็พบได้ในแหล่งน้ำที่มีกำมะถันสูง นอกจากนี้ยังสามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ใต้ดิน และแหล่งน้ำสกปรกที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง เช่น บ่อบำบัดน้ำเสีย (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2549) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวกลุ่มสะสมกำมะถัน

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวกลุ่มสะสมกำมะถัน (Green Sulfur Bacteria; GSB) ได้แก่ *Chlorobium tepidum* และ *Chlorobium vibrioforme* ซึ่งอยู่ในไฟลัม Chlorobi เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในสภาพไร้อากาศแบบโพลีโตออโตโทรฟ (Strictly anaerobic photoautotroph) โดยใช้สารอนินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Jagannathan และ Golbeck, 2009) ซึ่งจะทำการรีดิวซ์สารประกอบซัลเฟอร์ เช่น ซัลไฟด์ และไทโอซัลเฟต (Imhoff, 2008) แล้วได้กำมะถันสะสมไว้นอกเซลล์ แบคทีเรียกลุ่ม GSB มีรงควัตถุแบคทีเรียโอคลอโรฟิลล์ เช่น BChl *c*, *d* และ *e* อยู่ในคลอโรโซม (Chlorosome) (Frigaard, 2016) และแคโรทีนอยด์ เช่น Chlorobactene, Gamma-carotene isorenieratene (Takaishi, 1999) แบคทีเรียกลุ่ม GSB สามารถพบได้ในแหล่งน้ำที่มีความเค็มมาก (Hypersaline water) และสามารถพบได้ในทะเลสาบน้ำเค็ม ตะกอนน้ำเค็ม ทะเลสาบน้ำจืด และในตะกอนทะเล (Nicholson และคณะ, 1987)

4) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (Green non-sulfur bacteria; GNSB)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียวกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (Green non-sulfur bacteria; GNSB) เป็นแบคทีเรียในไฟลัม Chloroflexota เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีเซลล์เป็นเส้นสายหรือไตรโคม (Filamentous anoxygenic phototrophic bacteria) ซึ่งมีทั้งหมด 3 ตระกูล (Family) ที่ประกอบด้วย *Chloroflexaceae*, *Oscillochloridaceae* และ *Roseiflexaceae* (Hanada, 2014) แบคทีเรียกลุ่ม *Chloroflexaceae* ส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตแบบโพลีโตเฮเทอโรโทรฟ ในสภาวะที่มีอากาศ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม *Oscillochloridaceae* จะเจริญเติบโตแบบโพลีโกลีโทออโตโทรฟ (Photolithoautotroph) และแบบโพลีโกลีโทเฮเทอโรโทรฟ (Photolithoheterotroph) ในสภาวะไร้อากาศ และแบคทีเรียกลุ่ม *Roseiflexaceae* จะมีการเจริญเติบโตแบบเฟคัลเททีฟโพลีโกลีโทโทรฟ (Facultative phototroph) (Imhoff, 2008; Hanada, 2014) แบคทีเรียกลุ่ม GNSB มีรงควัตถุแบคทีเรียโอคลอโรฟิลล์ เช่น BChl *a* หรือ BChl *a* และ *c/d* (Hanada, 2014) และมีแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกันหลายชนิด โดยจะขึ้นอยู่กับจีโนม เช่น Carotene, β -Carotene, OH- γ -Caroteneglucoside ester แบคทีเรียกลุ่ม GNSB สามารถพบได้ทั้งในน้ำทะเลและน้ำจืด ที่มีอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic) และบางชนิดสามารถพบได้ในบ่อน้ำพุร้อน (George, 2020)

5) แอซิโดแบคทีเรีย

แอซิโดแบคทีเรีย (Acidobacteria) ประกอบด้วย 3 ตระกูล ได้แก่ *Acidobacteriaceae*, *Holophagaceae* และ *Acanthopleuribacteraceae* ส่วนใหญ่จะมีการเจริญเติบโตแบบเคโมออแกโนโทรฟ (Chemoorganotroph) แต่บางชนิดก็สามารถเจริญแบบโพลีโตเฮเทอโรโทรฟ โดยแอซิโดแบคทีเรียจะมีการใช้น้ำตาลและสารประกอบอินทรีย์ เช่น อะซิเตท ($C_2H_3O_2$; Acetate), ซักซิเนต

$(\text{CH}_2)_2(\text{CO}_2\text{H})_2$; Succinate) และโพรพิโอเนต ($\text{Na}(\text{C}_2\text{H}_5\text{COO})$; Propionate) เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อใช้ในการเจริญ แอซิโตแบคทีเรียมีรงควัตถุแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ เช่น BChl *c*, BChl *aP*, Chl *aPD* และ Zn-BChl *a'P* และอาจมีรงควัตถุแคโรทีนอยด์ เช่น Echinenone, Canthaxanthin, Lycopene, γ และ β -Larotene (Garcia Costas และคณะ, 2012) แอซิโตแบคทีเรียจะเจริญในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศ (Aerobic) และมีอากาศเล็กน้อย (Microaerobic) สามารถพบได้ในบ่อน้ำพุร้อน ดินที่มีโลหะปนเปื้อน และในตะกอนน้ำทะเล (Thrash และ Coates, 2010; Tank และ Bryant, 2015)

6) เฮลิโอแบคทีเรีย

เฮลิโอแบคทีเรีย (Heliobacteria) ถูกจัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes และในตระกูล Heliobacteriaceae มีลักษณะการเจริญแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟที่ต้องการแสงสว่างในการเจริญเติบโต และจะขึ้นอยู่กับสารประกอบอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนด้วย (Asao และ Madigan, 2010) โดยจะใช้ซัลเฟตเป็นตัวให้อิเล็กตรอน เฮลิโอแบคทีเรียรงควัตถุดังนี้ BChl *g* (Imhoff, 2008) และแคโรทีนอยด์ ได้แก่ 4,4'-Diaponeurosporene, OH-Diapneurosporene glucoside esters เฮลิโอแบคทีเรียสามารถพบได้ในดินในสวนและดินจากการเกษตร และมีแค่ไม่กี่สปีชีส์เท่านั้นที่สามารถอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำ (Asao และ Madigan, 2010)

2.5 การเพาะเลี้ยงร่วม

การเพาะเลี้ยงร่วม (Co-culture) ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ด้วยกันหลากหลายสปีชีส์ โดยมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน ทำให้สามารถอยู่ร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Chang และคณะ, 2008) และจากความพยายามในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกัน พบว่ามีข้อดีมากกว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหลายประการ และเมื่อเทียบกันแล้วการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดเดียวนั้นจะให้ปริมาณและผลผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำกว่า จึงมีประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำ แต่การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกันจะมีผลส่งเสริมซึ่งกันและกัน จึงทำให้มีผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่า ส่งผลให้ใช้เวลาในการบ่มน้อย แต่ได้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า (Bao และคณะ, 2012; Patel และคณะ, 2014; Kao และคณะ, 2014) และยังทำให้กระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีความเสถียร มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบผสม และก้าวข้ามข้อจำกัดต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว (Zeidan และคณะ, 2010) โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกันจะสามารถลดระยะเวลาบ่มลงเหลือประมาณ 2 วัน จาก 4 วัน ซึ่งทำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น และลดต้นทุนการผลิตไฮโดรเจนโดยรวมตลอดทั้งปีได้ (Patel และคณะ, 2010; Vatsala และคณะ, 2008) การเลือกใช้หรือคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในการ

เอกสารนี้เพาะเลี้ยงร่วมเพื่อให้เกิดกระบวนการทำงานที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น การไฮโดรไลซิสสารตั้งต้น การใช้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารตั้งต้นพร้อมกัน และการแลกเปลี่ยนสารเมแทบอลิต์ ทำให้สามารถลดระยะเวลาบ่ม เพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน (Pachapur และคณะ, 2015)

ในบรรดาสีมีชีวิตทั้งหลายแบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสามารถนำเอาทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ แต่เนื่องด้วยการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียจะทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้นั้น จะไปยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Takagi และคณะ, 2016) ในขณะที่การผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกันสามารถลดการยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนนี้ได้ และการเพาะเลี้ยงร่วมกันยังมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน ลดระยะเวลาการปรับตัวของแบคทีเรียในระยะพัก (Lag phase) มีความยืดหยุ่นต่อความผันผวนของสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมเพิ่มความเสถียรของการผลิตไฮโดรเจน และเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด COD (Chemical Oxygen Demand) ในการบำบัดน้ำเสีย (Tao และคณะ, 2007; Pachapur และคณะ, 2015) Miyake และคณะ (1984) ได้รายงานว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Clostridium butyricum* และ *Rhodobacter sphaeroides* ให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงมาก จากการที่กลูโคสถูกใช้โดยแบคทีเรียที่หมักแบบไม่ใช้แสง (Dark-fermentative bacteria) แล้วได้ผลิตแก๊สที่เป็นกรดอินทรีย์ ซึ่งจะถูกใช้โดยแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (Photosynthetic bacteria) แล้วได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์

2.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย

2.6.1 ปัจจัยทางกายภาพ

1) แสง

ในการศึกษาสภาวะในการเจริญและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีกระบวนการหมัก 2 รูปแบบ คือ กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark-fermentation) และ กระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photo-fermentation) กระบวนการหมักแบบใช้แสงเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น แบคทีเรียสีม่วง (Purple bacteria) โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะประกอบด้วยระบบสังเคราะห์แสงเดี่ยวและไม่สร้างออกซิเจน ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายและพืชชั้นสูง แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะผลิตไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไนโตรเจนสกายไตสภาวะที่ใช้แสงและสารประกอบอินทรีย์หรือชีวมวลภายใต้สภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้กรดอินทรีย์อย่างง่ายเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังเฟอร์รีดอกซินโดยพลังงานในรูปแบบ ATP ซึ่งอิเล็กตรอน 1 ตัวจะต้องการพลังงาน 2 ATP จากนั้นเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเพื่อสร้างไฮโดรเจน (รัชนิกร, 2555)

กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง สามารถใช้จุลินทรีย์แบบเพาะเลี้ยงเดี่ยวและกลุ่มจุลินทรีย์มาผลิตไฮโดรเจน ข้อดีของการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว คือ มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน แต่ยังมีข้อจำกัดอยู่ โดยจำเป็นที่จะต้องรักษาสภาวะปลอดเชื้อระหว่างการผลิตไฮโดรเจน โดยแบคทีเรียพวก

Clostridium และ *Enterobacter* นิยมนำมาใช้ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง ส่วนของการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตไฮโดรเจนนั้นไม่จำเป็นต้องควบคุมให้อยู่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่สูงกว่า แต่ในกลุ่มจุลินทรีย์นั้นอาจมีจุลินทรีย์ที่ผลิตมีเทนปนอยู่ ซึ่งทำให้สามารถนำไฮโดรเจนไปใช้ในการผลิตมีเทนได้ จึงมีการกำจัดจุลินทรีย์ที่ได้ก่อนนำมาเป็นหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจน โดยวิธีที่ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเกิดได้ดีที่สุด คือ วิธีการหมักแบบไม่ใช้แสงในสภาวะไร้อากาศ โดยไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นระหว่างการสลายตัวของสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ เมื่อสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียวสำหรับการเผาผลาญพลังงาน กระบวนการนี้จึงเรียกว่ากระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (ณहतัย, 2562)

2) อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นสามารถเพิ่มความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนในการผลิตไฮโดรเจนในระหว่างการผลิตไฮโดรเจนหมัก แต่อุณหภูมิในระดับที่สูงขึ้นมากอาจลดลงตามระดับที่เพิ่มขึ้นอุณหภูมิส่งผลต่อกิจกรรมแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนและอัตราการผลิตไฮโดรเจน (Nath และคณะ, 2006) ปฏิกริยาการหมักแบบไม่ใช้แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ที่อุณหภูมิต่างกัน Mesophilic 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส Thermophilic 40 ถึง 65 องศาเซลเซียส Extreme-thermophilic 65 ถึง 80 องศาเซลเซียส และ Hyperthermophilic มากกว่า 80 องศาเซลเซียส (Levin และคณะ, 2004) แต่ในปัจจุบันกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงส่วนใหญ่จะทำที่อุณหภูมิ 35 ถึง 55 องศาเซลเซียส การผลิตไฮโดรเจนในสภาวะ Extreme-thermophilic สามารถให้ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าและอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะ Mesophilic และ Thermophilic กระบวนการหมักไฮโดรเจนแบบไม่ใช้ออกซิเจนแบบ Extreme-thermophilic สามารถให้ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าและอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าการหมักไฮโดรเจนแบบ Mesophilic (Nath และคณะ, 2006) ที่สภาวะ Extreme-thermophilic เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 1 โมล เป็นสารตั้งต้นจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล แต่ในทางปฏิบัติการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 4 โมลต่อ 1 โมลกลูโคสไม่สามารถเกิดได้จริงเนื่องจากกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นชีวมวลของจุลินทรีย์ (ณहतัย, 2562)

3) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ระดับ pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละตัวทำงานเฉพาะในช่วง pH ที่เฉพาะเจาะจงและมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH ที่เหมาะสม (Lay และคณะ, 1997) pH เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน (Craven และคณะ, 1988) โดยมีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากขยะมูลฝอย พบว่าการควบคุม pH มีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงของ *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* และ *Thermotoga elfii* และใช้ซูโครสและกลูโคสภายใต้สภาวะการหมักที่ 70°C pH ยังคงอยู่ที่ 7 และ 7.4

ตลอดการทดลอง พบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ pH 7 (Schröder และคณะ, 1994)

2.6.2 ปัจจัยทางเคมี

1) แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญและการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนที่อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์โบไฮเดรต โดยแบคทีเรียสามารถแบ่งชนิดได้ตามแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ได้ ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มออร์กาโนโทรฟ (Organotrophs) หรือเฮเทอโรโทรฟ (Heterotrophs) จะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารอินทรีย์ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มลิโธโทรฟ (Lithotrophs) หรือออโตโทรฟ (Autotrophs) จะใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (Kim และ Gadd, 2008)

หนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนอย่างยั่งยืนคือการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งประโยชน์จากกระบวนการผลิตที่ยั่งยืน ได้แก่ ประสิทธิภาพในการผลิตสูง ความคุ้มค่าของต้นทุน และลดการเกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม โดยแบคทีเรียในกระบวนการหมักแบบใช้แสง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกัมมะถัน (PNSB) จะมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น อัตราการเจริญ และอัตราการผลิตไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนอย่างมาก โดย PNSB สามารถปรับตัวให้เข้ากับแหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย ตั้งแต่โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ไปจนถึงกรดอินทรีย์สายสั้นๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดบิวทิริก และกรดมาลิก สารประกอบอะโรมาติก และแอลกอฮอล์ (Akhlaghi และ Najafpour-Darzi, 2020) Kim และคณะ (2006) ได้รายงานว่าการผลิตไฮโดรเจนด้วย PNSB โดยใช้น้ำตาลอย่างง่าย เช่น กลูโคส และซูโครส มีประสิทธิภาพต่ำกว่ากรดอินทรีย์ เช่น อะซีเตท แลคเตท และมาเลต ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว PNSB มักจะใช้กรดอินทรีย์ได้ดีกว่าน้ำตาลบริสุทธิ์ (Ghosh และคณะ, 2017)

การผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง เช่น *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. และ *Clostridium* sp. ก็มีสารตั้งต้นเป็นปัจจัยสำคัญเช่นเดียวกัน โดยจะสามารถผลิตไฮโดรเจนจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ เช่น น้ำตาลอย่างง่าย (กลูโคส, ซูโครส และแลคโตส) ของเสียที่มีแป้ง หรือเซลลูโลส ของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร และน้ำเสีย (Akhlaghi และ Najafpour-Darzi, 2020) Eker และคณะ (2017) ได้รายงานเกี่ยวกับอิทธิพลของความเข้มข้นเริ่มต้นของสารตั้งต้นที่แตกต่างกันต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้กลูโคสที่สกัดจากเศษกระดาษเหลือทิ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเป็นสารตั้งต้น พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 18.9 กรัม/ลิตร มีผลทำให้ผลผลิตไฮโดรเจนลดลง เนื่องจากเกิดการสร้างฟูร์ฟูรัล (Furfurals) ในระหว่างการผลิตไฮโดรไลซ์เศษกระดาษด้วยกรด และสร้างกรดไขมันที่ระเหยง่าย (Volatile fatty acids; VFAs)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจน คือ สารประกอบที่มีไนโตรเจน โดยแหล่งไนโตรเจนมีทั้งสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และสารอนินทรีย์ เช่น แกลิโนไนโตรเจน ไนเตรต และแอมโมเนีย (Phanitsara, 2020) ส่วนไนโตรเจนในรูปแก๊สเป็นแหล่งไนโตรเจนของกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Nitrogen-fixing bacteria) แบคทีเรียกลุ่มเคโมลิโธโทรฟ (Chemolithotrophs) บางชนิดสามารถใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งพลังงาน โดยใช้เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ ในขณะที่ไนเตรตจะใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกลุ่มแบคทีเรียดีไนตริฟายอิง (Denitrifying bacteria) (Kim และ Gadd, 2008) โดยชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนนั้นมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญ (Akhlaghi และ Najafpour-Darzi, 2020)

Liu และคณะ (2015) ได้ทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนต่างๆ เช่น กลูตาเมต แอมโมเนียม คลอไรด์ ยูเรีย บีฟเอกซ์แทรกซ์ (Beef extract) และเปปไทน์ ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของ *Rhodospseudomonas* โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นอะซิเตต พบว่าไม่มีการผลิตไฮโดรเจนในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนีย คลอไรด์ และยูเรีย โดยแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุด คือ บีฟเอกซ์แทรกซ์ ในทางกลับกัน แหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด คือ กลูตาเมต แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผลของการยับยั้งโดย NH_4^+ อิสระจากกิจกรรมของ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) ทำให้การผลิตไฮโดรเจนถูกยับยั้งด้วยกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 20 โมล/ลบ.ม.

3) แหล่งซัลเฟอร์ (Sulfur source)

ซัลเฟตนับว่าเป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่ถูกใช้มากที่สุด โดยมีแหล่งซัลเฟอร์อื่นๆ ที่ใช้ได้ ได้แก่ สารประกอบซัลเฟอร์อินทรีย์ ซัลไฟด์ ธาตุกำมะถัน และไฮโอซัลเฟต โดยซัลไฟด์และซัลเฟอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในแบคทีเรียกลุ่มเคโมลิโธโทรฟ ส่วนซัลเฟตและธาตุกำมะถันจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และถูกรีดิวซ์เป็นซัลไฟด์ด้วยแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (Sulfidogenic bacteria) (Kim และ Gadd, 2008)

4) แหล่งอิเล็กตรอน (Electron source)

แหล่งอิเล็กตรอนนั้นมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมถึงแบคทีเรีย เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนได้ เรียกว่า ลิโธโทรฟ ส่วนแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนได้ เรียกว่า ออร์กาโนโทรฟ (Kim และ Gadd, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) แหล่งออกซิเจน

ออกซิเจนในเซลล์ส่วนใหญ่มาจากสารประกอบอินทรีย์ น้ำ หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โมเลกุลออกซิเจน (O_2) มักไม่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพเท่าใดนัก แบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้ O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ แต่บางชนิดก็ไม่สามารถเจริญได้เลยหากมี O_2 อยู่ โดยสามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อ O_2 ได้ดังนี้ แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น (Obligate aerobic bacteria หรือ obligate aerobes) แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไร้อากาศเท่านั้น (Obligate anaerobic bacteria หรือ strict anaerobes) แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (Facultative anaerobic bacteria หรือ Facultative anaerobes) แบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (Microaerobic bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ แต่ทนอากาศได้ (Aerotolerant) (Kim และ Gadd, 2008)

6) ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญ (Growth factor)

ออร์กาโนโทรฟบางชนิด เช่น *Escherichia coli* สามารถโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายที่มีน้ำตาลกลูโคสและเกลือแร่ ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิด เช่น แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารอื่นเพิ่มเติม เช่น วิตามิน กรดอะมิโน และเบสของกรดนิวคลีอิกหลายชนิด เนื่องจากแบคทีเรียจำพวกนี้ไม่สามารถสังเคราะห์ส่วนประกอบบางอย่างภายในเซลล์ได้จากแค่เพียงน้ำตาลกลูโคสและเกลือแร่ได้ จึงต้องมีการเติมสารที่จำเป็นลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ซึ่งสารประกอบพวกนี้เรียกว่า ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญ (Growth factor) โดยความต้องการของปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญในแต่ละสิ่งมีชีวิตจะแตกต่างกันออกไป ซึ่งโดยทั่วไปแล้ววิตามินนั้นนับว่าเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญมากที่สุด (Kim และ Gadd, 2008)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wang และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) สำหรับการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าการเลี้ยง *Enterococcus gallinarum* G1 แบบเดี่ยวให้ผลผลิตของไฮโดรเจนอยู่ที่ $2.38 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ cellulose}$ ในขณะที่การเลี้ยงร่วมกันของ *E. gallinarum* G1 และ *Ethanoigenens harbinense* B49 ให้ผลผลิตของไฮโดรเจนอยู่ที่ $2.97 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ cellulose}$ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้อย่าง *E. gallinarum* G1 และแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากแซคคาไรด์ *E. harbinense* B49 มีศักยภาพที่จะเปลี่ยนสารชีวมวลเช่นเซลลูโลสให้กลายเป็นพลังงานไฮโดรเจนได้

Liu และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากเซลลูโลส โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Clostridium thermocellum* JN4 และ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GD17 พบว่าการเพาะเลี้ยง *C. thermocellum* JN4 ให้ผลผลิตของไฮโดรเจนอยู่ที่ $0.8 \text{ mol H}_2 (\text{mol glucose})^{-1}$ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *T. thermosaccharolyticum* GD17 มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า โดยที่สามารถให้ผลผลิตไฮโดรเจนได้ถึง $1.8 \text{ mol H}_2 (\text{mol glucose})^{-1}$ เนื่องจากการเพาะเลี้ยง *C. thermocellum* JN4 แบบเดี่ยวจะได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักสุดท้ายของปฏิกิริยา ซึ่งในกระบวนการหมักแลคเตทนั้นจะไม่มีการสร้างไฮโดรเจนอีก แต่การเพาะเลี้ยงร่วมกับ *T. thermosaccharolyticum* GD17 จะได้ผลิตภัณฑ์หลักสุดท้ายของปฏิกิริยาเป็นบิวทิเรต ซึ่ง *T. thermosaccharolyticum* GD17 มีปฏิกิริยาการหมักบิวทิเรต (Butyrate fermentation pathway) โดยเป็นปฏิกิริยาที่สามารถสร้างไฮโดรเจนได้

Seppala และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก โดยการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวและแบบเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Clostridium butyricum* และ *Escherichia coli* พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของ *C. butyricum* และ *E. coli* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 2.09 และ $1.45 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงร่วมกันสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เพียง $1.65 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ ถึงแม้ว่าการผลิตไฮโดรเจนของ *C. butyricum* แบบเพาะเลี้ยงเดี่ยวจะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า แต่การเพาะเลี้ยงร่วมกันนั้นสามารถย่อยสลายกลูโคสได้มากกว่า จึงได้ไฮโดรเจนทั้งหมดที่มากกว่าการเพาะเลี้ยง *C. butyricum* แบบเดี่ยว

Mazumder และคณะ (2020) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากลิกโนเซลลูโลสในของเสียทางการเกษตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงของ *Staphylococcus epidermidis* B-6 พบว่า *S. epidermidis* B-6 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 1.6 โมลไฮโดรเจน/โมลไซโลส โดยมีความเข้มข้นของไซโลสอยู่ที่ 5-10 กรัม/ลิตร และ 30 ลิตร/กิโลกรัมฟางข้าว โดยมีความเข้มข้นของฟางข้าวอยู่ที่ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยพบว่าที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 แหล่งไนโตรเจนคือสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และแหล่งคาร์บอนคือแลคโตส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไฮโดรเจน โดยได้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1.6 โมลไฮโดรเจน/โมลไซโลส 1.55 โมลไฮโดรเจน/โมลไซโลส และ 305 มิลลิตรไฮโดรเจน/กรัม ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

3.1.1 แบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ที่ได้จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.1.1 *Acetobacter xylinum*

3.1.1.2 *Bacillus cereus*

3.1.1.3 *Bacillus subtilis* TISTR1248

3.1.1.4 *Escherichia coli* TISTR074

3.1.1.5 *Listeria monocytogenes*

3.1.1.6 *Micrococcus luteus* TISTR2374

3.1.1.7 *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2370

3.1.1.8 *Proteus vulgaris*

3.1.1.9 *Salmonella enterica* serovar Weltevreden

3.1.1.10 *Serratia marcescens* TISTR1354

3.1.1.11 *Staphylococcus aureus* TISTR746

3.1.1.12 *Vibrio parahaemolyticus*

3.1.2 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 6 ไอโซเลต

3.1.2.1 ไอโซเลต EJ1

3.1.2.2 ไอโซเลต EJ3

3.1.2.3 ไอโซเลต EJ4

3.1.2.4 ไอโซเลต EJ6

3.1.2.5 ไอโซเลต EJ7

3.1.2.6 ไอโซเลต EJ9

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหาร LB (Lessard, 2013) (ภาคผนวก ก)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

3.2.1.2 อาหาร M9 (Elbing และ Brent, 2020) (ภาคผนวก ก)
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นที่ มิม่เห็นแต่แบบเป็นนัยนี้ และต้องย่ อึงองเงงใจ ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.3 อาหาร Basal (Naresh และคณะ, 2019) (ภาคผนวก ก)

3.2.1.4 น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)

3.2.1.5 น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

3.2.1.6 กรดอะซีติก ($C_2H_4O_2$)

3.2.1.7 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7$)

3.2.1.8 กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$)

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

3.2.2.1 บัฟเฟอร์สำหรับการย่อย (SV lysis buffer)

3.2.2.2 สารละลายล้างคอลัมน์ (Column Wash Solution)

3.2.2.3 น้ำปราศจากนิวคลีเอส (Nuclease free water)

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

3.2.3.1 ดิวอกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotidetriphosphate, dNTPs)

3.2.3.2 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase)

3.2.3.3 อะกาโรส (Agarose)

3.2.3.4 เจลสตาร์ (Gelstar)

3.2.3.5 บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer) (ภาคผนวก ข)

3.2.3.6 สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking Dye)

3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับย้อมสีแกรม

3.2.4.1 สีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet)

3.2.4.2 สีย้อมซาฟรานิน (Safranin)

3.2.4.3 สารละลายไอโอดีน (Iodine)

3.2.4.4 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาร์กอน

3.3 ก๊าซที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน

3.3.1 อาร์กอน 99 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.3.2 ไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.4 อุปกรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

3.4.1 กระบอกตวง (Measuring cylinder) (Kartell, Italy)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)
- 3.4.3 กล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายรูปได้ (Camera Microscope) (Euromex microscopes, Holland)
- 3.4.4 กระดาษกรอง (Whatman, Glass microfiber filter)
- 3.4.5 ขวดบรรจุ (Vial) พร้อมฝาปิด
- 3.4.6 เข็มเย็บเยื่อปลายกลม (Loop)
- 3.4.7 เข็มฉีดยา (Syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)
- 3.4.8 เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hotplate magnetic stirrer) (Vision Scientific VS-130SH, Korea)
- 3.4.9 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)
- 3.4.10 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph)
- 3.4.11 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Lab-Therm LT-X Incubator Shaker, Switzerland)
- 3.4.12 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Scale) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.4.13 เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (Stomacher)
- 3.4.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z383K, Germany)
- 3.4.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาตรน้อยชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Microcentrifuge) (Labnet International Inc, Spectrafuge 24D, USA)
- 3.4.16 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries Inc Vortex-Genie 2, USA)
- 3.4.17 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) (Biometra)
- 3.4.18 เครื่องแยกวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Electrophoresis system) (Pharmacia Biotech GNA100, Sweden)
- 3.4.19 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
- 3.4.20 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.4.21 จานเพาะเชื้อ (Plate) (Pyrex, USA)
- 3.4.22 ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation) (Syngene, MDI 1019, Japan)
- 3.4.23 ช้อนตักสาร (Spatula)

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 3.4.24 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner) นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ 3.4.25 เตาอบไมโครเวฟ (Microwave) (Sharp, Thailand) เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.26 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)
- 3.4.27 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) (International Scientific Supply Co., LTD. HS123, Thailand)
- 3.4.28 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.4.29 โถดูดความชื้น (Desiccator) (Nikko, Japan)
- 3.4.30 ถาดพลาสติก
- 3.4.31 ทิปดูดสาร (Tip)
- 3.4.32 ไมโครปิเปต (Micropipette) (Labnet, USA)
- 3.4.33 สไลด์ (Slide)
- 3.4.34 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดลอง

3.5.1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยนำดินปริมาณ 100 กรัม มาทำการตีปนกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเจือจางที่ 10^{-6} , 10^{-7} และ 10^{-8} แล้วทำการ Spread plate ความเจือจางละ 3 เพลท บนอาหารแข็ง LB บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ Streak plate บนอาหารแข็ง LB และบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเชื้อแบคทีเรีย 12 ชนิด จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยการถ่ายเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ด้วยวิธีการ Streak plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น จึงทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB เชื้อละ 2 เพลท และนำไปบ่มจานเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 วิธีการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

ทำการเปิดตัวอย่างที่ได้มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ขวด Vial ที่มีปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแล้วนำไปทำการไล่อากาศในขวด Vial โดยใช้เข็มเจาะเข้าทางด้านบนของจุกยาง เพื่อฉีดก๊าซอาร์กอนเข้า และใช้อีกเข็มหนึ่งเจาะจุกยางเพื่อให้เป็นทางออกของอากาศ ฟันก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที จึงนำไปป้อนในเครื่องเย้าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น จึงใช้เข็ม (Syringe) ดูดอากาศบริเวณส่วนบนของขวด (Head space) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatograph) โดยมีสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีดังแสดงในตารางที่ 3.1 ซึ่งการทดลองนี้จะใช้ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน

ตารางที่ 3.3 สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector; GC-TCD)

พารามิเตอร์	สถานะในการเดินระบบ
Column	Packed SS column 2 m x 4 mm OD x 3 mm I.D. p/w Molecular sieve 5°A 60/80 mesh
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature program	Injector temperature : 100 °C Column temperature : 50 °C Detector temperature : 100 °C
Carrier gas	Argon flow rate 20 mL/min (99.999% purity) (Praxair Korea, Co., Ltd.)

3.5.3 วิธีการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียมาทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C (Glass Microfiber filter) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักให้คงที่แล้ว จึงนำกระดาษกรองที่มีเซลล์ไปอบในตู้อบลมร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้ง จากนั้นนำกระดาษกรองมาวางในโถดูดความชื้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งดังสมการต่อไปนี้

$$\begin{array}{ccc} \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = & \text{น้ำหนักกระดาศกรองที่มีเซลล์} - & \text{น้ำหนักกระดาศกรอง} \\ (\text{มิลลิกรัม}) & (\text{มิลลิกรัม}) & (\text{มิลลิกรัม}) \end{array}$$

3.5.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด

3.5.4.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

ทำการเชื้อโคลนนี้เดี่ยวจากงานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูบเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติก 250 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำเซลล์แขวนลอยมาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอน (Supernatant) ทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ (Cell pellet) แล้วจึงทำการ Resuspend เซลล์ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากันที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด Microcentrifuge tube ทุก 2 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้น จึงเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อแต่ละตัวจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละชั่วโมงมาวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD₆₀₀ โดยนำตัวอย่างมาวัดการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.5.4.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

ทำการเชื้อโคลนนี้เดี่ยวจากงานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูบเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติก 250 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์แล้ว จึงทำการ Resuspend เซลล์ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากันที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการเก็บเซลล์ตามวิธีข้างต้นมา

เอกสารนี้ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากันที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 จากนั้นจึงทำการวัดปริมาณไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 ในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 5 ซ้ำ

3.5.5 การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียที่คัดเลือก

3.5.5.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB, Basal และ M9

ทำการเชื้อโคลนนี้เดี่ยวจากจานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกปัดเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB, Basal และ M9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติก 250 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB, Basal และ M9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ แล้วจึงทำการ Resuspend เซลล์ ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด Microcentrifuge tube ทุก 2 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้น จึงเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อแต่ละตัวจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละชั่วโมงมาวัดการเจริญด้วยการวัดค่า OD₆₀₀ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.5.5.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB, Basal และ M9

ทำการเชื้อโคลนนี้เดี่ยวจากจานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกปัดเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB, Basal และ M9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติก 250 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 6000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB, Basal และ M9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ แล้วจึงทำการ Resuspend เซลล์ ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้น จึงนำพลาสติกไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเซลล์ตามวิธีข้างต้นมาทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับที่

ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 และวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 ในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 5 ซ้ำ

3.5.6 การคัดเลือกการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย

ทำการเชื้อโคลนเดี่ยวจากงานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกปัดเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติก 250 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์แล้ว จึงทำการ Resuspend เซลล์ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 พลาสติกไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการเก็บเซลล์ตามวิธีข้างต้นมาทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 ในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 โดยเชื้อแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 5 ซ้ำ โดยมีอัตราส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อแบคทีเรียตัวรองจำนวน 5 ไอโซเลตเป็น 4.9 ต่อ 0.1 โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 5 ซ้ำ

3.5.7 การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

หลังทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด แล้วนำมาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกัน ดังนี้

3.5.7.1 การคัดเลือกจำนวนของเซลล์แบคทีเรียตัวรอง

ทำการเชื้อโคลนเดี่ยวจากงานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกปัดเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติก 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ แล้วจึงทำการ Resuspend เซลล์ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 นำพลาสติกไปบ่มในเครื่อง

เอกสารนี้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการเก็บเซลล์ตามวิธีข้างต้นมาทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ส่วนเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่

คัดเลือกให้ทำการปรับความหนาแน่นเซลล์อยู่ที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1, 1.0, 2.0 และ 3.0 จากนั้นจึงทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 ในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 โดยมีอัตราส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกเป็น 4.9 ต่อ 0.1 โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 5 ซ้ำ

3.5.7.2 การคัดเลือกอัตราส่วนของปริมาตรหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย

ทำการเชื้อโคลนนี้เดี่ยวจากงานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติก 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ แล้วจึงทำการ Resuspend เซลล์ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากันที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 นำพลาสติกไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการเก็บเซลล์ตามวิธีข้างต้นมาทำการปรับความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ส่วนเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกให้ทำการปรับความหนาแน่นเซลล์อยู่ที่ค่า OD₆₀₀ ที่คัดเลือกได้ จากนั้นจึงทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 ในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 โดยมีอัตราส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกเป็น 4.99 : 0.01, 4.9 : 0.1, 4.5 : 0.5, 4 : 1, 3.33 : 1.67 และ 2.5 : 2.5 โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 5 ซ้ำ

3.5.8 การคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

3.5.8.1 การคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน

ทำการเชื้อโคลนนี้เดี่ยวจากงานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดพลาสติก 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ แล้วจึงทำการ Resuspend เซลล์ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

สาร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากันที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 นำฟลาสก์ไปป่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการเก็บเซลล์ตามวิธีข้างต้นมาทำการปรับความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 2.0 ส่วนเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกให้ทำการปรับความหนาแน่นเซลล์อยู่ที่ค่า OD_{600} ที่คัดเลือกได้ จากนั้นจึงทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 ในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 โดยมีอัตราส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.5.7.2 โดยมีแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำซูโครส กรดอะซิติก กรดซิตริก และกลีเซอรอล ซึ่งแต่ละแหล่งคาร์บอนที่เติมเข้าไปจะมีความเข้มข้นอยู่ที่ 100 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 5 ซ้ำ

3.5.8.2 การคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ทำการเชื้อโคลนเดี่ยวจากจานเพาะเชื้อปริมาตร 1 ลูกปัดเต็ม ใส่ลงอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร นำไปป่มในเครื่องป่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ Centrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารแขวนลอยเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้น จึงทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อได้ตะกอนเซลล์ แล้วจึงทำการ Resuspend เซลล์ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากันที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 จึงนำฟลาสก์ไปป่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการเก็บเซลล์ตามวิธีข้างต้นมาทำการปรับความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 2.0 ส่วนเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกให้ทำการปรับความหนาแน่นเซลล์อยู่ที่ค่า OD_{600} ที่คัดเลือกได้ จากนั้นจึงทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.2 ในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 โดยมีอัตราส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.5.7.2 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 3.5.8.1 ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่เติมเข้าไปจะมีความเข้มข้นอยู่ที่ 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ คาร์บอนอะตอมต่อลิตร โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 5 ซ้ำ

3.5.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารย้อมสีแกรม โดยหยดสีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต ลงให้ท่วมรอยเสมียร์ (Smear) จากนั้นทิ้งไว้ไม่ว่าการ 1 นาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำกลั่นเบาๆ หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเสมียร์ จากนั้นทิ้งไว้ 1

นาที่ ล้างออกด้วยกลั่นเบาๆ จึงล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10-15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเบาๆ แล้วจึงย้อมสีซาฟรานิน จากนั้นทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเบาๆ แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งสนิท จากนั้นจึงนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายรูปรูปได้

3.5.10 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rDNA

3.5.10.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Whole-cell PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Whole-cell PCR โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัพเฟอร์ PCR 1 เท่าที่มีดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 0.2 มิลลิโมลาร์ Upstream primer 0.25 ไมโครโมลาร์ Downstream primer 0.25 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* polymerase 2.5 ยูนิต และโคลนของเชื้อแบคทีเรีย 1 โคลนนี้ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) โดยมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาและสภาวะแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.4 ขั้นตอนและสภาวะการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Initial denaturation	94	10 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	50	60 วินาที	
Extension	72	90 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	

3.5.10.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.5.10.1 มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.4 กรัม เติมบัพเฟอร์ 1X TBE 40 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนกระทั่งสารละลายใส อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัพเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้รออุณหภูมิของเจลอยู่ที่ประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส เติมเจลสตาร์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ส่วนของอะกาโรส แล้วจึงเทใส่ถาดเจลที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้จนกว่าเจลแข็งตัว จากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (Well) ของแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้างต้นและใช้ 100 bp DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.5.10.3 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จนกระทั่งแถบของดีเอ็นเอแยกออกจากกันอย่างชัดเจน เพื่อยืนยันว่ามีดีเอ็นเอที่ต้องการอยู่ จากนั้นทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์สำเร็จรูปของ Geneaid (GenepHlow™ Gel/PCR Kit) นำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาใส่หลอด microcentrifuge ที่มี DF buffer ปริมาตร 5 เท่าของปริมาณตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนำมาใส่ลงในคอลัมน์ที่อยู่ในหลอดเก็บตัวอย่าง (Collection tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่ช่องเหลวใน Collection tube เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่ช่องเหลวใน Collection tube แล้วนำคอลัมน์เปล่าไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำการย้ายคอลัมน์ไปใส่หลอด Microcentrifuge ใหม่ แล้วทำการเติม Elution buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.5.10.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท U2Bio (ประเทศไทย)

3.5.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองมาวิเคราะห์เปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และการทดสอบ Posteriori Tests (Post Hoc Tests) ของ Duncan โดยใช้ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

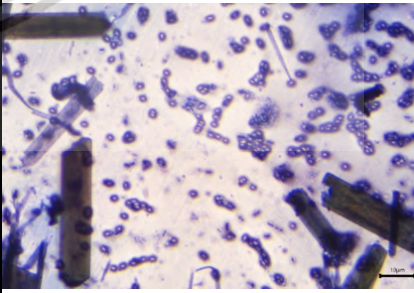
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการและแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

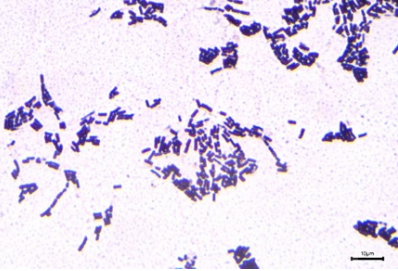


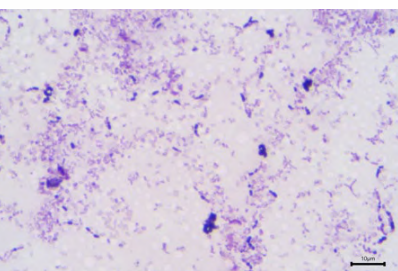
จากการนำแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการ 12 ไอโซเลต ได้แก่ *A. xylinum*, *B. cereus*, *B. subtilis* TISTR1248, *E. coli* TISTR074, *L. monocytogenes*, *M. luteus* TISTR2374, *P. aeruginosa* TISTR2370, *P. vulgaris*, *S. enterica* serovar Weltevreden, *S. marcescens* TISTR1354, *S. aureus* TISTR746 และ *V. parahaemolyticus* และแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 6 ไอโซเลต ได้แก่ EJ1, EJ3, EJ4, EJ6, EJ7 และ EJ9 มาทำการย้อมสีแกรม โดยหยดสีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต ลงให้ท่วมรอยเสมียร์ (smear) จากนั้นทิ้งไว้ 60 วินาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำกลั่นเบาๆ หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเสมียร์ จากนั้นทิ้งไว้ 60 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเบาๆ จึงล้างสีออกอย่างรวดเร็วด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเบาๆ แล้วจึงย้อมสีซาฟรานิน จากนั้นทิ้งไว้ 60 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเบาๆ แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งสนิท จากนั้นจึงนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายภาพได้ ได้ผลการทดลองของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลต จากห้องปฏิบัติการดังตารางที่ 4.1 และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 6 ไอโซเลต ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการ 12 ไอโซเลต

สายพันธุ์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ภาพใต้วัดกล้อง
<i>Acetobacter xylinum</i>	โคโลนีมีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว มีส่วนประกอบหลักเป็นเซลลูโลส (Cellulose) และย้อมติดสีแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (Rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (Non spore forming bacteria)	

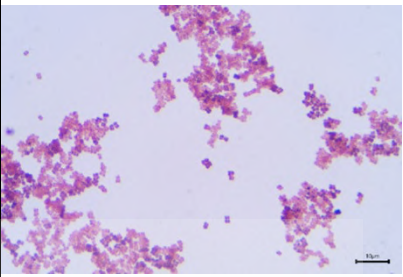
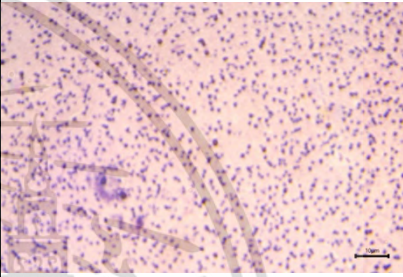
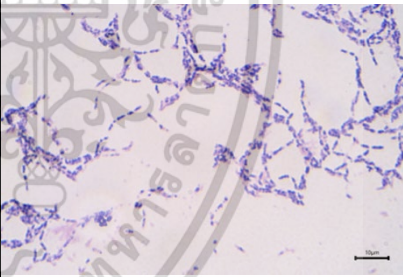
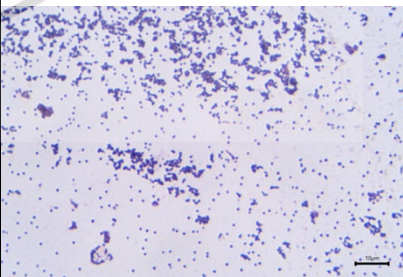
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการ 12 ไอโซเลต (ต่อ)

สายพันธุ์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ภาพไตกล้อง
<i>Bacillus cereus</i>	โคโลนีจะมีสีขาวครีมหรือสีขาว ขุ่น ขอบหยัก โค้งมน มีโซน ตะกอนสีขาวขุ่นรอบๆ และย้อม ติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (Rod shape) สร้างสปอร์ (Spore forming bacteria)	
<i>Bacillus subtilis</i>	ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบไม่ เรียบ ผิวหน้าหยาบ ด้าน รูปร่าง เป็นท่อน (Rod shape) และย้อม ติดสีแกรมบวก อยู่ในวงศ์ Bacillaceae สร้างสปอร์อยู่ด้าน ข้างเซลล์ (Lateral)	
<i>Escherichia coli</i>	ลักษณะโคโลนีกลมๆ โค้งนูน ขอบเรียบ มีขอบชัดเจน และย้อม ติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ลักษณะ Coccobacilli มี ลักษณะสั้นและอวบ ไม่มีแคปซูล ไม่สร้างสปอร์	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ลักษณะโคโลนีคล้ายหยดน้ำ เนื้อ บนผิวโคโลนีละเอียด (Fined surface texture) รอบๆ โคโลนี เรียบใส และย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างลักษณะเป็นท่อน ไม่ สร้างสปอร์ (Non spore forming bacteria)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการ 12 ไอโซเลต (ต่อ)

สายพันธุ์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ภาพไตกล้อง
<i>Micrococcus luteus</i>	โคโลนีจะมีลักษณะกลม เรียบ และนูน มีผิวมันวาวทึบแสง มีสีเหลือง และที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม (Coccus) เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม ไม่สร้างสปอร์ สร้างเม็ดสี (Pigment) ได้	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	โคโลนีจะมีลักษณะเป็นวงกลม นูน ครีมี ขอบหยัก ผิวไม่เรียบ และย้อมติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นรูปท่อนกลม เคลื่อนที่ด้วยแฟล็กเจลตา	
<i>Proteus vulgaris</i>	โคโลนีมีลักษณะแบนใส ตรงกลาง มีสีเทา เกิดจากการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ อาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณใต้โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	โคโลนีมีลักษณะ กลม นูน ผิวเรียบ สีขาวขุ่น จะมีบริเวณขุ่นรอบโคโลนีและมีบริเวณใสรอบๆ นอกบริเวณขุ่นอีกชั้น และย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นทรงกลม (Coccus) มักเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ไม่สร้างสปอร์	

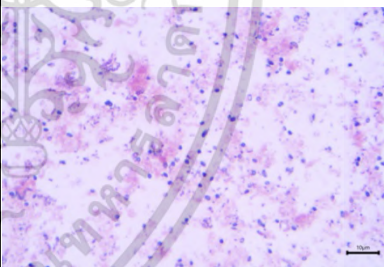
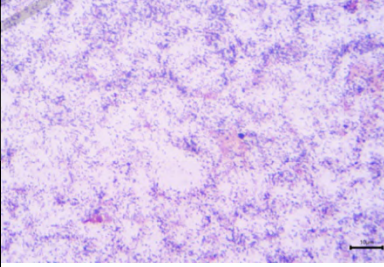
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการ 12 ไอโซเลต (ต่อ)

สายพันธุ์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ภาพไตกล้อง
<i>Serratia marcescens</i>	โคโลนีมีลักษณะ กลม ผิวเรียบ นูน สีครีม โคโลนีมีนวลวามีเมือก และย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่าง กลม กระจายตัวกัน	
<i>Salmonella enterica</i> serovar Weltevreden	โคโลนีมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น กลม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์	
<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	โคโลนีมีลักษณะสีครีมเกือบใส โคโลนีมีขนาดเล็ก กลม และย้อม ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์	

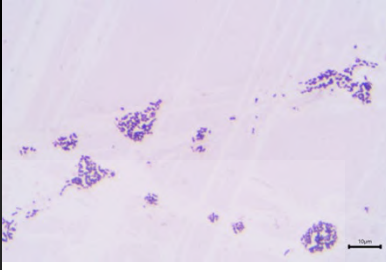
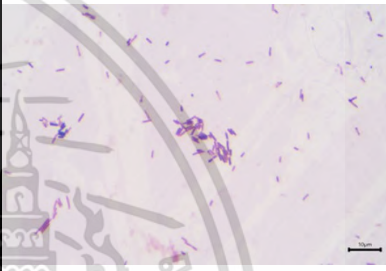
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 6 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ภาพใต้กล้อง
EJ1	ลักษณะโคโลนีสีครีม ขอบโคโลนีมีสีเหลืองอ่อน ผิวขรุขระ ขอบหยัก ผิวก้นหยาบด้าน และย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นเส้นยาวต่อกัน เป็นสาย เกาะกลุ่มกัน	
EJ3	ลักษณะโคโลนีสีครีมขุ่น โคโลนีกลม ผิวเรียบ และย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น (Rod) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่	
EJ4	ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น โคโลนีขนาดเล็ก กลม ผิวเรียบ และย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม อวบน้ำกระจายตัวกัน	
EJ6	ลักษณะโคโลนีสีครีม โคโลนีกลม ผิวเรียบ มันวาว ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 6 ไอโซเลต (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ภาพใต้กล้อง
EJ7	ลักษณะโคโลนีสีครีม มีลักษณะกลม นูน รอบๆ โคโลนีเรียบ และย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น เกาะกลุ่มกันเรียงตัวเป็นกลุ่ม	
EJ9	ลักษณะโคโลนีสีขาวครีมใส โคโลนีมีขนาดเล็กกลม ผิวเรียบ และย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน (Rod shape)	

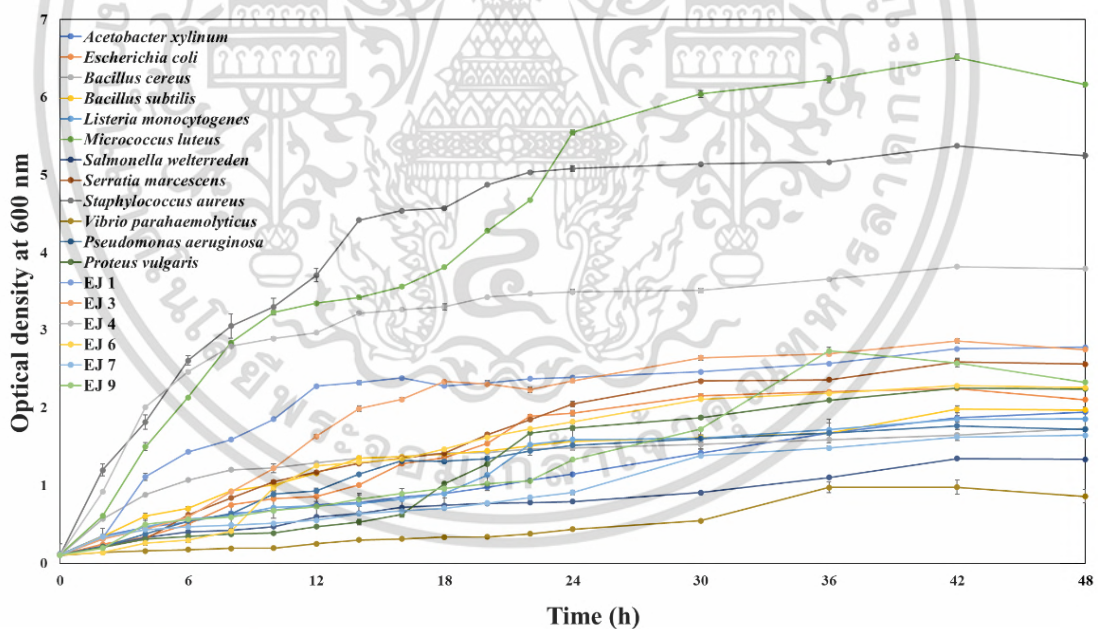
4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร LB

4.2.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 18 ไอโซเลต (เชื้อแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการ 12 ไอโซเลตและเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 6 ไอโซเลต) มาทำให้บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียให้เท่ากันที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อแต่ละตัวจะทำทั้งหมด 3 ข้ำ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละชั่วโมงมาวัดการเจริญด้วยการวัดค่า OD_{600} จะได้กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลต (รูปที่ 4.1) พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเริ่มเข้าสู่ระยะ Log ในช่วง 2-12 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะ Stationary ในช่วง 12 แต่พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* อยู่ในระยะ Lag ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-30 แล้วจึงเข้าสู่ระยะ log ในช่วง 30-36 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ Stationary เชื้อ *S. aureus* และ *M. luteus* มีการเจริญที่สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ โดย *S. aureus* จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 0-20 จนเริ่มไม่ต่ำกว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คงที่เมื่อผ่านชั่วโมงที่ 24 ส่วน *M. luteus* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 0-24 จะเริ่มคงที่เมื่อผ่านชั่วโมงที่ 30 ซึ่งการที่ *S. aureus* และ *M. luteus* มีการเจริญสูงสุดอาจมาจากสภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญ โดย *S. aureus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 7-48 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *M. luteus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส (Betts และคณะ, 2006; Kadariya และคณะ, 2014) ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *A. xylinum* และ *P. vulgaris* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำที่ 28 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Wang และ Pan, 2014; Zahan และคณะ, 2015) และ *B. subtilis* สามารถเจริญได้ดีที่ pH 5.5 (Koni และคณะ, 2017) ซึ่งอาหารเหลว LB ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนี้มี pH อยู่ที่ 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จึงอาจทำให้เชื้อเหล่านี้ไม่สามารถเจริญได้จากสภาวะที่ไม่เหมาะสม

จากกราฟแสดงการเจริญเติบโต (รูปที่ 4.1) สามารถนำมาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) และระยะเวลาทวีคูณและเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 99.5% พบว่า *M. luteus* และ *S. aureus* มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ $0.291 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ และ $0.290 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ ตามลำดับ และมีระยะเวลาทวีคูณเท่ากับ 2.382 ชั่วโมง และ 2.391 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)



รูปที่ 4.35 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลต จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะเวลาทวีคูณของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

สายพันธุ์	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ระยะเวลาทวีคูณ (ชั่วโมง)
<i>Acetobacter xylinum</i>	0.062 ± 0.002 ^g	11.256 ± 0.415 ^{cd}
<i>Bacillus cereus</i>	0.077 ± 0.004 ^f	8.965 ± 0.481 ^{bc}
<i>Bacillus subtilis</i>	0.135 ± 0.004 ^d	5.150 ± 0.137 ^{ab}
<i>Escherichia coli</i>	0.100 ± 0.012 ^e	7.008 ± 0.896 ^{abc}
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.063 ± 0.001 ^g	10.934 ± 0.138 ^{cd}
<i>Micrococcus luteus</i>	0.349 ± 0.005 ^b	1.985 ± 0.030 ^a
<i>Salmonella melterreden</i>	0.040 ± 0.001 ^{hi}	17.275 ± 0.323 ^e
<i>Serratia marcescens</i>	0.036 ± 0.003 ^h	19.263 ± 1.546 ^e
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.365 ± 0.002 ^a	1.898 ± 0.011 ^a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.010 ± 0.002 ^j	63.574 ± 4.129 ^f
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.069 ± 0.002 ^g	10.041 ± 0.276 ^{bcd}
<i>Proteus vulgaris</i>	0.034 ± 0.003 ^h	20.477 ± 1.947 ^e
EJ 1	0.205 ± 0.005 ^c	3.389 ± 0.087 ^a
EJ 3	0.095 ± 0.004 ^e	7.278 ± 0.275 ^{abc}
EJ 4	0.346 ± 0.008 ^b	2.003 ± 0.043 ^a
EJ 6	0.038 ± 0.002 ^{hi}	18.191 ± 0.923 ^e
EJ 7	0.045 ± 0.003 ^h	15.459 ± 1.012 ^{de}
EJ 9	0.067 ± 0.002 ^g	10.313 ± 0.235 ^{bcd}

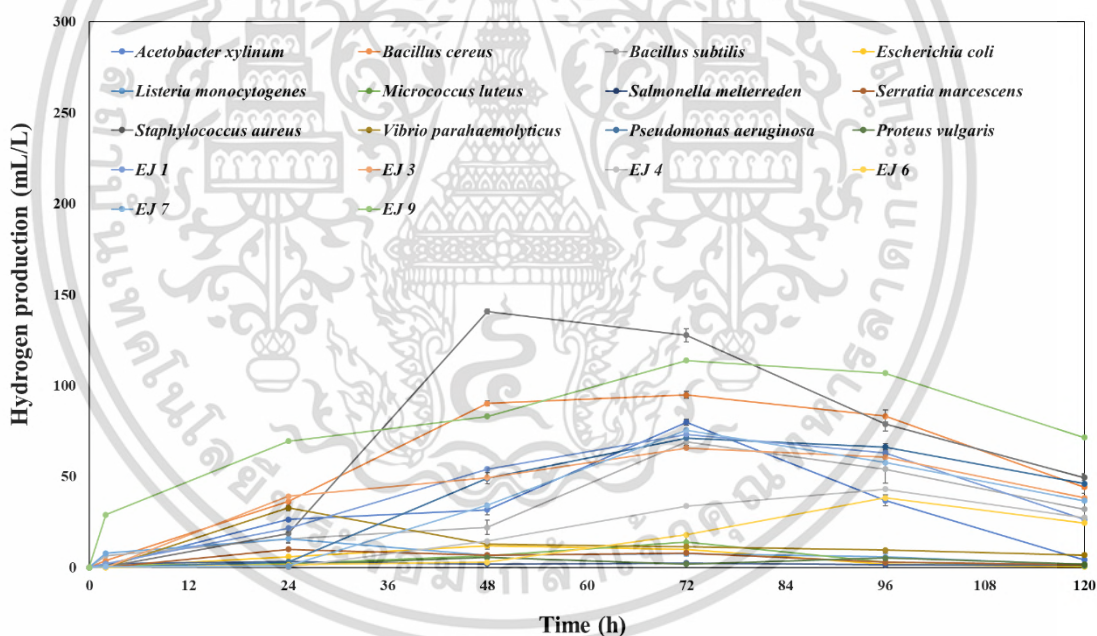
4.2.2 ผลการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย

จากการนำแบคทีเรียทั้งหมด 18 ไอโซเลต มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจน โดยนำเซลล์ที่เตรียมไว้มาทำการปรับอายุเซลล์ให้มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน พบว่าเชื้อ *S. aureus* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 แล้วจึงลดลงในชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 4.2 และ 4.3) และยังคงสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า *S. aureus* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 สูงที่สุดเช่นกัน (รูปที่ 4.4 และ 4.5)

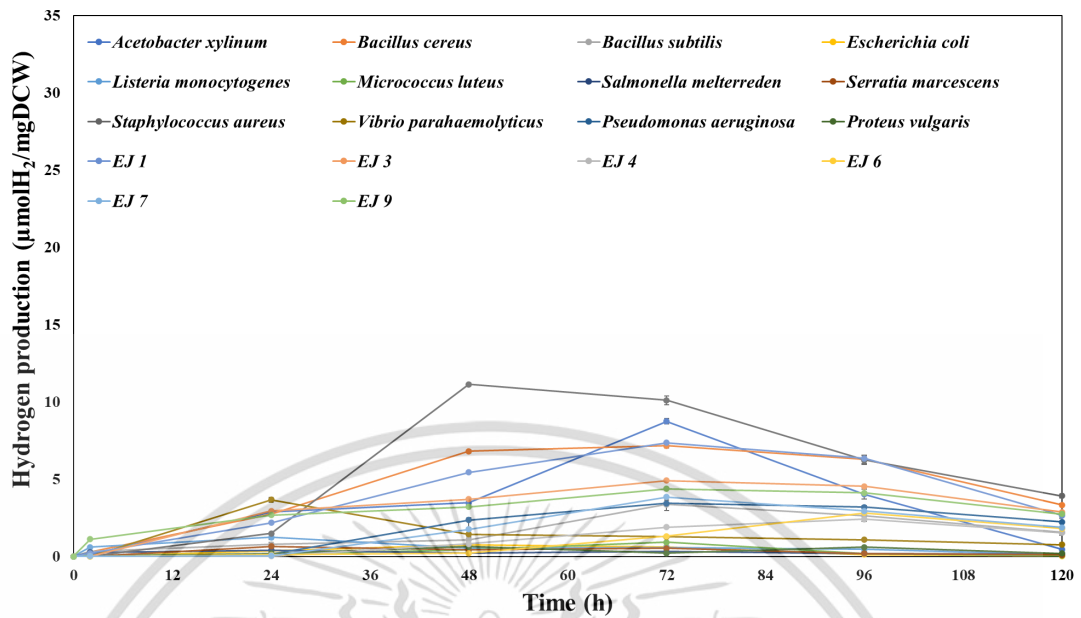
จากการคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนและเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99.5% (ตารางที่ 4.4) พบว่า *S. aureus* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.932 mL/L/h และ 0.232 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ และมีผลได้สูงสุดเท่ากับ 140.739 mL/L และ 11.140 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลต พบว่า *S. aureus* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าการผลิตไฮโดรเจนสัมพันธ์กันกับการเจริญเติบโต จากการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่า *S. aureus* มีความสามารถในการเจริญสูงสุด ซึ่งก็ได้มีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากลิกโนเซลลูโลสในของเสียทางการเกษตร โดยใช้ *Staphylococcus epidermidis* พบว่า *S. epidermidis* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดี โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1.6 โมลไฮโดรเจนต่อโมลไซโลส (Mazumder และคณะ, 2020)

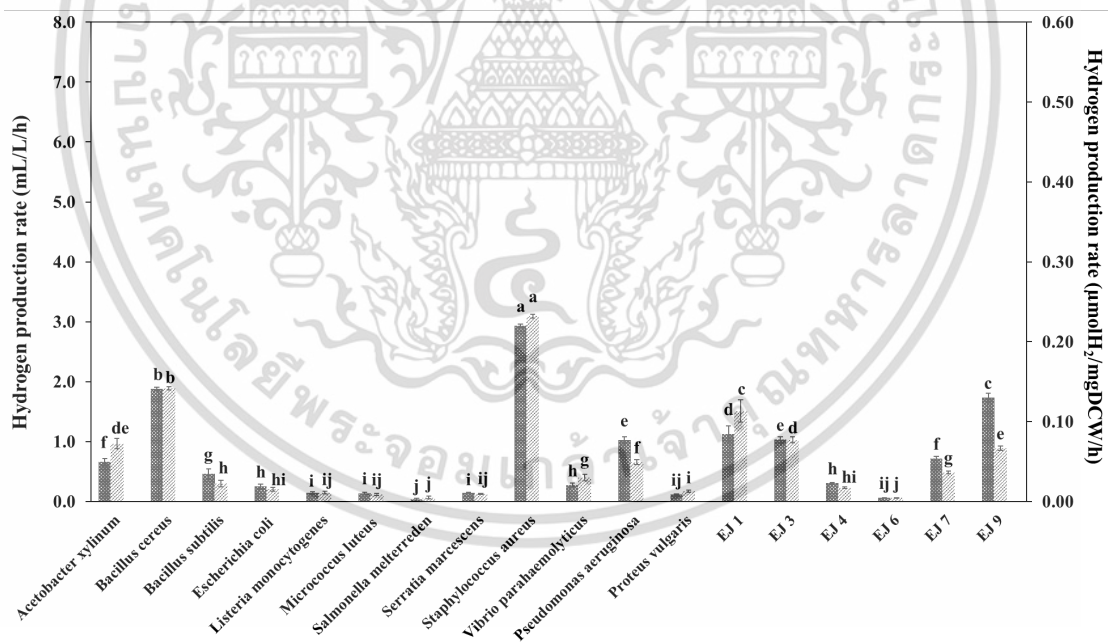


รูปที่ 4.36 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

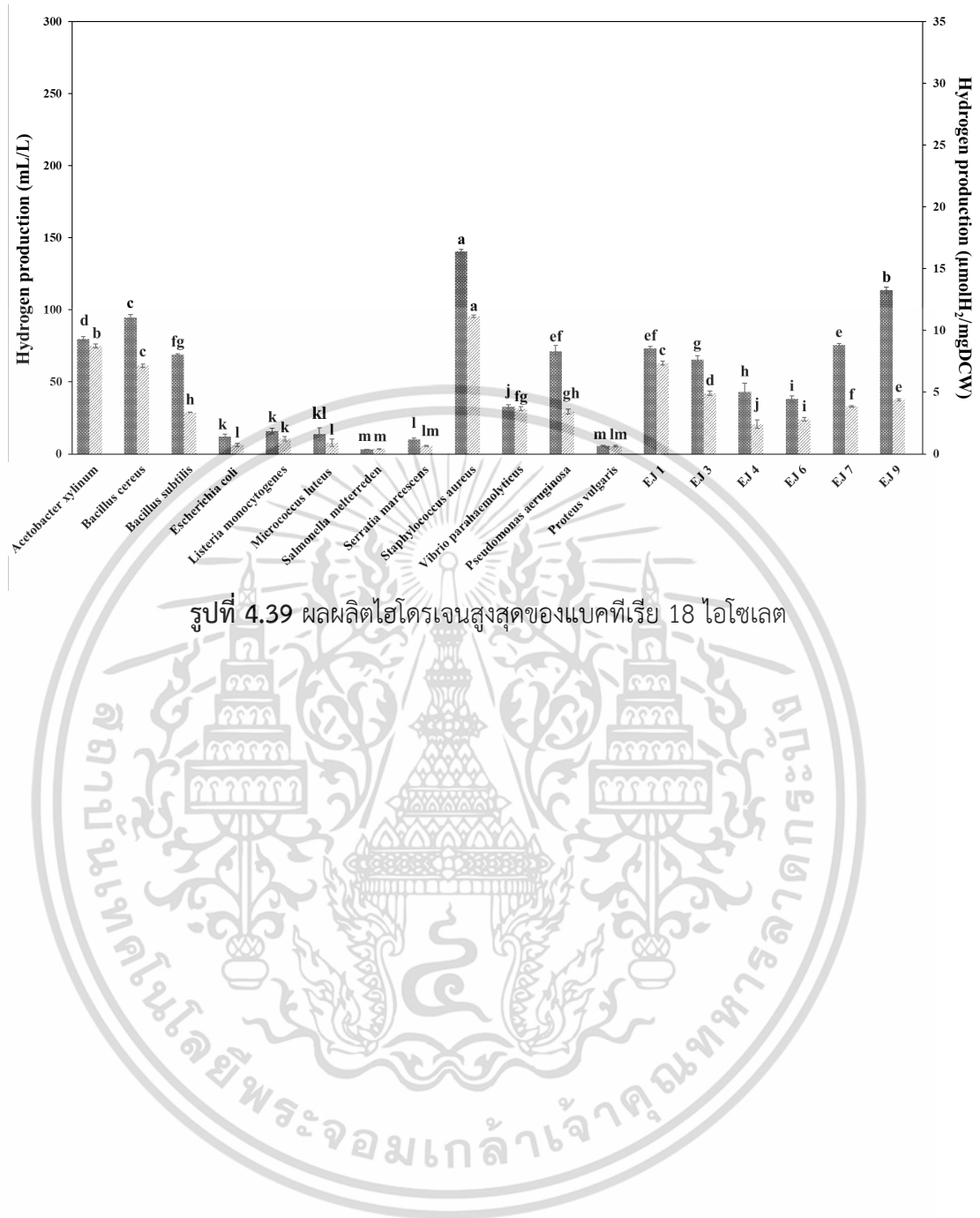


รูปที่ 4.37 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต



รูปที่ 4.38 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ของแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.39 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

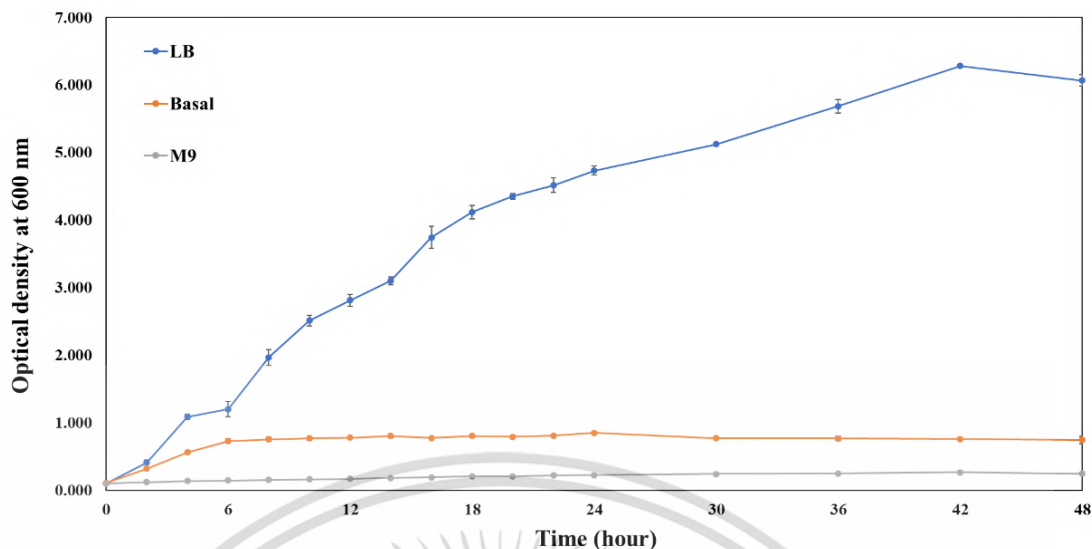
สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	
	mL/L/h	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$	mL/L	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$
<i>Acetobacter xylinum</i>	0.661 ± 0.058^f	0.072 ± 0.006^{de}	79.894 ± 1.534^d	8.742 ± 0.168^b
<i>Bacillus cereus</i>	1.878 ± 0.027^b	0.142 ± 0.002^b	94.852 ± 1.816^c	7.153 ± 0.137^c
<i>Bacillus subtilis</i>	0.459 ± 0.083^s	0.022 ± 0.004^h	68.985 ± 0.551^{fs}	3.362 ± 0.027^h
<i>Escherichia coli</i>	0.249 ± 0.040^h	0.015 ± 0.002^{hi}	11.971 ± 1.930^{kl}	0.734 ± 0.118^l
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.140 ± 0.023^i	0.011 ± 0.002^{ij}	15.859 ± 2.162^k	1.238 ± 0.169^k
<i>Micrococcus luteus</i>	0.136 ± 0.019^j	0.009 ± 0.001^{ij}	13.866 ± 4.488^{kl}	0.910 ± 0.295^l
<i>Salmonella Weltevreden</i>	0.038 ± 0.013^j	0.005 ± 0.002^j	3.142 ± 0.207^m	0.398 ± 0.026^m
<i>Serratia marcescens</i>	0.141 ± 0.009^j	0.009 ± 0.001^{ij}	10.009 ± 0.885^l	0.653 ± 0.058^{lm}
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.932 ± 0.028^a	0.232 ± 0.002^a	140.739 ± 1.359^a	11.14 ± 0.108^a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.268 ± 0.038^b	0.030 ± 0.004^s	32.787 ± 1.451^j	3.659 ± 0.162^{fs}
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	1.021 ± 0.062^e	0.049 ± 0.003^{ef}	71.248 ± 4.100^{ef}	3.428 ± 0.197^c
<i>Proteus vulgaris</i>	0.114 ± 0.012^{ij}	0.013 ± 0.001^{li}	5.481 ± 0.576^m	0.624 ± 0.066^{lm}
EJ 1	1.126 ± 0.137^d	0.113 ± 0.014^c	73.212 ± 1.523^{ef}	7.361 ± 0.153^c
EJ 3	1.030 ± 0.050^e	0.077 ± 0.004^d	65.626 ± 2.543^s	4.916 ± 0.190^d
EJ 4	0.303 ± 0.018^b	0.017 ± 0.001^{hi}	43.045 ± 1.249^h	2.414 ± 0.070^j
EJ 6	0.060 ± 0.006^{ij}	0.004 ± 0.000^j	38.228 ± 1.938^i	2.807 ± 0.142^i
EJ 7	0.713 ± 0.037^f	0.036 ± 0.002^s	75.590 ± 1.097^e	3.852 ± 0.056^f
EJ 9	1.731 ± 0.072^c	0.067 ± 0.003^e	113.764 ± 2.154^b	4.378 ± 0.083^e

4.3 ผลการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ส่งเสริมการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย

4.3.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9

จากการผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด จึงได้นำเชื้อ *S. aureus* มาทำการทดลองต่อ โดยนำเชื้อ *S. aureus* มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว LB Basal และ M9 ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียให้เท่ากันที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อแต่ละตัวจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละชั่วโมงมาวัดการเจริญด้วยการวัดค่า OD₆₀₀ พบว่า *S. aureus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเหลว LB เจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยในอาหารเหลว Basal และแทบไม่เจริญในอาหารเหลว M9 (รูปที่ 4.6) โดยในอาหารเหลว LB เชื้อ *S. aureus* จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงที่ 0-20 จนเริ่มคงที่เมื่อผ่านชั่วโมงที่ 24 อาหารเหลว LB มีส่วนประกอบของสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งนับว่าเป็นสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน ที่ประกอบด้วยเปปไทด์และกรดอะมิโน จึงสามารถดูดซึมเข้าเซลล์แล้วนำไปสังเคราะห์เป็นส่วนประกอบที่มีองค์ประกอบของไนโตรเจนภายในเซลล์ได้ง่ายกว่าสารประกอบไนโตรเจนอนินทรีย์ (Ferchichi และคณะ, 2005; Mazumder และคณะ, 2020) และอาหารเหลว LB ยังมีแหล่งไนโตรเจนอื่นอีกนั่นคือทริปโตเนนที่เป็นเคซีนที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน (Trypsin) ประกอบด้วยโอลิโกเปปไทด์ และกรดอะมิโน โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเสริม (Puhm และคณะ, 2022) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ไม่มีในอาหาร Basal และ M9 จึงอาจทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดีเท่าอาหาร LB

จากกราฟแสดงการเจริญเติบโต (รูปที่ 4.6) สามารถนำมาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะและระยะเวลาทวีคูณและเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 99.5% (ตารางที่ 4.5) พบว่า *S. aureus* มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในอาหารเหลว LB เท่ากับ 0.2358 ชั่วโมง⁻¹ และมีระยะเวลาทวีคูณเท่ากับ 2.9418 ชั่วโมง และมีอัตราการเจริญจำเพาะในอาหาร Basal เท่ากับ 0.0554 ชั่วโมง⁻¹ และมีระยะเวลาทวีคูณเท่ากับ 12.5150 ชั่วโมง ในขณะที่ M9 มีอัตราการเจริญจำเพาะในอาหาร M9 ต่ำมากโดยเท่ากับ 0.0057 ชั่วโมง⁻¹ และมีระยะเวลาทวีคูณเท่ากับ 122.7448 ชั่วโมง



รูปที่ 4.40 การเจริญเติบโตของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9 จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.20 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะการทวีคูณของเชื้อ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB Basal และ M9

อาหารเลี้ยงเชื้อ	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ระยะการทวีคูณ (ชั่วโมง)
LB	0.2358 ± 0.0080 ^a	2.9418 ± 0.0997 ^a
Basal	0.0554 ± 0.0011 ^b	12.5150 ± 0.2485 ^b
M9	0.0057 ± 0.0008 ^c	122.7448 ± 19.1031 ^c

4.3.2. ผลการผลิตไฮโดรเจนของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9

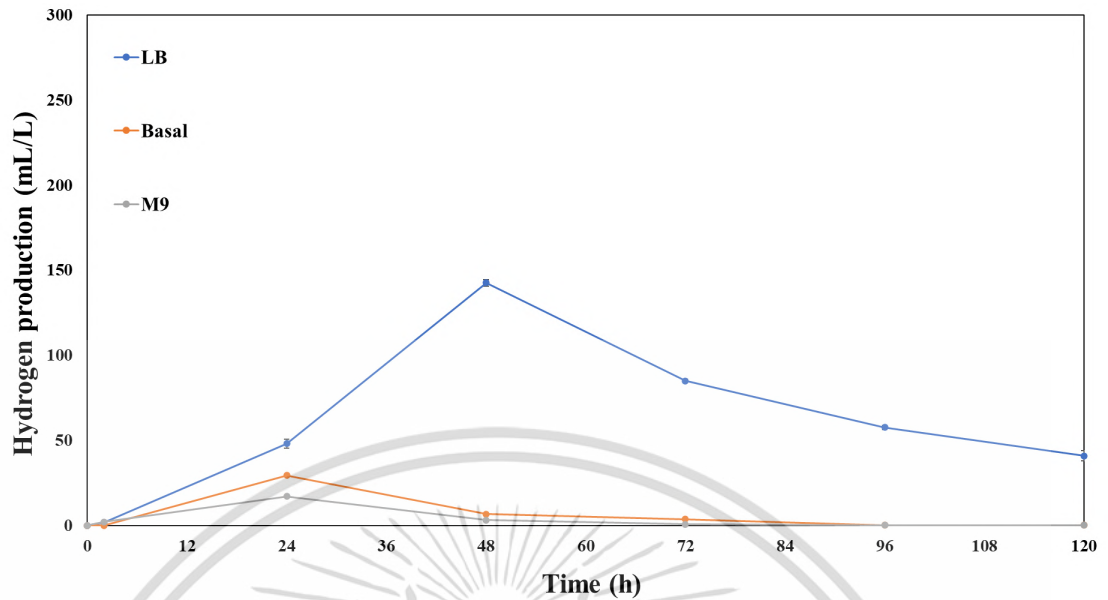
จากการนำ *S. aureus* มาทำการทดลองต่อ โดยนำเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* ที่ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีความหนาแน่นเซลล์ที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 มาบ่มในอาหารเหลว LB, Basal และ M9 ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 พบว่าเชื้อ *S. aureus* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในอาหารเหลว LB โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 แล้วจึงลดลงในชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 4.7 และ 4.8) และยังพบว่า *S. aureus* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในอาหารเหลว LB ในชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4.9 และ 4.10)

จากการนำค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.9) และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.10) เอกสารนี้มาเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99.5% พบว่า *S. aureus* มีอัตราที่ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

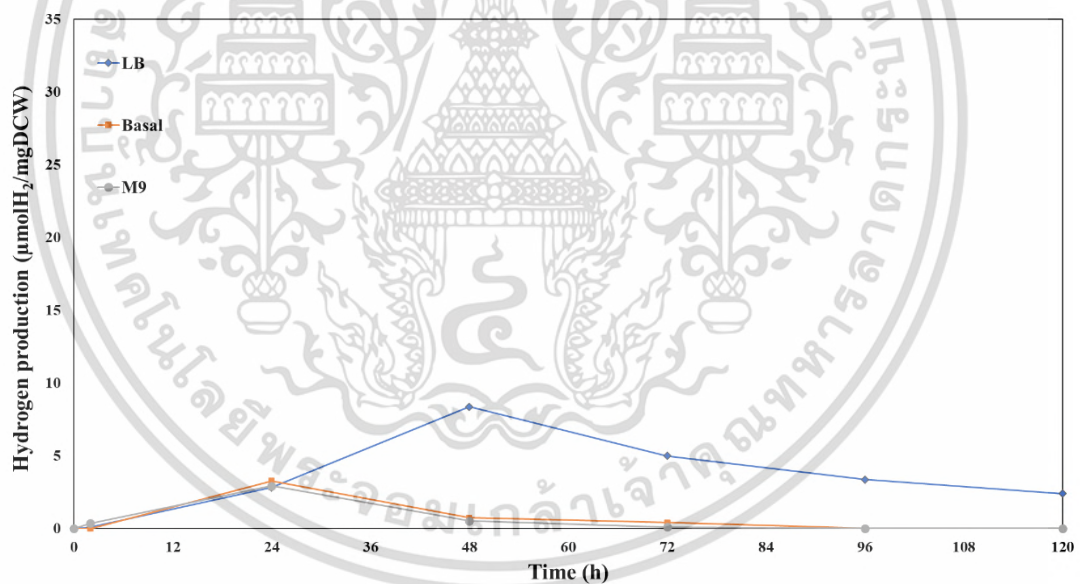
การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.9710 mL/L/h และ 0.1401 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 142.608 mL/L และ 8.377 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ (ตารางที่ 4.5)

จากผลการผลิตไฮโดรเจนของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9 พบว่า *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด อาจมาจากอาหารเหลว LB มีส่วนประกอบของสารสกัดจากยีสต์ที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยเปปไทด์และกรดอะมิโน จึงสามารถดูดซึมเข้าเซลล์แล้วนำไปใช้งานภายในเซลล์ได้เลย ต่างจากอาหารเหลวชนิดอื่นที่มีเพียงสารประกอบไนโตรเจนอนินทรีย์ ที่เมื่อเข้าเซลล์แล้วต้องนำไปผ่านกระบวนการสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโน (An และคณะ, 2014) จึงทำให้สิ้นเปลืองพลังงานในเซลล์ และเวลาในการสังเคราะห์มากกว่า ส่งผลให้มีช่วงระยะ lag ที่ยาวนานกว่า เป็นผลให้มีผลผลิตไฮโดรเจนน้อยกว่า (Mazumder และคณะ, 2020) และอาหารเหลว LB ยังมีทริปโตนที่เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเสริม (Puhm และคณะ, 2022) อาจทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีกว่าจึงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ferchichi และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone-yeast extract (TY) ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะ pH 7.5 ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบอนินทรีย์ โดยสารสกัดจากยีสต์ที่ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งอยู่ที่ 2.3 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อชั่วโมง และ 1.58 โมลไฮโดรเจน/โมลกลูโคส ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่มีทั้งสารสกัดจากยีสต์และทริปโตน ซึ่งมีอัตราและผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.04 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อชั่วโมง และ 1.45 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อแทนที่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ด้วยสารประกอบไนโตรเจนอนินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียมีการใช้น้ำตาลลดลง และมีการผลิตไฮโดรเจนต่ำลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

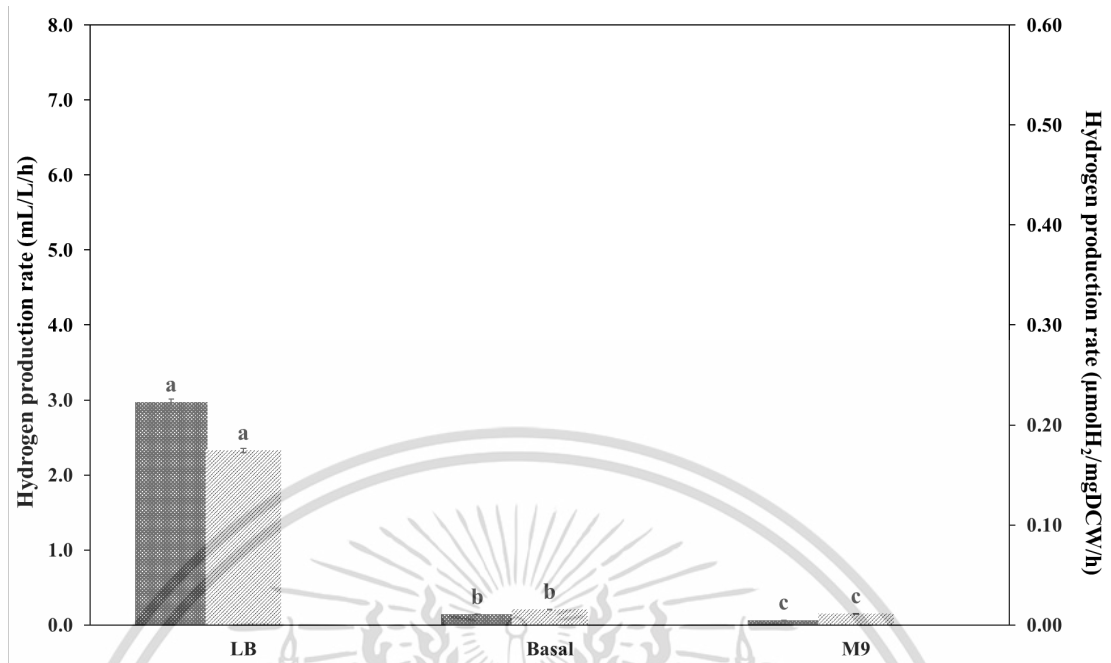


รูปที่ 4.41 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9

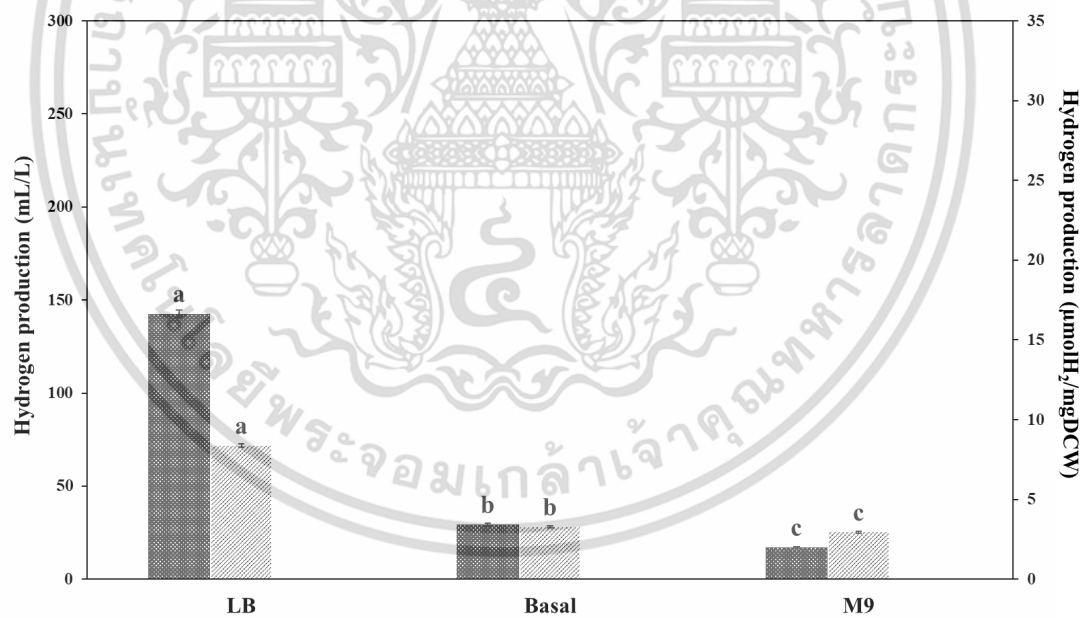


รูปที่ 4.42 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.43 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9



รูปที่ 4.44 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB, Basal และ M9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตราการผลิตไฮโดรเจน		ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	
	mL/L/h	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$	mL/L	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$
LB	2.971 ± 0.0390^a	0.1745 ± 0.0023^a	142.608 ± 1.870^a	8.377 ± 0.110^a
Basal	0.140 ± 0.003^b	0.0156 ± 0.0003^b	29.369 ± 0.719^b	3.278 ± 0.080^b
M9	0.065 ± 0.001^c	0.0112 ± 0.0002^c	17.153 ± 0.415^c	2.945 ± 0.071^c

4.4 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

จากการผลการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด จึงได้นำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB มาทำการทดลองต่อ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นตัวหลักเพาะเลี้ยงร่วมกับ *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, EJ1 และ EJ9 ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนรองลงมา โดยปรับความหนาแน่นเซลล์ให้เท่ากับที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ในอาหารเหลว LB ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ EJ1 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 24 และลดลงอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 48 ส่วนตัวอย่างอื่นๆ ส่วนใหญ่จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 และค่อยๆ ลดลงหลังจากนั้น (รูปที่ 4.11 และ 4.12) และพบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ EJ1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.13 และ 4.14)

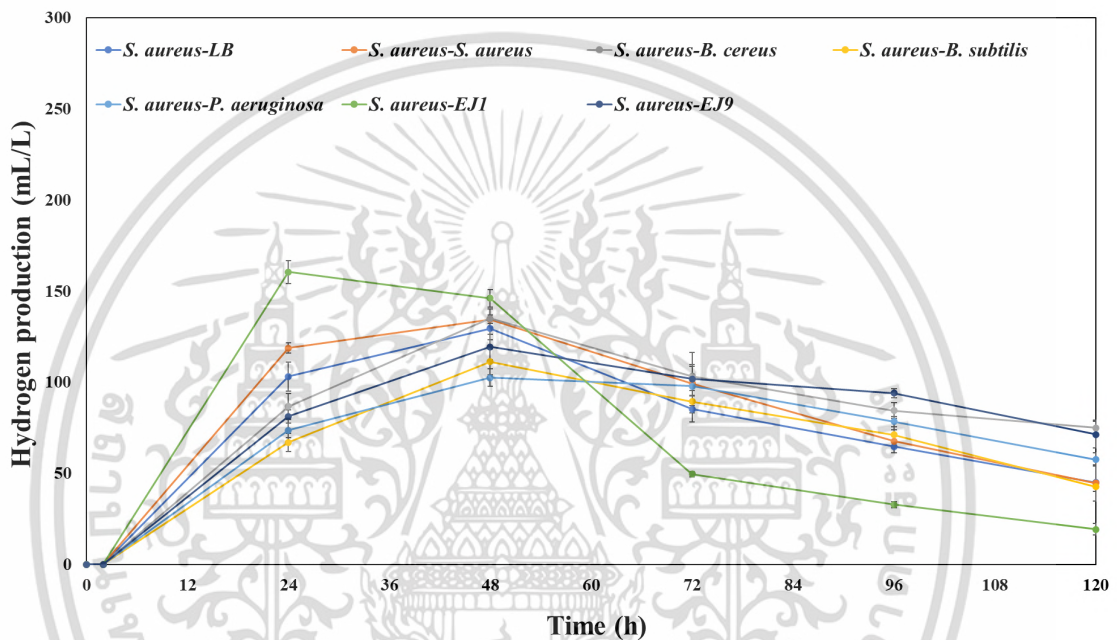
จากการนำอัตราการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.13) และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.14) มาเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99.5% พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ EJ1 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 6.689 mL/L/h และ 0.498 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ และมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 160.545 mL/L และ 11.945 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ (ตารางที่ 4.7)

จากผลการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, EJ1 และ EJ9 พบว่า *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ EJ1 มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด และมากกว่าตัวอย่างควบคุม (*S. aureus* เดี่ยว) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Patel และคณะ (2014) ที่ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Bacillus cereus*

EGU43 และ *Enterobacter cloacae* HPC123 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMG ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 0.5

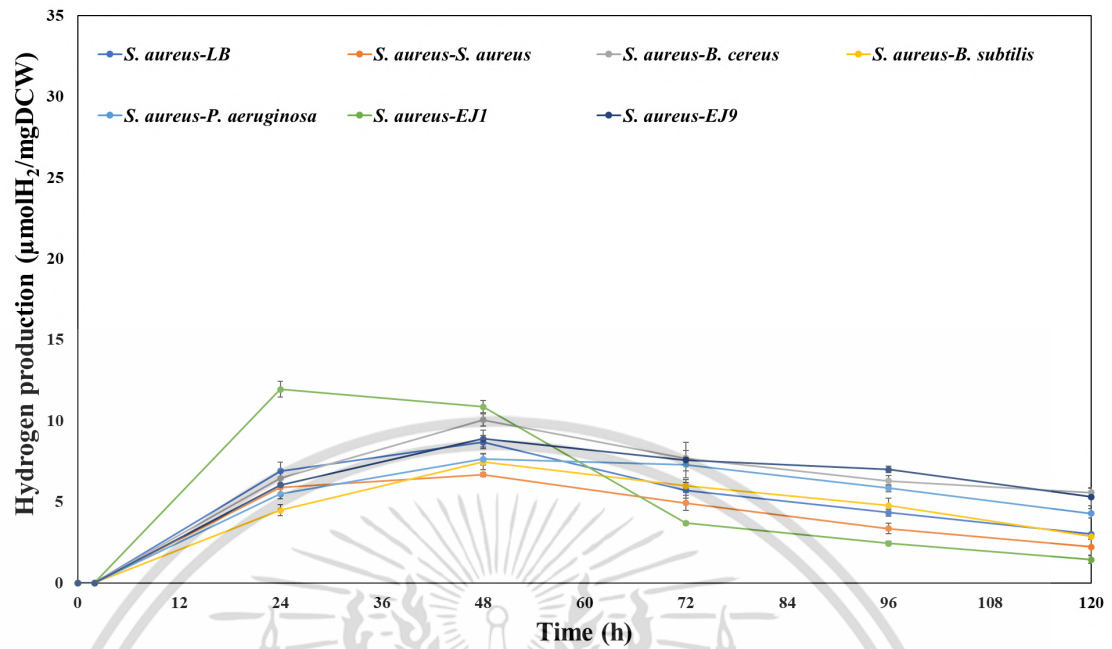
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเมื่อเทียบผลผลิตของไฮโดรเจนระหว่างการเพาะเลี้ยงเดี่ยวและ
ไม่ว่าการณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ผลและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงร่วม พบว่าการเพาะเลี้ยงร่วมของ *B. cereus* EGU43 และ *E. cloacae* HPC123 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่า โดยมีค่าเท่ากับ 3.0 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ส่วน *B. cereus* EGU43 และ *E. cloacae* HPC123 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวให้ผลผลิตไฮโดรเจนเพียง 1.98 และ 1.70 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ตามลำดับ ซึ่งก็ได้มีรายงานพบว่า *B. coagulans* สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Citrobacter freundii* และ *E. cloacae* (Kotay และ Das, 2010)

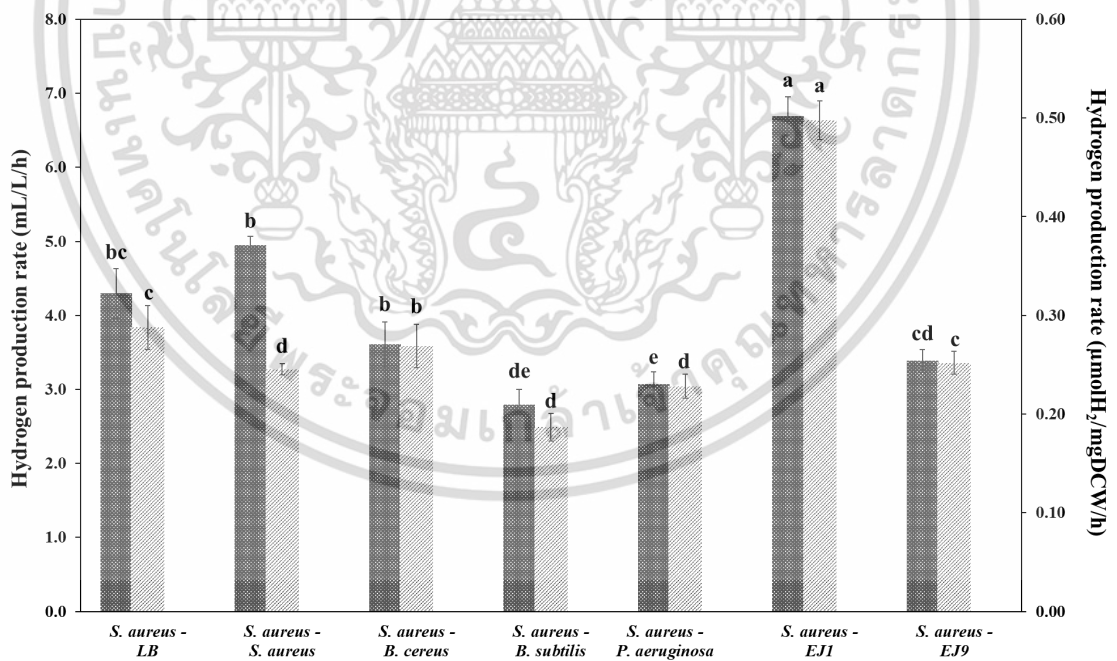


รูปที่ 4.45 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

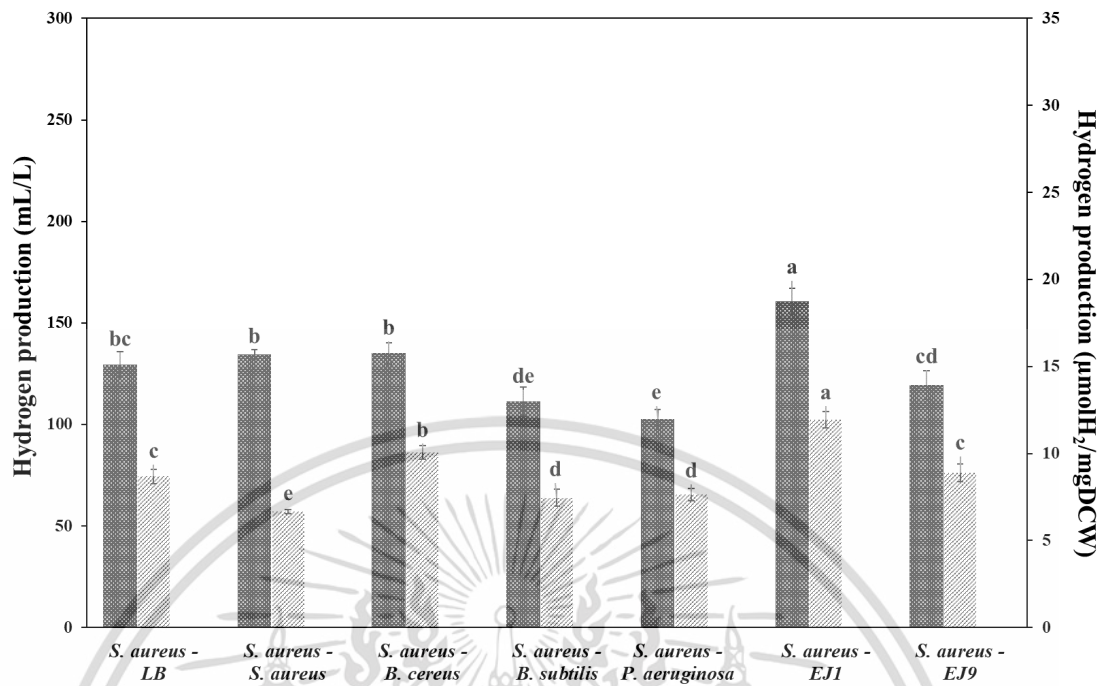


รูปที่ 4.46 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน



รูปที่ 4.47 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.48 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของแบคทีเรียเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นตัวหลักเพาะเลี้ยงร่วมกับ *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, EJ1 และ EJ9

สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจน		ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	
	mL/L/h	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$	mL/L	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$
<i>S. aureus</i> - LB	4.296 ± 0.336 ^{bc}	0.288 ± 0.022 ^c	129.551 ± 6.179 ^{bc}	8.675 ± 0.414 ^c
<i>S. aureus</i> - <i>S. aureus</i>	4.948 ± 0.116 ^b	0.245 ± 0.006 ^d	134.604 ± 2.362 ^b	6.677 ± 0.117 ^e
<i>S. aureus</i> - <i>B. cereus</i>	3.612 ± 0.296 ^b	0.269 ± 0.022 ^b	135.083 ± 5.178 ^b	10.051 ± 0.385 ^b
<i>S. aureus</i> - <i>B. subtilis</i>	2.790 ± 0.209 ^{de}	0.187 ± 0.014 ^d	111.291 ± 7.165 ^{de}	7.453 ± 0.480 ^{de}
<i>S. aureus</i> - <i>P. aeruginosa</i>	3.067 ± 0.167 ^e	0.228 ± 0.012 ^d	102.572 ± 4.842 ^e	7.632 ± 0.360 ^d
<i>S. aureus</i> - EJ1	6.689 ± 0.266 ^a	0.498 ± 0.020 ^a	160.545 ± 6.392 ^a	11.945 ± 0.476 ^a
<i>S. aureus</i> - EJ9	3.386 ± 0.154 ^{cd}	0.252 ± 0.011 ^c	119.486 ± 6.982 ^{cd}	8.890 ± 0.520 ^c

4.5 ผลการตรวจสอบชนิดของไอโซเลต EJ1 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rDNA

4.5.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต EJ1 ด้วยเทคนิค Whole-cell PCR

หลังจากเพาะเลี้ยงไอโซเลต EJ1 บนอาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Whole-cell PCR นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 8 โวลต์/เซนติเมตร นำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดใกล้เคียง 100 bp กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 1,517 คู่เบส (รูปที่ 4.15)



รูปที่ 4.49 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1 จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

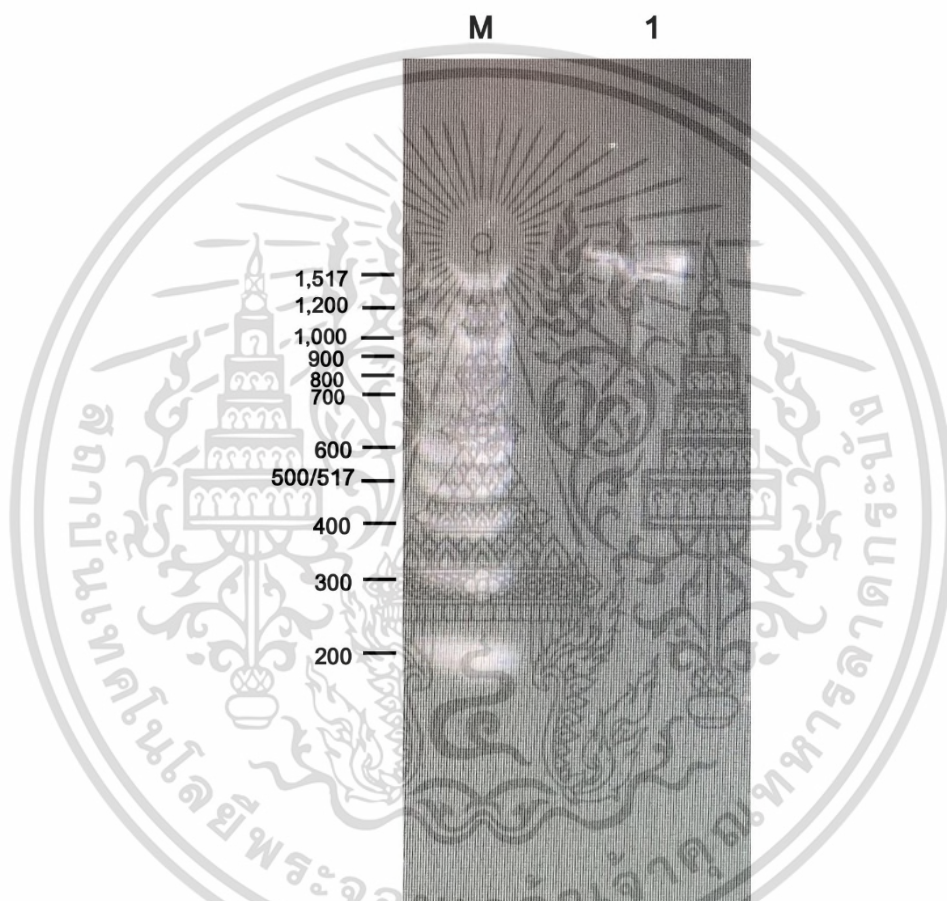
1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต EJ1

2 ตัวควบคุมผลลบ (Negative control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต EJ1 ให้บริสุทธิ์

จากการทำผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต EJ1 ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์สำเร็จรูปของ Geneaid (GenepHlow™ Gel/PCR Kit) แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 8 โวลต์/เซนติเมตร นำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์จำนวน 1 แถบที่มีขนาดใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ที่มีขนาด 1,517 คู่เบส (รูปที่ 4.16)



รูปที่ 4.50 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของไอโซเลต EJ1 จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต EJ1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

4.5.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต EJ1 ที่บริสุทธิ์ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับถ่วงน้ำหนักไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า U2Bio ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในภาคผนวก ง ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของไอโซเลต EJ1 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,000 คู่เบส (รูปที่ 4.17) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BLASTN ของ NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium* และ *Bacillus aryabhatai* มากกว่า 99.90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8) แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1 และสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Multiple alignment (รูปที่ 4.18)

1	AGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC	60
61	ACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGAT	120
121	AGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGG	180
181	GCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCC	240
241	GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG	300
301	CAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA	360
361	TGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGC	420
421	TCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT	480
481	AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTT	540
541	CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC	600
601	TTGAGTGCAAGAGAAAAGCGGAATTCACCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG	660
661	AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCG	720
721	TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGT	780
781	GTTAGAGGGTTTCCGCCCTT TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG	840
841	TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT	900
901	GTGGTTAATTCAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACACTCT	960
961	AGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGT	1000

รูปที่ 4.51 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต EJ1

ตารางที่ 4.23 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต EJ1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นในธนาคารยีน

ลำดับที่	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ความเหมือน (%)	Accession number
1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Al-Khrj13	99.90	KY123866.1
2	<i>Bacillus</i> sp. strain BC2-30	99.90	KY625584.1
3	<i>Bacillus</i> sp. strain BC2-28	99.90	KY625539.1
4	<i>Bacillus</i> sp. strain BC2-91'	99.90	KY621969.1
5	<i>Bacillus</i> sp. strain BC2-21	99.90	KY621944.1
6	<i>Bacillus</i> sp. strain BA1-65	99.90	KY621919.1
7	<i>Bacillus</i> sp. strain TA1-232	99.90	KY476282.1
8	<i>Bacillus</i> sp. strain TA1-222	99.90	KY476277.1
9	<i>Bacillus</i> sp. strain TA1-214	99.90	KY476274.1
10	<i>Bacillus</i> sp. strain FA2-179	99.90	KY476200.1
11	<i>Bacillus</i> sp. strain FA1-90	99.90	KY476118.1
12	<i>Bacillus</i> sp. strain JXNU3419	99.90	KU207147.1
13	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain 0037	99.90	KP236178.1
14	<i>Bacillus megaterium</i> strain TOBCMDU-1	99.90	GU048867.1
15	<i>Bacillus</i> sp. strain TBRO2	99.90	HQ443227.1
16	<i>Bacillus</i> sp. strain TA2-205	99.90	KY621857.1
17	<i>Bacillus</i> sp. strain TA2-199	99.90	KY621854.1
18	<i>Bacillus</i> sp. strain WH-R2	99.90	KJ492945.1
19	<i>Bacillus</i> sp. strain BC2-13	99.90	KY625566.1
20	<i>Bacillus</i> sp. strain ORE8	99.90	MN685255.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการศึกษาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. EJ1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. aureus*

จากผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกัน จึงได้นำเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 โดยปรับความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* ที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ส่วน *Bacillus* sp. EJ1 ให้ปรับความหนาแน่นเซลล์ที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1, 1.0, 2.0 และ 3.0 ในอาหารเหลว LB ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยมีสัดส่วนปริมาตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อแบคทีเรียตัวรองเป็น 4.9 ต่อ 0.1 มิลลิลิตร ทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน พบว่า *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.69×10^7 CFU และ 4.27×10^6 CFU ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด และยังมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4.19-4.20)

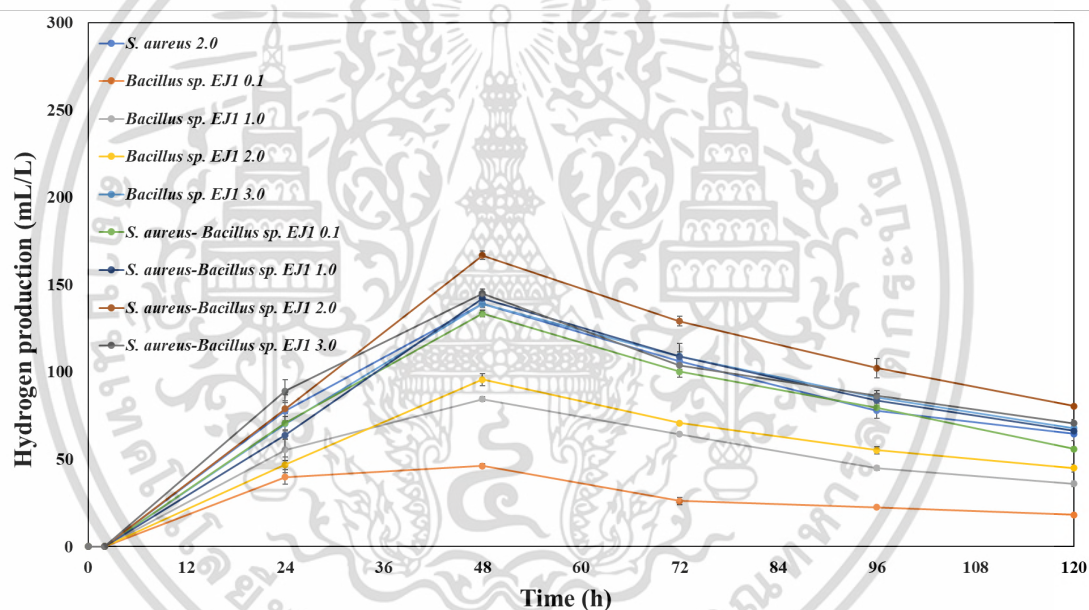
จากกราฟแสดงผลได้สูงสุดของปริมาณไฮโดรเจน (รูปที่ 4.21) และอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.22) สามารถนำมาคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนและเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 99.5% (ตารางที่ 4.10) พบว่า *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ 3.475 mL/L/h และ 0.277 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ และมีผลได้สูงสุดอยู่ที่ 166.791 mL/L และ 13.296 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$

จากการคัดเลือกจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. EJ1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *S. aureus* พบว่า *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.69×10^7 CFU และ 4.27×10^6 CFU ตามลำดับ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด ซึ่งต่างจากงานวิจัยอื่นๆ โดย Asada และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Lactobacillus delbreueckii* NBRC13953 และ *Rhodobacter sphaeroides* RV ในอาหารเลี้ยงเชื้อ gG ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยที่ค่า OD₆₀₀ 1 ยูนิต ของ *L. delbreueckii* NBRC13953 และ *R. sphaeroides* RV เท่ากับ 0.71 และ 0.39 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง พบว่าที่อัตราส่วนของค่า OD₆₀₀ ที่ 1 : 3 และ 1 : 5 มีการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด และจากงานวิจัยของ Kao และคณะ (2016) ที่ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Clostridium butyricum* และ *Rhodospseudomonas palustris* ก็ได้มีการปรับค่าความหนาแน่นของเซลล์ *C. butyricum* และ *R. Palustris* ที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.5 ในการทดลองด้วย โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.16 โมลไฮโดรเจนต่อโมลซูโครส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

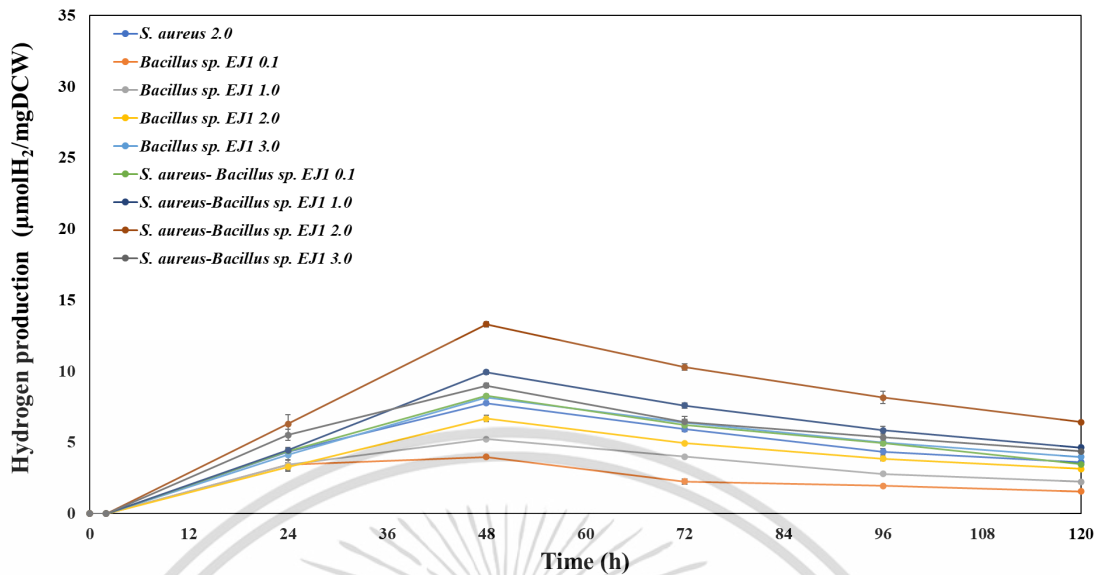
ตารางที่ 4.24 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียกว่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรที่แตกต่างกัน

สายพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร	จำนวนเซลล์ (CFU)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.0	$3.69 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^6$
<i>Bacillus</i> sp. EJ1	0.1	$2.83 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$
<i>Bacillus</i> sp. EJ1	0.5	$2.93 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6$
<i>Bacillus</i> sp. EJ1	1.0	$3.60 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$
<i>Bacillus</i> sp. EJ1	2.0	$4.27 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$
<i>Bacillus</i> sp. EJ1	3.0	$5.80 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$

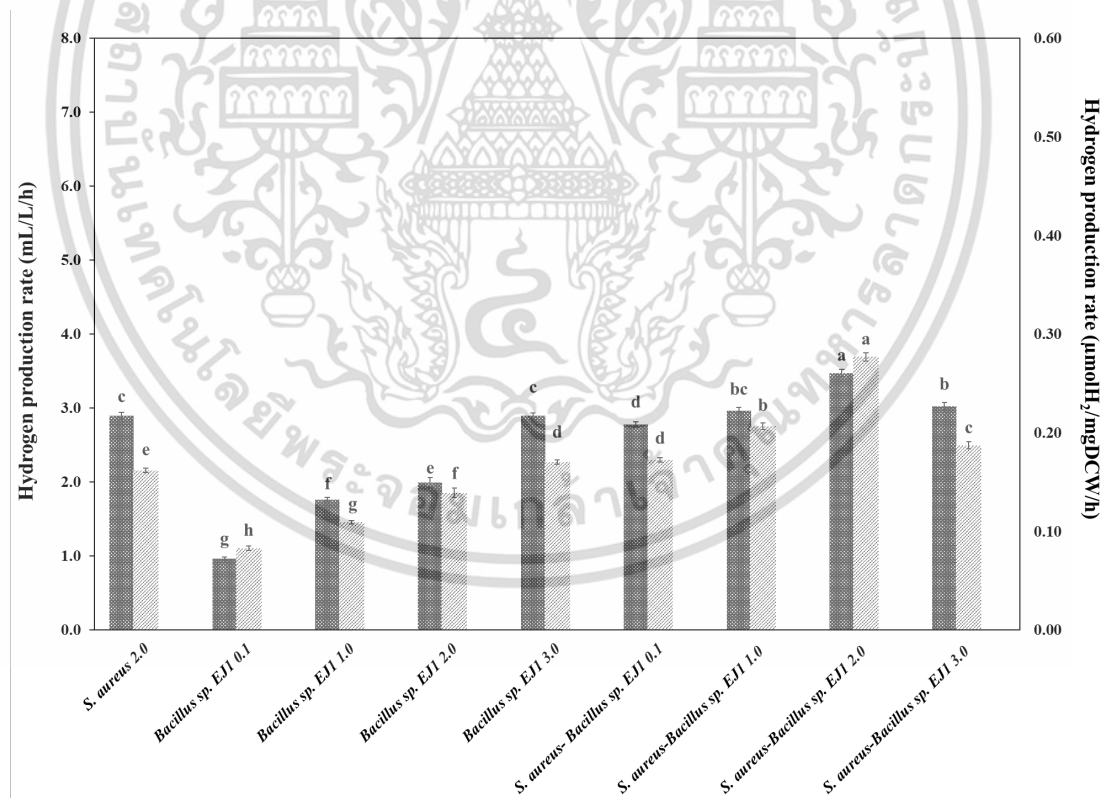


รูปที่ 4.53 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในแต่ละค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

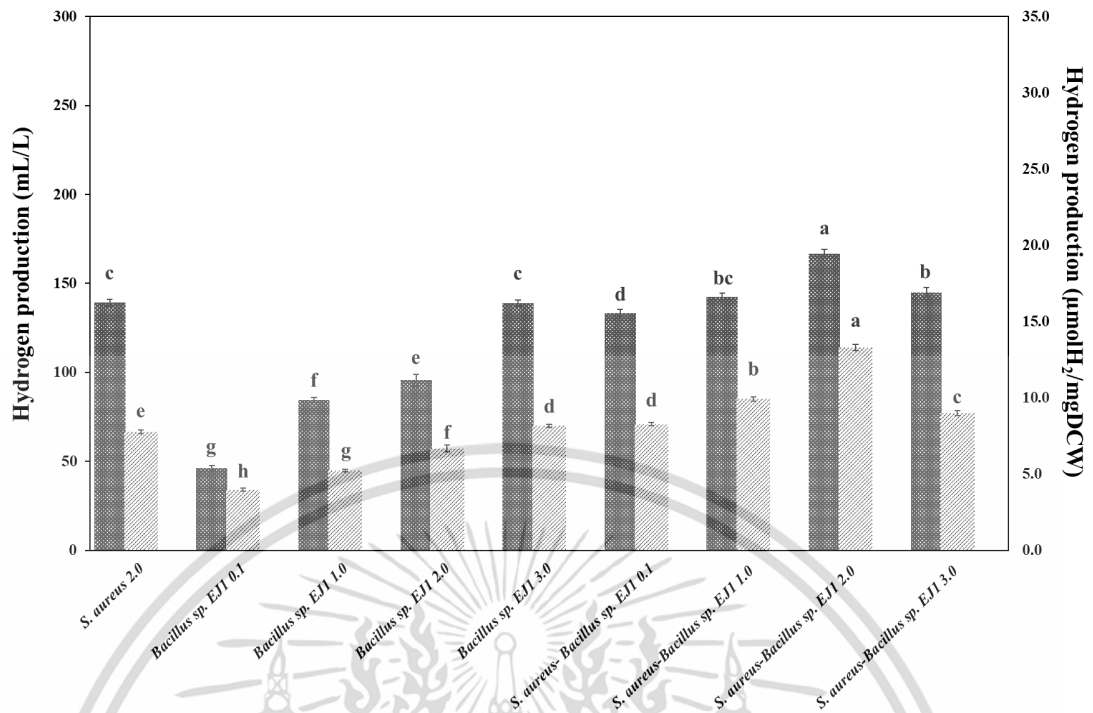


รูปที่ 4.54 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรต่างๆ



รูปที่ 4.55 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในแต่ละค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.56 การผลิตไฮโดรเจนของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ในแต่ละค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.25 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 โดยปรับความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* ที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ส่วน *Bacillus* sp. EJ1 เท่ากับ 0.1, 1.0, 2.0 และ 3.0

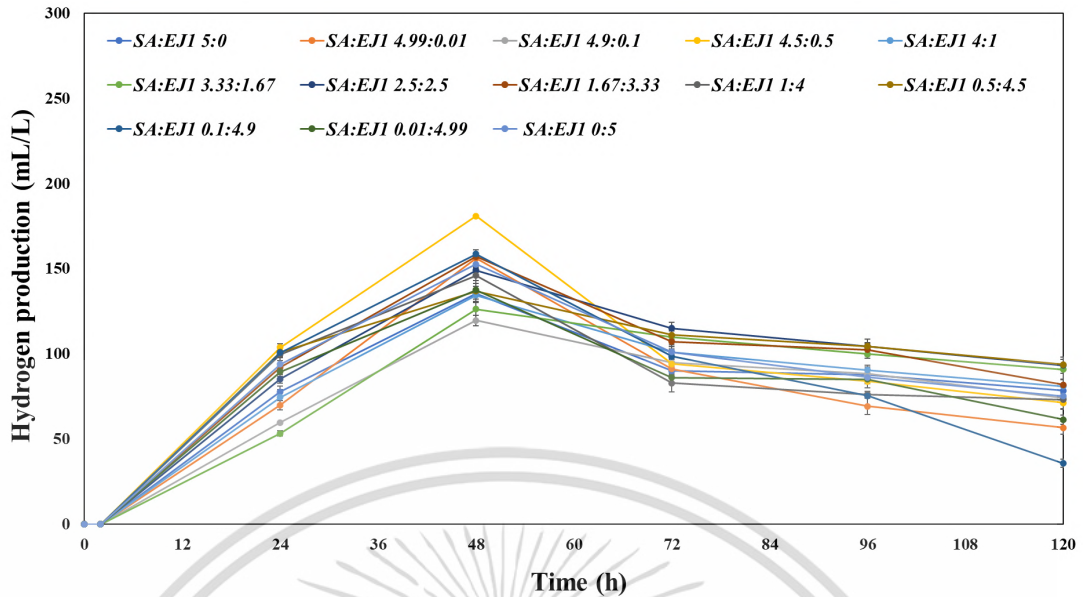
สายพันธุ์	OD ₆₀₀	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	
		mL/L/h	μmolH ₂ /mgDCW/h	mL/L	μmolH ₂ /mgDCW
<i>S. aureus</i>	2.0	2.898 ± 0.043 ^c	0.162 ± 0.002 ^e	139.115 ± 2.068 ^c	7.763 ± 0.253 ^e
<i>Bacillus</i> sp. EJ 1	0.1	0.964 ± 0.025 ^g	0.083 ± 0.002 ^h	46.261 ± 1.217 ^g	3.008 ± 0.312 ^h
<i>Bacillus</i> sp. EJ 1	1.0	1.761 ± 0.027 ^f	0.109 ± 0.002 ^g	84.536 ± 1.313 ^f	5.242 ± 0.028 ^g
<i>Bacillus</i> sp. EJ 1	2.0	1.993 ± 0.070 ^e	0.139 ± 0.005 ^f	95.671 ± 3.373 ^e	4.396 ± 0.032 ^f
<i>Bacillus</i> sp. EJ 1	3.0	2.894 ± 0.039 ^c	0.170 ± 0.002 ^d	138.913 ± 1.782 ^c	5.697 ± 0.382 ^d
<i>S. aureus</i> – <i>Bacillus</i> sp. EJ 1	0.1	2.779 ± 0.038 ^d	0.172 ± 0.002 ^d	133.407 ± 1.848 ^d	8.272 ± 0.328 ^d
<i>S. aureus</i> – <i>Bacillus</i> sp. EJ 1	1.0	2.964 ± 0.046 ^{bc}	0.207 ± 0.003 ^b	142.268 ± 2.226 ^{bc}	6.758 ± 0.323 ^b
<i>S. aureus</i> – <i>Bacillus</i> sp. EJ 1	2.0	3.475 ± 0.051 ^a	0.277 ± 0.004 ^a	166.791 ± 2.454 ^a	13.296 ± 0.194 ^a
<i>S. aureus</i> – <i>Bacillus</i> sp. EJ 1	3.0	3.020 ± 0.055 ^b	0.187 ± 0.003 ^c	144.966 ± 2.640 ^b	8.988 ± 0.144 ^c

4.7 ผลการศึกษาอัตราส่วนของปริมาตรหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1

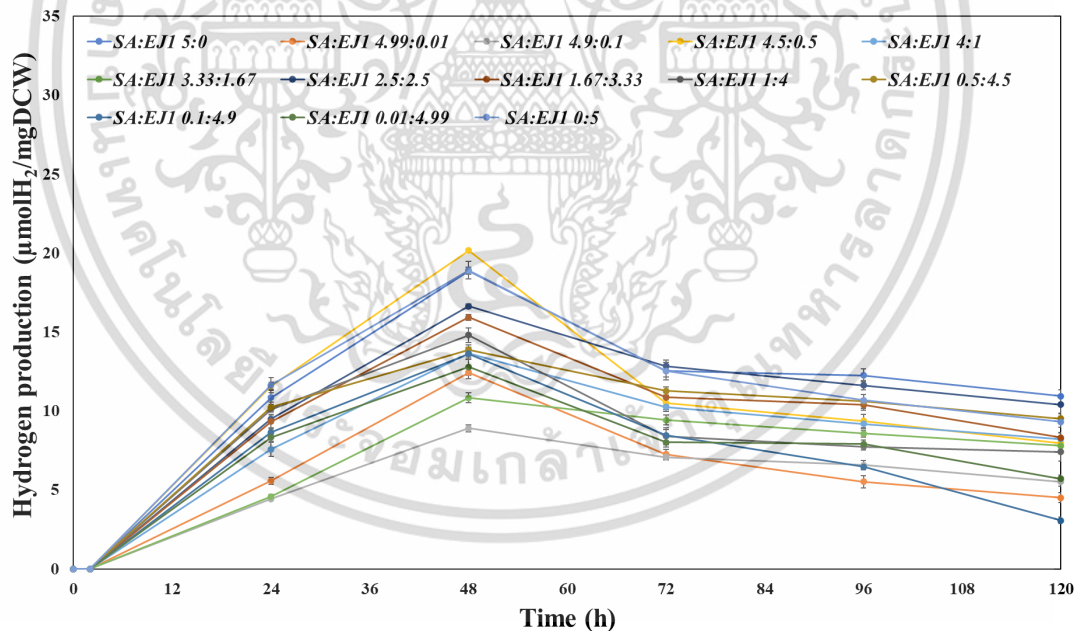
จากผลการคัดเลือกจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. EJ1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *S. aureus* จึงได้นำเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.69×10^7 CFU และ 4.27×10^6 CFU ตามลำดับ ปรับความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 ที่ค่า OD₆₀₀ ให้มีค่าเท่ากับ 2.0 โดยมีสัดส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกเป็น 4.99 : 0.01, 4.9 : 0.1, 4.5 : 0.5, 4 : 1, 3.33 : 1.67 และ 2.5 : 2.5 ทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ในอัตราส่วน 4.5 : 0.5 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 4.23 และ 4.26)

จากการนำอัตราการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.25) และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.26) เปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 99.5% พบว่า *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ในอัตราส่วน 4.5 : 0.5 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3.766 mL/L/h และ 0.525 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 180.751 mL/L และ 25.216 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ ที่ชั่วโมงที่ 48 (ตารางที่ 4.11)

งานวิจัยของ Li และ Liu (2012) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนด้วยก้านข้าวโพด โดยกระบวนการหมักของแบคทีเรียที่ชอบความร้อนด้วยการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Clostridium thermocellum* DSM 7072 และ *C. thermosaccharolyticum* DSM 869 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CM4 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยพบว่าที่อัตราส่วน (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของ *C. thermocellum* DSM 7072 และ *C. thermosaccharolyticum* DSM 869 ที่ 0.25 ต่อ 1 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดโดยอยู่ที่ 62.0 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมของก้านข้าวโพด

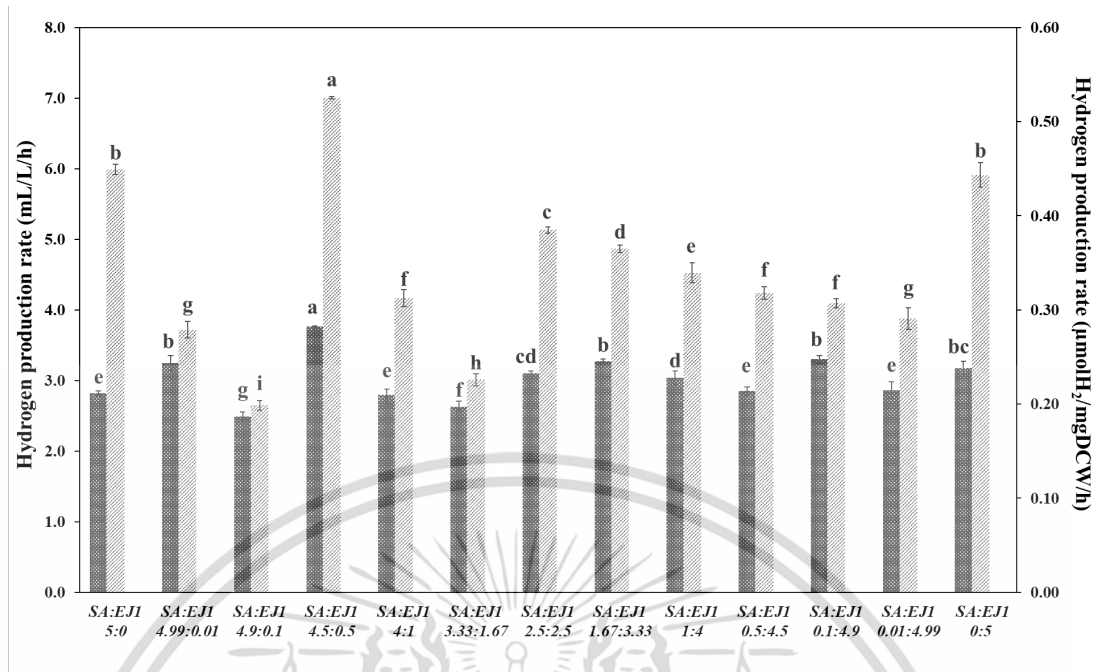


รูปที่ 4.57 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ที่อัตราส่วนต่างๆ



รูปที่ 4.58 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ที่อัตราส่วนต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.59 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ที่อัตราส่วนต่างๆ



รูปที่ 4.60 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ที่อัตราส่วนต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.26 อัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 โดยมีสัดส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตัวหลักต่อเชื้อแบคทีเรียตัวรองที่คัดเลือกเป็น 4.99 : 0.01, 4.9 : 0.1, 4.5 : 0.5, 4 : 1, 3.33 : 1.67 และ 2.5 : 2.5

อัตราส่วนปริมาตรหัวเชื้อของ <i>S. aureus</i> ต่อ <i>Bacillus</i> sp. EJ1	อัตราการผลิตไฮโดรเจน		ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	
	mL/L/h	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$	mL/L	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$
5 : 0	2.819 ± 0.030^e	0.449 ± 0.005^b	135.316 ± 1.635^e	21.575 ± 0.261^b
4.99 : 0.01	3.249 ± 0.090^b	0.279 ± 0.008^s	155.947 ± 4.906^b	13.388 ± 0.421^s
4.9 : 0.1	2.492 ± 0.056^s	0.199 ± 0.004^i	119.637 ± 3.044^f	9.537 ± 0.243^i
4.5 : 0.5	3.766 ± 0.020^a	0.525 ± 0.003^a	180.751 ± 0.434^a	25.216 ± 0.061^a
4 : 1	2.800 ± 0.070^e	0.313 ± 0.008^f	134.401 ± 3.813^e	15.000 ± 0.426^f
3.33 : 1.67	2.630 ± 0.068^f	0.245 ± 0.006^h	109.800 ± 3.548^e	9.426 ± 0.305^h
2.5 : 2.5	3.104 ± 0.025^{cd}	0.385 ± 0.003^c	148.971 ± 1.344^{cd}	18.474 ± 0.167^c
1.67 : 3.33	3.270 ± 0.032^b	0.365 ± 0.004^d	156.943 ± 1.768^b	17.516 ± 0.197^d
1 : 4	3.041 ± 0.084^d	0.339 ± 0.009^e	145.950 ± 4.609^d	16.289 ± 0.514^e
0.5 : 4.5	2.850 ± 0.052^e	0.318 ± 0.006^f	136.813 ± 2.830^e	15.269 ± 0.316^f
0.1 : 4.9	3.304 ± 0.046^b	0.307 ± 0.004^f	158.592 ± 2.522^b	14.750 ± 0.235^f
0.01 : 4.99	2.864 ± 0.100^e	0.291 ± 0.010^s	137.476 ± 5.481^e	13.948 ± 0.556^s
0 : 5	3.178 ± 0.082^{bc}	0.443 ± 0.011^b	152.554 ± 4.474^{bc}	21.283 ± 0.624^b

4.8 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1

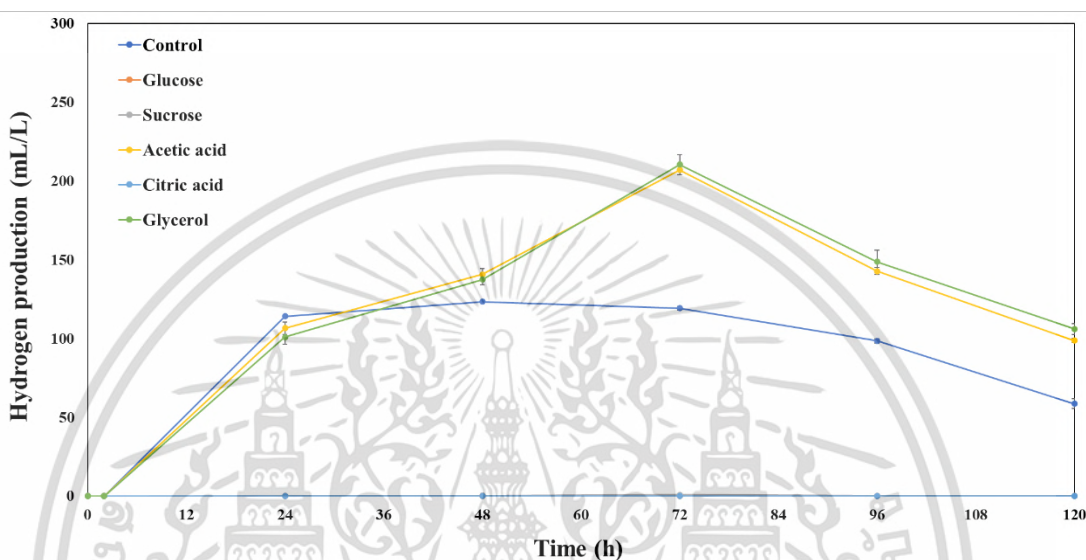
จากการนำเชื้อ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.69×10^7 CFU และ 4.27×10^6 CFU ตามลำดับ และมีสัดส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อ *S. aureus* : *Bacillus* sp. EJ 1 เป็น 4.5 : 0.5 มาใส่ในอาหาร LB ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส, กรดอะซิติก, กรดซิตริก และกลีเซอรอล ซึ่งแต่ละแหล่งคาร์บอนที่เติมเข้าไปจะมีความเข้มข้นอยู่ที่ 100 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอม/ลิตร ทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในช่วงเวลาที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอล และกรดอะซิติก สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงใกล้เคียงกัน โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดในช่วงเวลาที่ 72 และค่อยๆ ลดลงหลังจากนั้น ส่วนเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส และกรดซิตริก ไม่พบการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.27 และ 4.30)

จากการนำอัตราการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.29) และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.30) มาเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 99.5% พบว่า *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นกรดอะซิติก มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.923 mL/L/h และ 0.378 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}/\text{h}$ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 207.074 mL/L และ 27.189 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ และในอาหาร LB ที่มีกลีเซอรอลมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.876 mL/L/h และ 0.384 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}/\text{h}$ ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 210.426 mL/L และ 27.629 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ (ตารางที่ 4.12)

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอล และกรดอะซิติก สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Barbosa และคณะ (2001) ที่ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้อะซิเตต แลคเตต มาเลต และบิวทีเรตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Rhodospseudomonas* sp. ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นอะซิเตตที่ความเข้มข้น 22 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยได้ผลผลิตไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ 72.8 เปอร์เซ็นต์ และ 25.2 มิลลิลิตรไฮโดรเจน/ชั่วโมง ตามลำดับ และได้มีการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีกลีเซอรอลแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่า โดย *Clostridium butyricum* ผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่าประมาณ 1 ใน 3 และ *E. coli* น้อยกว่าประมาณครึ่งหนึ่งของผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล (Kivistö และคณะ, 2010) นอกจากนี้ ผลการทดลองนี้ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเพาะเลี้ยง

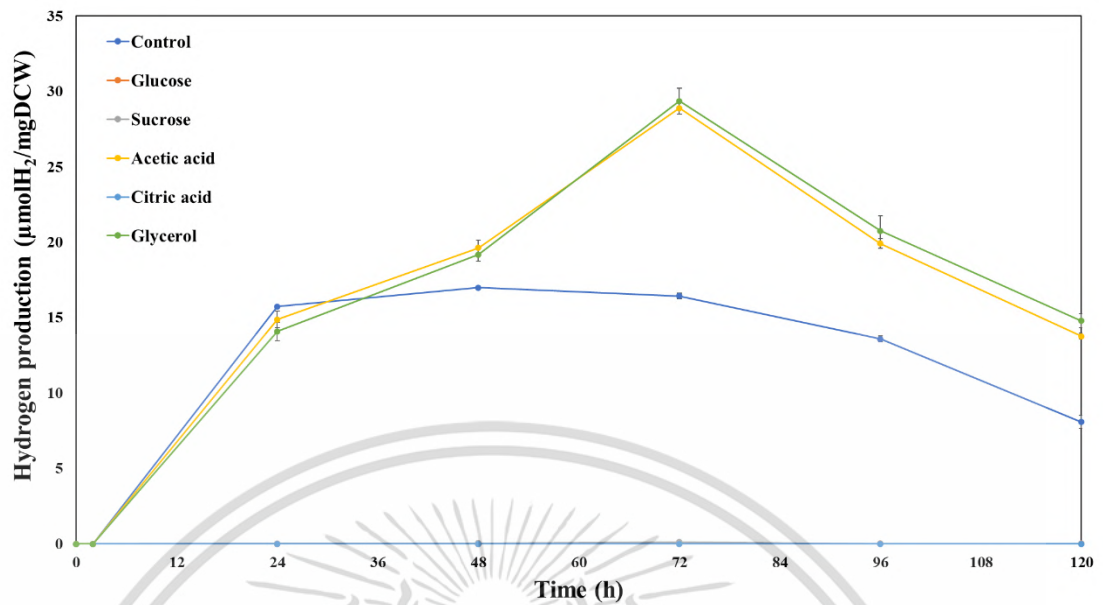
เอกสารนี้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อในอาหาร LB ที่มีตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และกรดซิตริก เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Saint-Amans และคณะ (2001) ที่ได้รายงานว่าเชื้อ *C. butyricum* ที่ใช้แหล่งคาร์บอนผสมของน้ำตาลกลูโคสและกลีเซอรอลให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว

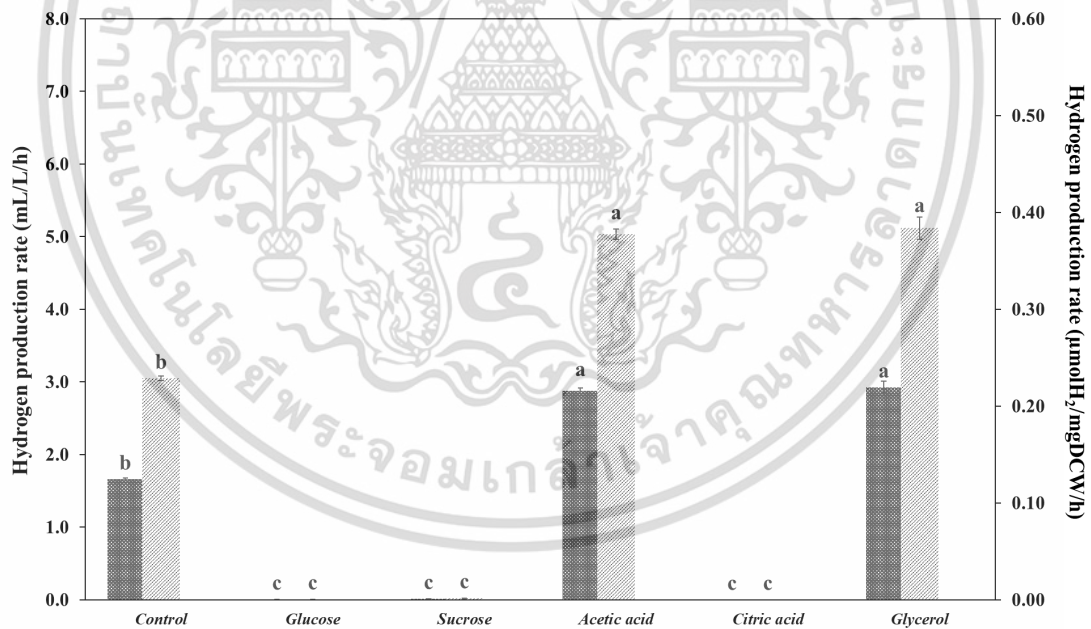


รูปที่ 4.61 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

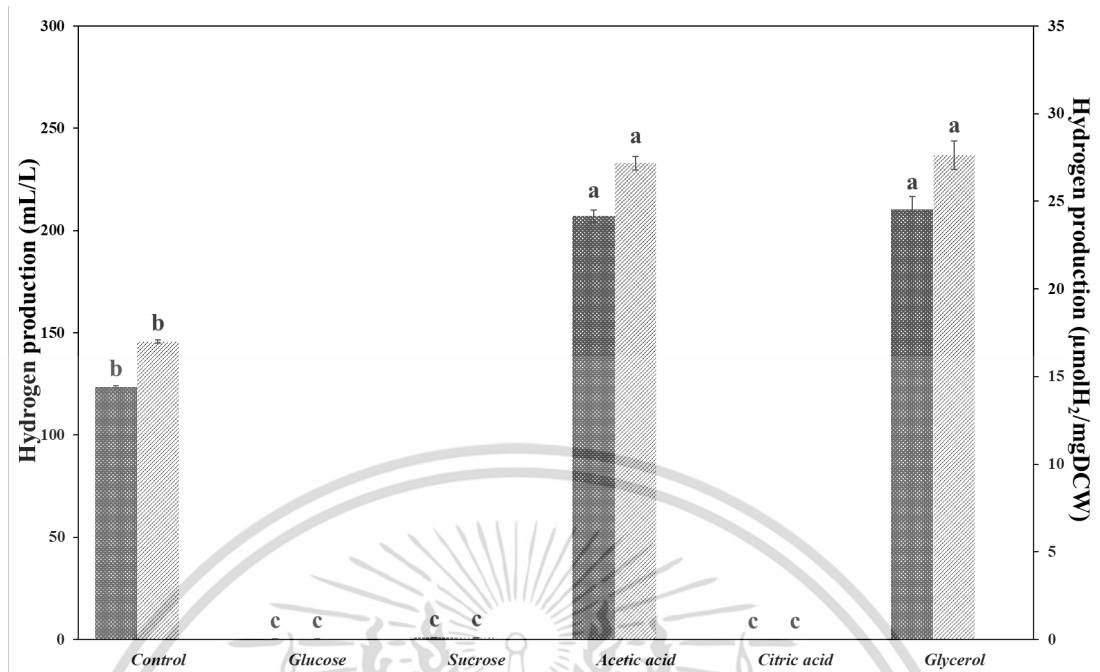


รูปที่ 4.62 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ



รูปที่ 4.63 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.64 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.27 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ในอาหาร LB ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส, กรดอะซิติก, กรดซิตริก และกลีเซอรอล ซึ่งแต่ละแหล่งคาร์บอนที่เติมเข้าไปจะมีความเข้มข้นอยู่ที่ 100 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอม/ลิตร

แหล่งคาร์บอน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน		ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	
	mL/L/h	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}/\text{h}$	mL/L	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$
Control	1.658 ± 0.017^b	0.228 ± 0.002^b	123.392 ± 0.615^b	17.002 ± 0.085^b
Glucose	0.003 ± 0.000^c	0.000 ± 0.000^c	0.234 ± 0.014^c	0.033 ± 0.002^c
Sucrose	0.012 ± 0.001^c	0.002 ± 0.000^c	0.842 ± 0.040^c	0.121 ± 0.006^c
Acetic acid	2.876 ± 0.041^a	0.378 ± 0.005^a	207.074 ± 2.958^a	27.189 ± 0.388^a
Citric acid	0.000 ± 0.000^c	0.000 ± 0.000^c	0.000 ± 0.000^c	0.000 ± 0.000^c
Glycerol	2.923 ± 0.087^a	0.384 ± 0.011^a	210.426 ± 6.228^a	27.629 ± 0.818^a

4.9 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1

จากการนำเชื้อ *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 ที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 โดยใช้สัดส่วนปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของเชื้อ *S. aureus* : *Bacillus* sp. EJ1 เป็น 4.5 : 0.5 มาเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลว LB ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เติมเข้าไปคือ กรดอะซิติก และกลีเซอรอลโดยแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิโมลาร์ ทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในช่วงเวลาที่ 2, 24, 48, 72, 96 และ 120 แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในช่วงเวลาที่ 72 และค่อยๆ ลดลงหลังจากนั้น (รูปที่ 4.31 และ 4.34)

จากการนำอัตราการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.33) และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.34) มาเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 99.5% พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3.520 mL/L/h และ 0.393 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}/\text{h}$ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 253.447 mL/L และ 28.287 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ (ตารางที่ 4.13)

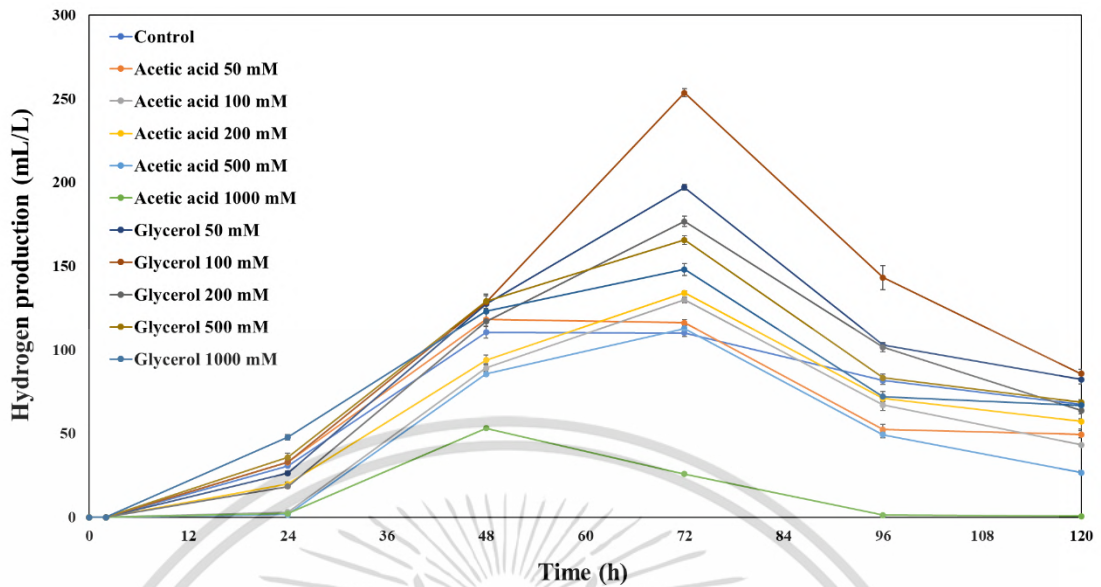
จากการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 พบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kivistö และคณะ (2010) ที่ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลโดยใช้กระบวนการหมักของแบคทีเรียที่ชอบเกลือ พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยเชื้อ *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *senegalensis* และ *H. saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum* มีผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 1.21 และ 0.58 โมลไฮโดรเจน/โมลกลีเซอรอล ตามลำดับ และจากผลการทดลองที่เมื่อใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ขึ้นไปจะทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2021) ที่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลจาก 5 กรัม/ลิตร ไปเป็น 15 กรัม/ลิตร จะทำให้การผลิตไฮโดรเจนของ *Clostridium* spp. ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลีเซอรอล โดยสิ่งที่อาจเจือปนได้แก่ เกลือ โลหะหนัก เมทานอล แอลกอฮอล์ และสบู่ อาจมีความเข้มข้นที่สูงพอที่พอยับยั้งกิจกรรมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจส่งผลให้ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนลดลงได้ และ

เอกสารนี้
ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลจะขึ้นอยู่กับว่ากลีเซอรอลที่ใช้นั้นเป็นกลีเซอรอล
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

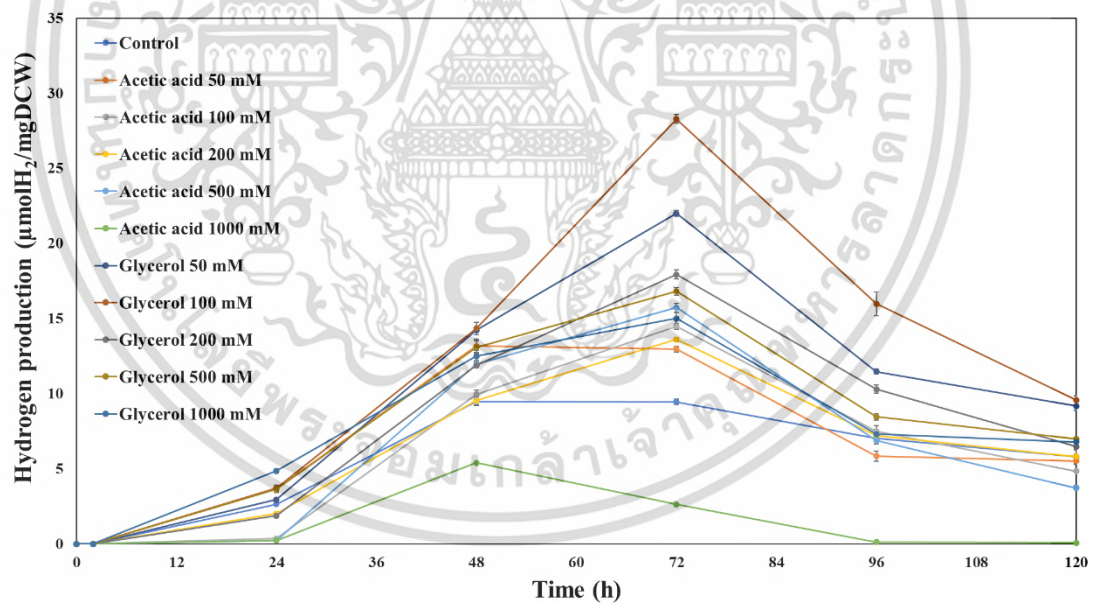
ดิบหรือกลีเซอรอลบริสุทธิ์ โดยมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น จะทำให้ผลผลิตไฮโดรเจนลดลง ในเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* (Trchounian และ Trchounian, 2015)

เมื่อนำตัวอย่างมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ และค่า pH ในชั่วโมงที่ 120 (ตารางที่ 4.14) พบว่าตัวอย่างเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีค่า OD₆₀₀ สูงที่สุดโดยอยู่ที่ 1.6593 และมีค่า pH เท่ากับ 5.9 ซึ่งลดลงจากค่า pH เริ่มต้น (pH 7.0) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kivistö และคณะ (2010) ที่ศึกษาผลกระทบของค่า pH ต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยพบว่า *H. saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum* ที่มีค่า pH สุดท้ายเท่ากับ 5.7 จากค่า pH เริ่มต้นที่ 7.4 และ *H. saccharolyticum* subsp. *senegalensis* มีค่า pH สุดท้ายเท่ากับ 6.1 จากค่า pH เริ่มต้นที่ 7.0 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ 0.4 และ 0.91 โมลไฮโดรเจน/โมลกลีเซอรอล ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

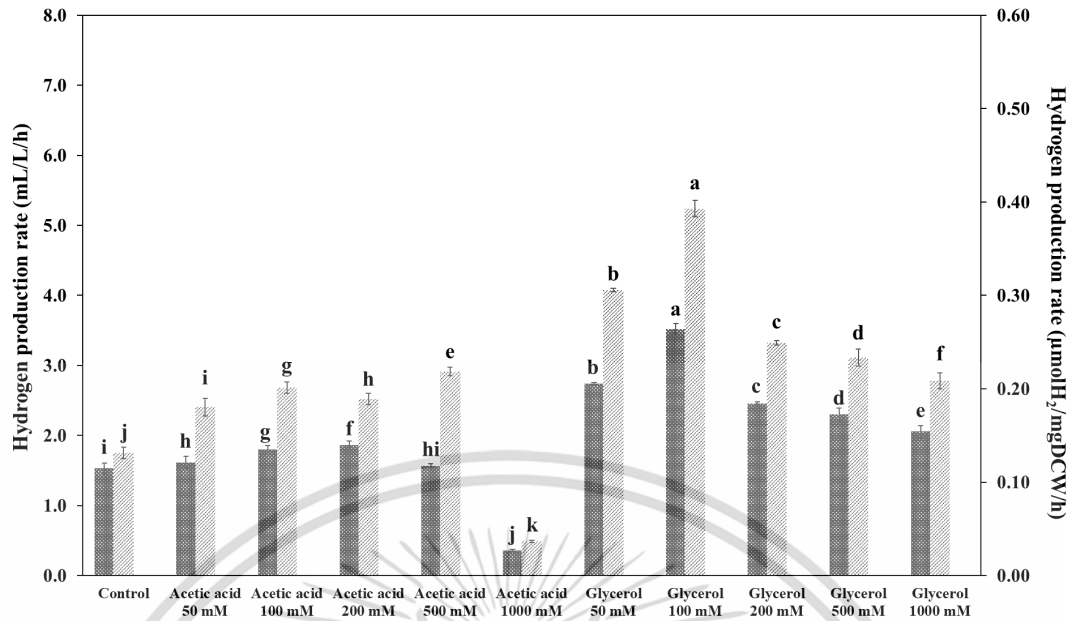


รูปที่ 4.65 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ

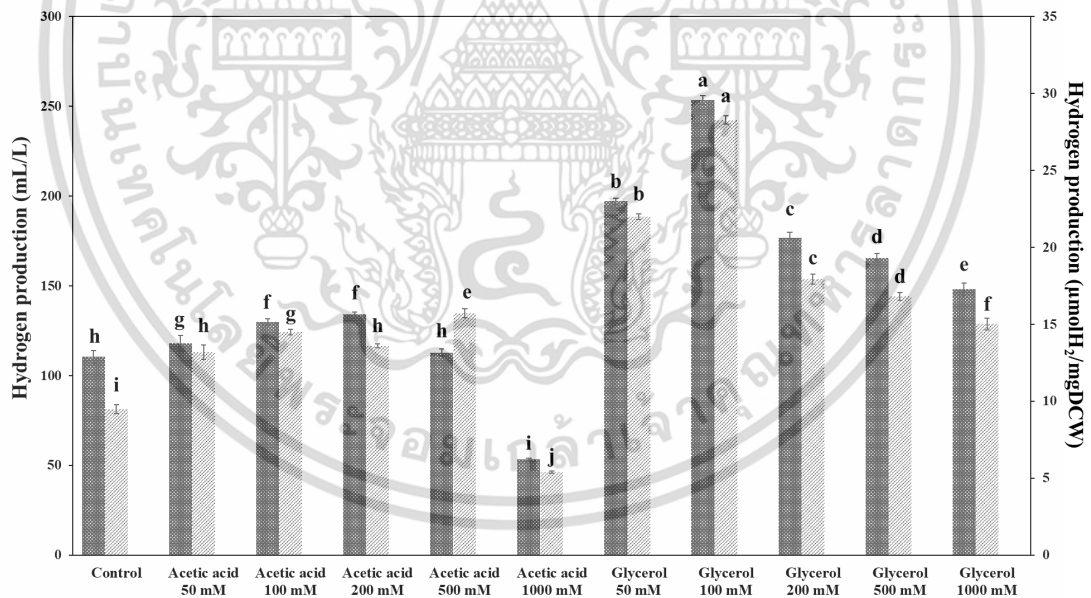


รูปที่ 4.66 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.67 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.68 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* sp. EJ 1 ในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.28 อัตราการผลิตไฮโดรเจน และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 เพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลว LB ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เติมเข้าไปคือ กรดอะซิติก และกลีเซอรอลโดยแปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิโมลาร์

แหล่งคาร์บอน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน		ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	
	mL/L/h	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$	mL/L	$\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$
Control	1.530 ± 0.029^i	0.131 ± 0.003^i	110.590 ± 3.467^h	9.494 ± 0.298^i
Acetic acid 50 mM	1.615 ± 0.026^h	0.180 ± 0.003^i	118.102 ± 4.130^g	13.181 ± 0.461^h
Acetic acid 100 mM	1.803 ± 0.024^g	0.201 ± 0.003^s	129.830 ± 1.742^f	14.490 ± 0.194^g
Acetic acid 200 mM	1.862 ± 0.019^f	0.189 ± 0.002^h	134.095 ± 1.372^h	13.605 ± 0.139^h
Acetic acid 500 mM	1.566 ± 0.028^{hi}	0.218 ± 0.004^e	112.765 ± 2.010^h	15.732 ± 0.280^e
Acetic acid 1000 mM	0.360 ± 0.007^j	0.037 ± 0.001^k	53.291 ± 0.681^i	5.407 ± 0.069^j
Glycerol 50 mM	2.738 ± 0.024^b	0.306 ± 0.003^b	197.111 ± 1.725^b	21.999 ± 0.193^b
Glycerol 100 mM	3.520 ± 0.034^a	0.393 ± 0.004^a	253.447 ± 2.447^a	28.287 ± 0.273^a
Glycerol 200 mM	2.455 ± 0.043^c	0.249 ± 0.004^c	176.767 ± 3.087^c	17.935 ± 0.313^c
Glycerol 500 mM	2.300 ± 0.036^d	0.233 ± 0.004^d	165.635 ± 2.556^d	16.806 ± 0.259^d
Glycerol 1000 mM	2.056 ± 0.050^e	0.209 ± 0.005^f	148.051 ± 3.630^e	15.021 ± 0.368^f

ตารางที่ 4.29 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อในอาหาร LB ที่มีค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่างๆและ pH ของอาหารเหลวที่ 120 ซม. ภายหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกัน

แหล่งคาร์บอน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร	ค่า pH ของอาหารเหลวที่ 120 ซม.
Control	1.2575 ± 0.1808	6.57 ± 0.16
Acetic acid 50 mM	1.4953 ± 0.0484	6.50 ± 0.14
Acetic acid 100 mM	1.5979 ± 0.1323	6.34 ± 0.09
Acetic acid 200 mM	1.6137 ± 0.1355	6.57 ± 0.12
Acetic acid 500 mM	1.6557 ± 0.0569	6.67 ± 0.06
Acetic acid 1000 mM	1.4729 ± 0.2041	6.72 ± 0.10
Glycerol 50 mM	1.4704 ± 0.0202	6.10 ± 0.18
Glycerol 100 mM	1.6593 ± 0.0859	5.90 ± 0.09
Glycerol 200 mM	1.6144 ± 0.0588	5.81 ± 0.31
Glycerol 500 mM	1.5368 ± 0.0870	5.69 ± 0.34
Glycerol 1000 mM	1.1289 ± 0.1047	5.72 ± 0.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินในคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 6 ไอโซเลต และเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากห้องปฏิบัติการจำนวน 12 ชนิด ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียทั้งแบบเพาะเลี้ยงเดี่ยวและแบบเพาะเลี้ยงร่วมกัน ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนสรุปได้ว่า

5.1.1 จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสูงกว่าไอโซเลตอื่น และพบว่าแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 2.932 mL/L/h และ 0.232 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ ตามลำดับ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 140.739 mL/L และ 11.140 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$

5.1.2 การวัดการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ในอาหารเหลว LB Basal และ M9 เพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย สรุปได้ว่า *S. aureus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเหลว LB มีอัตราเจริญจำเพาะและระยะเวลาทวีคูณสูงสุดโดยอยู่ที่ 0.2358 h^{-1} และ 2.9418 h และทำการวิเคราะห์หาผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดพบว่า *S. aureus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 2.9710 mL/L/h และ 0.1745 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ ตามลำดับ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 142.608 mL/L และ 8.377 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ ตามลำดับ

5.1.3 แบคทีเรียที่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* เป็นตัวหลักเพาะเลี้ยงร่วมกับ *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, EJ1 และ EJ9 สรุปได้ว่าเชื้อ *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ EJ 1 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 6.689 mL/L/h และ 0.498 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ ตามลำดับ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 160.545 mL/L และ 11.945 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ ตามลำดับ

5.1.4 จากการศึกษาชนิดของไอโซเลต EJ1 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ EJ1 มีความคล้ายคลึงกันกับ *Bacillus* sp. ที่ 99.90 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการเรียกไอโซเลต EJ1 ว่า *Bacillus* sp. EJ1

5.1.5 จากการศึกษาแบคทีเรียตัวรอง *Bacillus* sp. EJ1 ที่ส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน ในการเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *S. aureus* สรุปได้ว่า *Bacillus* sp. EJ1 ที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.0 สามารถผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับผูกพันไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3.475 mL/L/h และ 0.277 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ ตามลำดับ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 166.791 mL/L และ 13.296 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ ตามลำดับ

5.1.6 อัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน คือ อัตราส่วน 4.5 : 0.5 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3.766 mL/L/h และ 0.525 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ ตามลำดับ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 180.751 mL/L และ 25.216 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ ตามลำดับ

5.1.7 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 คืออะซิติก โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.876 mL/L/h และ 0.357 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ 207.074 mL/L และ 27.189 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ และกลีเซอรอล โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.923 mL/L/h และ 0.384 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 210.426 mL/L และ 27.629 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ ตามลำดับ โดยการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 72 ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ชนิด

5.1.8 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุดของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน คือ กลีเซอรอล 100 มิลลิโมลาร์ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 3.520 mL/L/h และ 0.393 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW/h}$ ตามลำดับ และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 253.447 mL/L และ 28.287 $\mu\text{molH}_2/\text{mgDCW}$ ตามลำดับ

5.1.9 จากผลการทดลองการผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus* sp. EJ1 ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่ามีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ 253.447 mL/L ซึ่งสูงขึ้นจากเดิม 180 เปอร์เซ็นต์ จากการผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงเดี่ยวของ *S. aureus* ที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเพียง 140.739 mL/L

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการศึกษาความหนาแน่นเซลล์ของ *S. aureus* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนเพื่อทราบความหนาแน่นเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนร่วมกับไอโซเลต EJ1

5.2.2 ควรทำการศึกษาผลของค่า pH เริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจน เพื่อทราบค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย

5.2.3 ควรทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสารตั้งต้นที่เป็นของเหลือทางการเกษตร เช่น ก้านหรือซังข้าวโพด ชานอ้อย และน้ำเสีย เป็นต้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตในทางอุตสาหกรรม

5.2.4 ควรทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยการตรึงเซลล์แบคทีเรีย (Immobilization) เพื่อเพิ่มความสามารภในการผลิตไฮโดรเจน โดยการตรึงเซลล์แบคทีเรียจะช่วยให้แบคทีเรียใช้พลังงานใน

การรักษาสภาพเซลล์เพื่อการอยู่รอดน้อยลง จึงทำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น และยังนำกลับมาใช้ซ้ำได้ (พัชนก และสุชัญญา, 2561)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพลังงาน กรมพัฒนาพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน. 2552. คู่มือความรู้ด้านพลังงานไฮโดรเจน. [Online]. เข้าถึงได้จาก <http://www2.dede.go.th>

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2549. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic Bacteria). [Online]. เข้าถึงได้จาก <http://thaifarmer.lib.ku.ac.th>

ณททัย มหาเทพ, บัณฑิตา เพ็ญศรี และ พุกฤษ อักกะรังสี. 2562. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากซังข้าวโพดด้วยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 3: 550-565.

รัชนิกร วันจันทิก. 2554. ก๊าซไฮโดรเจน : ความคาดหวังเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน. Burapha Sci. J. 16: 131-140

วิหวัศ แจ้งเอี่ยม. 2553. กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 1: 68-77.

สืบพงศ์ พงษ์สวัสดิ์. 2554. สถานการณ์เชื้อเพลิงฟอสซิลและศักยภาพพลังงานทดแทนในประเทศไทย. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยพาร์อีสเทอร์น. 1: 62-74.

Akhlaghi, N. and Najafpour-Darzi, G. 2020. A comprehensive review on biological hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy. 45: 22492-22512.

Allahverdiyeva, Y., Aro, E.M. and Kosourov, S.N. 2014. Recent Developments on Cyanobacteria and Green Algae for Biohydrogen Photoproduction and Its Importance in CO2 Reduction. Bioenergy Research: Advances and Applications. 367-387.

Allahverdiyeva, Y., Leino, H., Saari, L., Fewer, D.P., Shunmugan, S., Sinoven, K. and Aro, E.M. 2010. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. International Journal of Hydrogen Energy. 35: 1117-1127.

Anastasios Melis and Thomas Happe. 2001. Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy. Plant Physiology, November 2001, Vol. 127, pp. 740-748.

An, D., Li, Q., Wang, X., Yang, H. and Guo, L. 2014. Characterization on hydrogen production performance of a newly isolated Clostridium beijerinckii YA001 using xylose. International Journal of Hydrogen Energy. 39: 19928-19936.

Asada, Y., Tokumoto, M., Aihara, Y., Oku, M., Ishimi, K., Wakayama, T., Miyake, J., Tomiyama, M. and Kohno, H. 2006. Hydrogen production by co-cultures of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับงานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lactobacillus and a photosynthetic bacterium, Rhodobacter sphaeroides RV. International Journal of Hydrogen Energy. 31: 1509-1513.
- Asao, M. and Madigan, M.T. 2010. Taxonomy, phylogeny, and ecology of the heliobacteria. Photosynth Res. 104: 103-111
- Asimov, I. 1968. Photosynthesis. New York. Basic Books.
- Barbosa, M.J., Rocha, J.M., Tramper, J. and Wijffels, R.H. 2001. Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. Journal of Biotechnology. 85: 25-33.
- Batan, L., Quinn, J. Willson, B. and Bradley, T. 2010. Net energy and greenhouse gas emission evaluation of biodiesel derived from microalgae. Environmental Science Technology 44: 7975-7980.
- Bao, M., Su, H. and Tan, T. 2012. Biohydrogen Production by Dark Fermentation of Starch Using Mixed Bacterial Cultures of Bacillus sp and Brevumdimonas sp. Energy Fuels. 26: 5872-5878.
- Betts, G. 2006. Other spoilage bacteria. Food Spoilage Microorganisms. 668-693.
- Biniwale, R.B., Mizuno, A. and Ichikawa, M. 2004. Hydrogen production by reforming of iso-octane using spray-pulsed injection and effect of non-thermal plasma. Applied Catalysis A: General. 276: 169-177.
- Bromberg, L., Cohn, D.R. and Rabinovich. 1997. Plasma reformer-fuel cell system for decentralized power applications. International Journal of Hydrogen Energy. 22: 83-94.
- Bromberg, L., Cohn, D.R., Rabinovich, A. and Alexeev, N. 1999. Plasma catalytic reforming of methane. 24: 1131-1137.
- Chang, J., Chou, C., Ho, C., Chen, W., Lay, J. and Huang, C. 2008. Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy. 33: 5137-5146.
- Chen, H.L., Lee, H.M., Chen, S.H., Chao, Y. and Chang, M.B. 2008. Review of plasma catalysis on hydrocarbon reforming for hydrogen production—Interaction, integration, and prospects. Applied Catalysis B: Environmental. 85: 1-9.
- Chen, H., Yin, Y. and Wang, J. 2021. Comparison of fermentative hydrogen production from glycerol using immobilized and suspended mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy. 46: 8986-8994.

เอกสารนี้เป็นเอกสาร Journal of Hydrogen Energy. 46: 8986-8994. ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Clarens, A.F., Resurreccion, E.P., White, M.A. and Colosi, L.M. 2010. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental Science Technology*. 44: 1813–1819.
- Corbel, S., Mougin, C. and Bouaicha, N. 2014. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems. phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96: 1–15.
- Craven, S.E. 1988. Increased Sporulation of *Clostridium perfringens* in a Medium Prepared with the Prereduced Anaerobically Sterilized Technique or with Carbon Dioxide or Carbonate. *Journal of Food Protection*. 51: 700-706.
- Das, D. and Veziroglu, T.N. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. 26: 13-28.
- Demirbaş, A. 2001. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 42: 1357-1378.
- Elbing, K. and Brent, R. 2019. Recipes and tools for culture of *Escherichia coli*. *Curr Protoc Mol Biol*. 125: e83.
- Falco, M.D., Marrelli, L. and Iaquaniello, G. 2011. *Membrane Reactors for Hydrogen Production Processes*. London. Springer-Verlag.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Hintz, W., Gil, G.H. and Almadidy, A. 2005. Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylace- tonicum* ATCC 27021. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 855-862.
- Flamos, A., Georgallis, P.G., Doukas, H. and Psarras, J. 2011. Using Biomass to Achieve European Union Energy Targets—A Review of Biomass Status, Potential, and Supporting Policies. *International Journal of Green Energy*. 8: 411-128.
- Fremaux, S., Beheshti, S.M., Ghassemi, H. and Shahsavan-Markadeh, R. 2015. An experimental study on hydrogen-rich gas production via steam gasification of biomass in a research-scale fluidized bed. *Energy Conversion and Management*. 91: 427-432.
- Frigaard, N.U. 2016. Biotechnology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 156: 139-154.
- Funk, J.E. 2001. Thermochemical hydrogen production: past and present. *International Journal of Hydrogen Energy*. 26: 185-190.

เอกสารนี้เป็นเอกสาร International Journal of Hydrogen Energy. 26: 185-190. หน้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Garcia Costas, A.M., Tsukatani, Y., Rijpstra, W., Schouten, S. Welander, P.V., Summons, R.E. and Bryant, D.A. 2012. Identification of the Bacteriochlorophylls, Carotenoids, Quinones, Lipids, and Hopanoids of “Candidatus Chloracidobacterium thermophilum”. *Journal of Bacteriology*. Volume 194.
- George, D.M., Vincent, A.S. and Mackey, H.R. 2020. An overview of anoxygenic phototrophic bacteria and their applications in environmental biotechnology for sustainable Resource recovery. *Biotechnology Reports*. 28: e00563
- Ghirardi ML, Zhang L, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E, Melis A. 2000. Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends Biotechnol* 18: 506–511.
- Ghosh, S. Dairkee, U. K., Chowdhury, R. and Bhattacharya, P. 2017. Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB) – A review. *Energy Conversion and Management*. 141: 299-314.
- Hanada, S. 2014. The Phylum Chloroflexi, the Family *Chloroflexaceae*, and the Related Phototrophic Families *Oscillochloridaceae* and *Roseiflexaceae*. Berlin. Springer.
- Hammer, Th., Kappes, Th. and Baldauf, M. 2004. Plasma catalytic hybrid processes: gas discharge initiation and plasma activation of catalytic processes. *Catalysis Today*. 89: 5-14.
- Holladay, J.D., Hu, J., King, D.L. and Wang, Y. 2009. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today* 139; 244–260.
- Imhoff, J.F. 2008. Systematics of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. Dordrecht. Springer.
- Jagannathan, B. and Golbeck, J.H. 2009. Photosynthesis: Microbial. *Biochemistry & Molecular Biology*. 3: 325-341.
- Kadariya, J., Smith, T.C. and Thapaliya, D. 2014. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*. Volume 2014.
- Kapdan, I. K. and Kargi, F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 569-582.
- Kao, P.M., Hsu, B.M., Huang, K.H., Tao, C.W., Chang, C.M. and Ji, W.T. 2014. Biohydrogen production by immobilized co-culture of *Clostridium butyricum*

and *Rhodospseudomonas palustris*. *Energy Procedia* 61: 834–837

เอกสารนี้เป็นเอกสารและ *Rhodospseudomonas palustris*. Energy Procedia 61: 834–837 โยชนด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kim, B.H. and Gaad, G.M. 2008. Bacterial Physiology and Metabolism. New York. Cambridge.
- Kim, M.S., Beak, J.S. and Lee, J.K. 2006. Comparison of H₂ accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. International Journal of Hydrogen Energy. 31: 121-127.
- Kivistö, A., Santala, V. and Karp, M. 2010. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria. Bioresource Technology. 101: 8671-8677.
- Koni, T., Rusman, Hanim, C. and Zuprizal. 2017. Effect of pH and Temperature on *Bacillus subtilis* FNCC 0059 Oxalate Decarboxylase Activity. 20: 436-441.
- Kotay, S.M. and Das, D. 2010. Microbial hydrogen production from sewage sludge bioaugmented with a constructed microbial consortium. International Journal of Hydrogen Energy. 35: 10653-10659.
- Lay, J., Li, Y. and Noike, T. 1997. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. Water Research. 31: 1518-1524.
- Lessard, J. 2013. Growth Media for *E. coli*. Methods in Enzymology. 533: 181-9.
- Levin, D., Pitt, L. and Love, M. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. International Journal of Hydrogen Energy. 29: 173-185.
- Li, Q. and Liu, C.Z. 2012. Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste. International Journal of Hydrogen Energy. 37: 10648-10654.
- Liu, D. 2008. Bio-hydrogen Production by Dark Fermentation from Organic Wastes and Residues. Doctor of Philosophy. , Environmental Engineering. Technical University of Denmark.
- Liu, S., Zhu, J., Chen, M., Xin, W., Yang, Z. and Kong, L. 2014. Hydrogen production via catalytic pyrolysis of biomass in a two-stage fixed bed reactor system. International Journal of Hydrogen Energy. 39: 13128-13135.
- Liu, Y., Yu, P. Song, X. and Qu, Y. 2008. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium*
- เอกสารนี้เป็นเอกสารของคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

thermosaccharolyticum GD17. international journal of hydrogen energy. 33: 2927-2933.

Liu, B.F., Jin, Y.R., Cui, Q.F., Xie, G.J., Wu, Y.N. and Ren, N.Q. 2015. Photo-fermentation hydrogen production by *Rhodospseudomonas* sp. nov. strain A7 isolated from the sludge in a bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy. 40: 8661-8668.

Lubitz, W. and Tumas, B. 2007. Hydrogen: An Overview. Chemical Reviews. 107: 3900-3903.

Madigan, T.M. and Jung, D.O. 2009. An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. Advances in Photosynthesis and Respiration. 28: 1-15.

Mazumder, P. Nath, D., Kumar, A., Gupta, K., Saikia, D. and Mandal, M. 2020. Dark Fermentative Hydrogen Production from Lignocellulosic Agro-waste by a Newly Isolated Bacteria *Staphylococcus Epidermidis* B-6. Singapore. Springer.

Melis, A. and Happe, T. 2001. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. Plant Physiol. 127: 740-748.

Miyake, J., Mao, X.Y. and Kawamura, S. 1984. Photoproduction of Hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. J. Ferment. Technol. 62: 531-535.

McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresource Technology. 83: 37-46.

Muradov, N.Z. 1993. How to produce hydrogen from fossil fuels without CO₂ emission. International Journal of Hydrogen Energy. 18: 211-215.

Muradov, N. 2001. Catalysis of methane decomposition over elemental carbon. Catalysis Communications. 2: 89-94.

Naresh, S., Kunasundari, B., Nagoor Gunny, A., Teoh, Y. P., Shuit, S. H., Ng, Q. H. and Hoo, P. Y. 2019. Isolation and Partial Characterisation of Thermophilic Cellulolytic Bacteria from North Malaysian Tropical Mangrove Soil. Tropical Life Sciences Research. 30: 123-147.

Nath, K., Kumar, A. and Das, D. 2006. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. Can J

เอกสารนี้เป็นเอกสาร Microbiol. 52: 525-532 งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ni, M., Leung, M. and Sumathy, K. 2006. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology*. 87: 461-472.
- Nicholson, J.A.M., Stolz, J.F. and Pierson, B.K. 1987. Structure of a microbial mat at Great Sippewissett Marsh, Cape Cod, Massachusetts. *FEMS Microbiology Letters*. 45: 343-364.
- Nikolaidis, P. and Poullikas, A. 2017. A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 67: 597-611.
- Norbeck, J., Bowden, J., Tabbara, B., Montano, M., Durbin, T. and Heffel, J. 1996. *Hydrogen Fuel for Surface Transportation*. SAE International.
- Nunez, C. 2019. What is global warming, explained. National Geographic. [Online]. <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/global-warming-overview>
- Pachapur, V.L., Sarma, S.J., Brar, S.K., Le, Bihan, Y., Buelna, G., Verma, M. 2015. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology* 193: 297-306.
- Paulmier, T. and Fulcheri, L. 2005. Use of non-thermal plasma for hydrocarbon reforming. *Chemical Engineering Journal*. 106: 59-71.
- Panwar, N.L., Kaushik, S.C. and Kothari, S. 2011. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15: 1513-1524.
- Patel, S., Kumar, P., Mehariya, S. Purohit, H.J., Lee, J.K. and Kalia, V.C. 2014. Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. *international journal of hydrogen energy* 39: 14663-14668.
- Patel, S., Purohit, H. and Kalia, V. 2010. Dark fermentative hydrogen production by defined mixed microbial cultures immobilized on ligno-cellulosic waste materials. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35: 10674-10681.
- Perera, F. 2017. Multiple Threats to Child Health from Fossil Fuel Combustion: Impacts of Air Pollution and Climate Change. *Environmental Health Perspectives*. 125: 141-148
- Pirani, S. 2018. *Burning Up: A Global History of Fossil Fuel Consumption*. London. Pluto Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสาร Pluto Press. ทรัพยากรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Puhm, M., Ainelo, H. Kivisaar, M. and Teras, R. 2022. Tryptone in Growth Media Enhances *Pseudomonas putida* Biofilm. *Microorganisms*. 10: 618.
- Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K. and Soucaille, P. 2001. Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures. *Journal of Bacteriology*. 183: 48-54.
- Schröder, C., Selig, M. and Schönheit, P. 1994. Glucose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway. *Archives of Microbiology*. 161: 460-470.
- Sekiguchi, H. and Mori, Y. 2003. Steam plasma reforming using microwave discharge. *Thin Solid Films*. 435: 44-48
- Seppala, J.J., Puhakka, J.A., Yli-Harja, O. Karp, M.T. and Santala, V. 2011. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and co-cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36: 10701-10708.
- Steinberg, M. 1999. Fossil fuel decarbonization technology for mitigating global warming. *International Journal of Hydrogen Energy*. 24 771-777.
- Steinberg, M. and Cheng, H.C. 1989. Modern and prospective technologies for hydrogen production from fossil fuels. *International Journal of Hydrogen Energy*. 14: 797-820.
- Stephenson, A.L., Kazamia, E., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A. and Smith, A.G. 2010. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: a comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. *Energy Fuels* 24: 4062-4077.
- Takagi, D., Okamura, S., Tanaka, K., Ikenaga, N., Iwashima, M., Haghparast, S. M. A., Tanaka, N. and Miyake, J. 2016. Characterization of hydrogen production by the co-culture of dark-fermentative and photosynthetic bacteria. *Res Chem Intermed* (2016) 42: 7713-7722.
- Takaichi, S. 1999. Carotenoids and Carotenogenesis in Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. 8: 39-69.
- Tank, M. and Bryant, D.A. 2015. *Chloracidobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov.: an anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacte

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. ไม่ว่ากรณีใดๆ ที่ 65: 1426-1430. ให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tao Y., Chen Y., Wu Y., He Y. and Zhou Z. 2007. High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo- fermentation of sucrose. *Int J Hydrogen Energy* 32: 200-206.
- Thrash, J.C., Coates, J.D. 2010. *Phylum XVII. Acidobacteria phyl. nov.* New York. Springer.
- Trchounian, K. and Trchounian, A. 2015. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: An overview and perspectives. *Applied Energy*. 156: 174-184.
- Vatsala, T.M., Raj, S.M. and Manimaran, A. 2008. A pilot-scale study of biohydrogen production from distillery effluent using defined bacterial co-culture. *international journal of hydrogen energy*. 33: 5404-5415.
- Wang, A., Gao, L. and Ren, N. 2009. Bio-hydrogen production from cellulose by sequential co-culture of cellulosic hydrogen bacteria of *Enterococcus gallinarum* G1 and *Ethanoigenens harbinense* B49. *Biotechnol Lett*. 31: 1321–1326.
- Wang, Y. and Pan, X. 2014. Bacteria: *Proteus*. *Encyclopedia of Food Safety*. 1: 486-489.
- Wang, Z., He, T., Qin, J., Wu, J., Li, J., Zi, Z., Liu, G., Wu, J. and Sun, L. 2015. Gasification of biomass with oxygen-enriched air in a pilot scale two-stage gasifier. *Fuel*. 150: 386-393.
- Zahan, K.A., Nordin, K., Mustapha, M. and Zairi, M. 2015. Effect of Incubation Temperature on Growth of *Acetobacter xylinum* 0416 and Bacterial Cellulose Production. *Applied Mechanics and Materials*. 815: 3-8.
- Zeidan, A., Rådström, P. and Niel. E.W. 2010. Stable coexistence of two *Caldicellulosiruptor* species in a de novo constructed hydrogenproducing co-culture. *Microbial Cell Factories*. 9: 102.

ภาคผนวก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบอาหาร Luria Bertani (LB) (Lessard, 2013)

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร M9 (Elbing และ Brent, 2020)

Glucose	2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	6	กรัม
KH ₂ PO ₄	3	กรัม
NH ₄ Cl	1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
MgCl	2	กรัม
CaCl ₂	0.1	mM

ส่วนประกอบอาหาร Basal (Naresh และคณะ, 2019)

KH ₂ PO ₄	1.36	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.20	กรัม
Nacl	0.20	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.00	กรัม
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01	กรัม
CMC	3.00	กรัม
Yeast Extract	1.00	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเทใส่ขวดเก็บสารเคมี (Duran) แล้วปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA (TBE)

การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE 5 เท่า

ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris-base) (ความเข้มข้น 0.45 โมลาร์)	54	กรัม
กรดบอริก (Boric acid) (ความเข้มข้น 0.45 โมลาร์)	27.5	กรัม
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) (ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์)	20	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายและปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า

เมื่อต้องการใช้บัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ในการเตรียมเจลสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เตรียมได้จาก Stock บัฟเฟอร์ TBE 5 เท่า 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1) นำพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ได้จากการทดลอง มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนในหน่วยเปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจน (%H₂) คิดเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาร์กอนเป็นสารมาตรฐาน ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจน (\%H}_2\text{)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลอง} \times 4\%}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน}}$$

2) นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยเปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจน มาเปรียบเทียบกับ ปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร โดยคิดเทียบจากพื้นที่ของช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) ที่ใช้ในการทดลอง เช่น ปริมาตรของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ 100 มิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตรของไฮโดรเจน)} = \frac{\text{พื้นที่ของช่องว่างเหนือของเหลว} \times \text{เปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจน}}{100 \text{ มิลลิลิตร}}$$

3) นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาคิดเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยง 1 ลิตรหรือ 1,000 มิลลิลิตร จะได้ปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตร (mLH₂/L)

4) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตรที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมง จะได้หน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง (mLH₂/L/h)



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาว ชุติกาญจน์ สมสิน รหัสนักศึกษา 62050586
นางสาว วลัยพร พุดซ้อน รหัสนักศึกษา 62050648

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา
ประยุกต์ ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรีย
ชื่อภาษาอังกฤษ Optimization of Hydrogen Production from Bacterial Co-cultivation
ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความ
ซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจาก
เล่มโครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว
โปรแกรมอักขรวิสุทธิ 0.82 %

ลงชื่อ.....**ชุติกาญจน์ สมสิน**.....

(นางสาวชุติกาญจน์ สมสิน)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....**วลัยพร พุดซ้อน**.....

(นางสาววลัยพร พุดซ้อน)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษได้ตรวจสอบโครงการ
พิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์
จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....**สรัญญา พันธุ์พฤษย์**.....

(รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษย์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้