



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้
จากนาข้าวของประเทศไทย

Biohydrogen Production by Microalgae Isolated from
the Rice Paddle Field in Thailand

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ
ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๗
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ การผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 399,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2557

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวเป็นแหล่งพลังงานหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนนี้เป็นการนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ในการศึกษาครั้งนี้ ได้คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจำนวน 59 ไอโซเลทจากแหล่งดินและแหล่งน้ำในนาข้าวของประเทศไทย เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์พบว่าสามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ได้ 9 ไอโซเลท และสาหร่ายสีเขียวที่บริสุทธิ์ได้ 9 ไอโซเลทเช่นกัน ในบรรดาไอโซเลททั้งหมด ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวไอโซเลท AngS1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 389.630 ± 72.084 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาบ่มในอาหาร BG11₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคส แมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต และเหล็กไอออน คือ ความเข้มข้น 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร 3 มิลลิโมลาร์ และ 20 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 มีการสะสมไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ $4,174.364 \pm 278.324$ นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มในอาหารที่เหมาะสมเป็นเวลา 11 วัน

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน, จุลสาหร่าย, นาข้าว

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

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

ABSTRACT

Hydrogen produced by cyanobacteria and green algae is a very interesting energy carrier because it is produced by a photosynthetic pathway using sunlight as an energy source. In this study, 59 cyanobacterial and green algal strains were isolated from soil and water sources of rice paddle field in Thailand. Out of them, 9 cyanobacterial isolates and 9 green algal isolates were purified. Among them, unicellular cyanobacterial isolate AngS1 showed the highest H₂ production rate. Its highest H₂ production rate of 389.630 ± 72.084 nmolH₂/mgchl/h was found in cells grown in BG11 for 1 week followed by incubating cells in BG11₀ for 24 hours and adaptation under dark anaerobic condition for 2 hours. The optimal concentrations of glucose, MgSO₄·7H₂O and Fe³⁺ for H₂ production rate were 0.189 mmolC/L, 3 mM, and 20 μM, respectively. The highest H₂ accumulation of $4,174.364 \pm 278.324$ nmolH₂/mgchl was obtained when incubating cells in optimal medium for 11 days.

Keywords: Hydrogen production, Microalgae, Rice field

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย สามารถดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับ ทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี ๒๕๕๗ คณะผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ต้องขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาตรี โท และ เอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำวิจัย จนโครงการนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ไฮโดรเจน	4
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	5
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี	5
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า	6
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส	7
2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่าย	10
2.3.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	10
2.3.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย	12
2.4 สาหร่ายสีเขียว	14
2.5 ไซยาโนแบคทีเรีย	14
2.6 การแพร่กระจายและแหล่งที่อยู่ของสาหร่าย	15
2.7 การคัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	16
2.7.1 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากธรรมชาติ	16
2.7.2 เทคนิคของการทำให้บริสุทธิ์	17
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	19
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	19
3.1.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในงานวิจัย	19
3.1.2 สาหร่ายสีเขียวที่นำมาใช้ในงานวิจัย	19
3.2 สารเคมี	19
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	19
3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	20
3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์	20
3.2.4 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน	20
3.3 อุปกรณ์	20
3.4 วิธีการคัดแยกเชื้อและทดสอบความบริสุทธิ์	21
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	21
3.6 วิธีการวัดการเจริญเติบโต	22
3.7 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์	22
3.8 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจน	22
3.9 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจน	23
3.10 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากและผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน	23
3.11 วิธีการศึกษาผลของแหล่งอาหารและความเข้มข้นของแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจน	24
3.12 วิธีการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	24
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายและผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากนาข้าวในประเทศไทย	25
4.2 ผลการคัดเลือกไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง	30
4.3 ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนในไชยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1	32
4.4 ผลของระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนในไชยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1	33
4.5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนในไชยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1	34

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1	36
4.7 ผลของความเข้มข้นของเหล็กไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1	37
4.8 ผลของสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1	38
4.9 ผลของสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนในระยะยาวของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1	39
บทที่ 5 สรุปการทดลอง	41
บรรณานุกรม	44
ภาคผนวก	48
ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย	50

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย	18
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์	23
4.1 จำนวนตัวอย่างสาหร่ายแบบสุ่มจากแหล่งดินและแหล่งน้ำบริเวณนาข้าว 7 จังหวัดในประเทศไทย คือ ชัยนาท นครราชสีมา นครสวรรค์ ปทุมธานี มหาสารคาม สิงห์บุรี และ อ่างทอง	25
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท	26
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 9 ไอโซเลท	28
4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท โดยบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ในอาหาร BG11 และ BG11 ₀	31
4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 9 ไอโซเลท โดยบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ในอาหาร BG11 และ BG11 ₀	31

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า	7
2.2 กลไกการทำงานในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีโฟโตอิเล็กโทรเคมีคอลตั้งแต่ระดับของห้องปฏิบัติการจนถึงกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม	8
2.3 กลไกของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสง	9
2.4 กลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	10
2.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	11
2.6 กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	12
2.7 กระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	13
4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์	32
4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการแปรผันระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศและการให้แสง	33
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนต	35
4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส	35
4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	36
4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของ Fe^{3+}	37
4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, อาหาร BG11 ₀ (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน) และอาหาร BG11 ₀ สูตรดัดแปลง (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ Fe^{3+} 20 ไมโครโมลาร์)	39

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.8 ผลผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียโอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, อาหาร BG11 ₀ (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน) และอาหาร BG11 ₀ สูตรดัดแปลง (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ Fe ³⁺ 20 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 18 วัน	40

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

พลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานอย่างหนึ่งที่มีความจำเป็นต่อการดำเนินชีวิต โดยเฉพาะในสังคมยุคใหม่ ที่ความต้องการพลังงานมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง พลังงานที่มนุษย์ใช้ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลโดยเฉพาะถ่านหินและน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งเป็นทรัพยากรสิ้นเปลืองที่กำลังหมดไปในไม่ช้า การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้ยังมีผลกระทบต่อระบบนิเวศของโลกและความเป็นอยู่ของผู้คน โดยเฉพาะการทำลายโอโซนบนชั้นบรรยากาศจากการเผาไหม้ ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจกและเกิดภาวะโลกร้อน ดังนั้น หน่วยงานต่างๆ ทั่วโลก จึงได้มีความพยายามค้นคว้าและแสวงหาแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด และสามารถผลิตหมุนเวียนได้อย่างเพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์ทั้งในปัจจุบันและอนาคต

ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงทดแทนชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง ไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานสะอาดที่สามารถนำมาใช้เพื่อทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นสารที่ให้พลังงานสูงและผลจากการเผาผลาญไฮโดรเจน ไม่ว่าจะด้วยการเผาไหม้โดยตรงหรือโดยปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีในเซลล์เชื้อเพลิงต่างก็ให้ผลิตผลเป็นไอน้ำและก๊าซออกซิเจน ซึ่งแทบจะไม่เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศ จึงถือว่าการเผาผลาญไฮโดรเจนเป็นกระบวนการที่สะอาดมาก ในปัจจุบัน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในอุตสาหกรรมนิยมใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการไอน้ำ (Steam reforming) และใช้วิธีการทางเคมี เช่น การแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis) แต่การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการเหล่านี้มีต้นทุนค่อนข้างสูงและใช้พลังงานในกระบวนการผลิตสูงมาก จึงเป็นอุปสรรคในการผลิต ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Biohydrogen) จึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการผลิตไฮโดรเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตประเภทไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากสามารถนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ผลิตผลพลอยได้เป็นก๊าซไฮโดรเจน ระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวยังมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่คล้ายพืช สาหร่ายสีเขียวยังสามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนหรืออนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถ ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มียูทิลิตี้ในที่มีแสงหรือไม่มีแสง สำหรับไซยาโนแบคทีเรีย เซลล์สามารถเจริญได้ง่ายโดยใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้

ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ เปลี่ยนให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้อีกด้วย

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ (1) เอนไซม์ไนโตรจีเนส เอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศให้เปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียและได้ไฮโดรเจนเป็นผลผลิตพลอยได้ กระบวนการนี้อาศัยรีดิวซิงพาวเวอร์และพลังงานในรูป ATP จำนวนมาก (2) เอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนส เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากเอนไซม์ไนโตรจีเนสไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน และ (3) เอนไซม์ไบโตรีกซ์ซันนอลไฮโดรจีเนส เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจะขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตและชนิดของเอนไซม์

โครงการวิจัยนี้ จึงมีความสนใจในการศึกษาการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งดินและแหล่งน้ำของนาข้าวในประเทศไทยสำหรับนำมาผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมโดยทำนาข้าวเป็นหลัก นาข้าวมีดินและน้ำ ซึ่งจัดเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์สำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ทำให้สามารถพบสาหร่ายจำนวนมากและหลากหลาย นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศและยังมีความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่หลากหลายและทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากนาข้าวในประเทศไทยที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

นำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ผ่านการคัดแยกจากแหล่งดินและแหล่งน้ำบริเวณนาข้าวของประเทศไทยมาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้น คัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด และนำ สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดย ทำการแปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงระยะเวลาบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ ผลของแสง ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟอร์และความเข้มข้นของเหล็กไอออน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวที่ได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำจากนาข้าวในประเทศไทยที่มีความสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูง รวมถึงหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

พลังงานเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการพัฒนาประเทศ โดยความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง พลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เมื่อเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลนี้ จะก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสาเหตุหลักของสภาวะโลกร้อนหรือปรากฏการณ์เรือนกระจก เชื้อเพลิงส่วนใหญ่ที่ใช้ในปัจจุบันมาจากปิโตรเลียมและถ่านหิน ซึ่งมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องและกำลังจะหมดไปในไม่ช้า วิกฤตการณ์เช่นนี้ทำให้ทุกประเทศมีความตื่นตัวเป็นอย่างมากในการแสวงหาพลังงานแหล่งใหม่ๆ เพื่อทดแทนการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เป็นพลังงานที่ให้ประสิทธิภาพการเผาไหม้สูง สะอาด และสามารถนำมาใช้กับรถยนต์ หรือยานพาหนะอื่นๆ ได้ โดยไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อน

ไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) ได้รับการคาดหมายและยอมรับว่าจะแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอย่างมากในอนาคต (ธรรมบุญ, 2550) เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นสารที่ให้พลังงานสูง และผลผลิตจากการเผาผลาญไฮโดรเจน ไม่ว่าจะจากการเผาไหม้โดยตรงหรือจากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีในเซลล์เชื้อเพลิงจะได้ไอน้ำและก๊าซออกซิเจน ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงถือว่าเป็นการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่สะอาดมาก โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล ไฮโดรเจนเป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 มีสัญลักษณ์ธาตุ คือ H มีมวลอะตอมเท่ากับ 1.00794 กรัมต่อโมล มีความหนาแน่นเท่ากับ 0.08988 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนเป็นธาตุ ที่เบาที่สุดและเป็นธาตุที่พบมากที่สุดในเอกภพ โดยในบรรยากาศโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีเปลวไฟเวลาเผา การเผาไหม้สะอาด ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลเท่ากับ 104 กิโลแคลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิหรือใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนมีจุดเดือด -252.87 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลว -259.14 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ไฮโดรเจนมีอุณหภูมิการเผาไหม้สูงถึง 3,000 องศาเซลเซียส ให้พลังงานความร้อน 2,870 กิโลแคลอรีต่อกิโลกรัม ซึ่งค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน และเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอล ถึง 2.5 และ 5 เท่า ตามลำดับ ไฮโดรเจนมีค่าความร้อนสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกรัม (Madawar et al., 2000) มีคุณสมบัติเป็นเชื้อเพลิงที่ดีและสามารถพัฒนาให้เป็นเชื้อเพลิงหลักได้

ในปัจจุบัน มีการใช้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงอย่างแพร่หลายในประเทศอุตสาหกรรม โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพลังงานดั้งเดิมได้ เช่น เชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น เป็นต้น (สมนึก, 2549) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนยังสามารถนำไปผลิตกระแสไฟฟ้าโดยป้อนเข้าเซลล์เชื้อเพลิง ในขณะนี้ นักวิจัยทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจน เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง เมื่อเทียบกับอุปกรณ์ผลิตไฟฟ้าแบบอื่นๆ

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ดังนี้

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี (Thermo-chemical process) เป็นการใช้ความร้อนในการเปลี่ยนมวลชีวภาพ ก๊าซธรรมชาติ หรือ ถ่านหิน ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซผสมที่ประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และมีเทน (CH_4) จากนั้น จึงทำการแยกไฮโดรเจนออกมาโดยใช้รูปแบบของการเผาไหม้ การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมีมีหลายกระบวนการ ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิ่ง ด้วยไอน้ำ (Steam reforming) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) เป็นต้น (ประพันธ์, 2551) ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิ่งของก๊าซธรรมชาติด้วยไอน้ำ เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ใช้กันแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ ซึ่งในประเทศไทย ก็มีการใช้กระบวนการนี้ในการผลิตไฮโดรเจนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นหรือตัวเร่งปฏิกิริยาในอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ ใช้ก๊าซธรรมชาติ หรือ ถ่านหินที่มีอยู่อย่างจำกัด และ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากมีสารพิษตกค้างจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมีสามารถจำแนกตามสารตั้งต้นได้เป็น 5 รูปแบบ ดังนี้

1.) การเปลี่ยนแปลงของก๊าซธรรมชาติ

ในปัจจุบัน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติเป็นวิธีที่นิยมกันมาก โดยก๊าซธรรมชาติที่ใช้เป็นวัตถุดิบคือ มีเทน (Methane) ที่ได้มาจากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ กระบวนการรีฟอร์มมิ่งมีเทนด้วยไอน้ำ (Steam methane reforming) นั้นเกิดขึ้นโดยนำมีเทนมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูง โดยใช้อุณหภูมิสูงถึง 700–1,000 องศาเซลเซียส และความดัน 2–25 บาร์ และได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนมอนอกไซด์และคาร์บอนไดออกไซด์ที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนต่อไป กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำจัดเป็นปฏิกิริยาคูดความร้อน ดังนั้นจึงต้องใช้ความร้อนในการเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการ

2.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากถ่านหิน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากถ่านหิน เป็นกระบวนการทางเคมีที่สามารถผลิตได้ทั้งพลังงาน น้ำมันเชื้อเพลิง สารเคมี และไฮโดรเจน โดยไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้นก่อนจากการทำปฏิกิริยาระหว่างถ่านหินกับออกซิเจนและไอน้ำภายใต้สภาวะที่มีความดันและอุณหภูมิสูง ก๊าซที่สังเคราะห์ขึ้นจะเป็นก๊าซผสมของก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซึ่งก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ที่ได้อีกจะทำปฏิกิริยากับไอน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนอีกครั้ง ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ทั้งหมดจะถูกแยกออกจากระบบ ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกยัดจับและกำจัดออกไปในที่สุด

3.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากชีวมวล

สารชีวมวลเป็นวัสดุอินทรีย์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจได้จากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชัง ข้าวโพด ฟางข้าวสาลี วัสดุเศษเหลือจากโรงเลื่อยในอุตสาหกรรมป่าไม้ โดยเฉพาะพืชจำพวกหญ้าซึ่งจัดเป็นพวกวัชพืชทางการเกษตร เป็นต้น วิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลนั้นอาศัยกระบวนการ 2 กระบวนการ คือ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลโดยใช้ความร้อนในรูปของไอน้ำภายใต้สภาวะที่มีความดันซึ่งสารชีวมวลจะถูกแยกออกเป็นก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสารชีวมวลด้วยวิธีไพโรไลซิสเป็นวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน

4.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงเหลว

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงเหลว เป็น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงชีวมวลที่อยู่ในรูปของเหลว เช่น เอทานอล ฯลฯ โดยขั้นตอนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้จะคล้ายกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติซึ่งได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

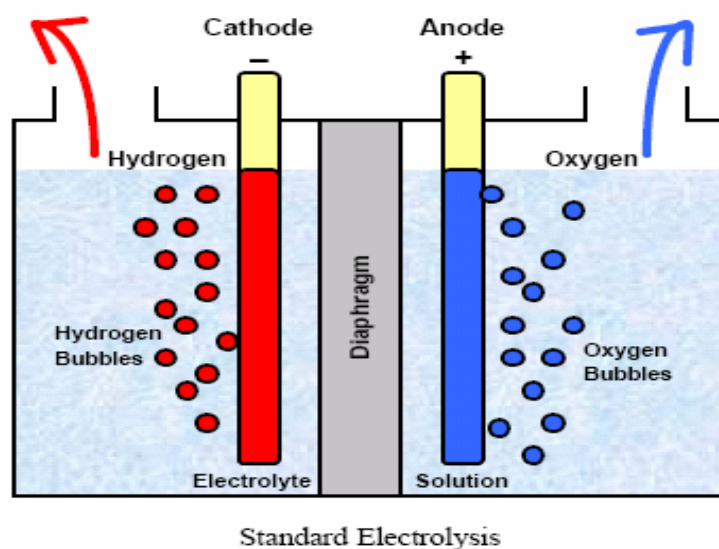
5.) การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการแยกโมเลกุลของน้ำ

การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการแยกโมเลกุลของน้ำ เป็นวิธีการที่ใช้กันมาเป็นเวลานานแล้ว โดยการใช้อุณหภูมิสูงถึง 500–2,000 องศาเซลเซียส ในการกระตุ้น การเกิดปฏิกิริยาเคมีสำหรับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เมื่อไม่นานมานี้ นักวิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงโดยใช้พลังงานจากแสง โดยใช้เลนส์กระจกในการ รวมแสงให้เกิดความเข้มข้นสูง เพื่อกระตุ้นให้เกิด ความร้อน และ พัฒนารูปแบบการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแตกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงโดยใช้พลังงานนิวเคลียร์

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า (Electro-chemical process) เป็นกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นใน

ส่วนที่เรียกว่าอิเล็กโทรไลเซอร์ (Electrolyzer) ซึ่งจะถูกประยุกต์ให้มีขนาดเล็กและมีหน้าที่ในการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิส โดยมีขั้วบวกและขั้วลบของไฟฟ้าแยกออกจากกัน ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่ขั้วลบและออกซิเจนจะไปเกาะที่ขั้วบวก (รูปที่ 2.1) วิธีการนี้ใช้กระแสไฟฟ้ามากถึง 90 กิโลวัตต์และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต โดยก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูง กระบวนการทำงานจะมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของอิเล็กโทรไลเซอร์ อิเล็กโทรไลเซอร์มีหลายชนิด ได้แก่ พอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรนอิเล็กโทรไลเซอร์ (PEM electrolyzer) แอลคาไลน์อิเล็กโทรไลเซอร์ (Alkaline electrolyzer) และ โลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลเซอร์ (Solid oxide electrolyzer) ข้อดีของวิธีการนี้คือ ไม่ก่อให้เกิดสภาวะก๊าซเรือนกระจกในระหว่างกระบวนการผลิต ส่วนข้อเสียของวิธีการนี้คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมาก และ สูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ



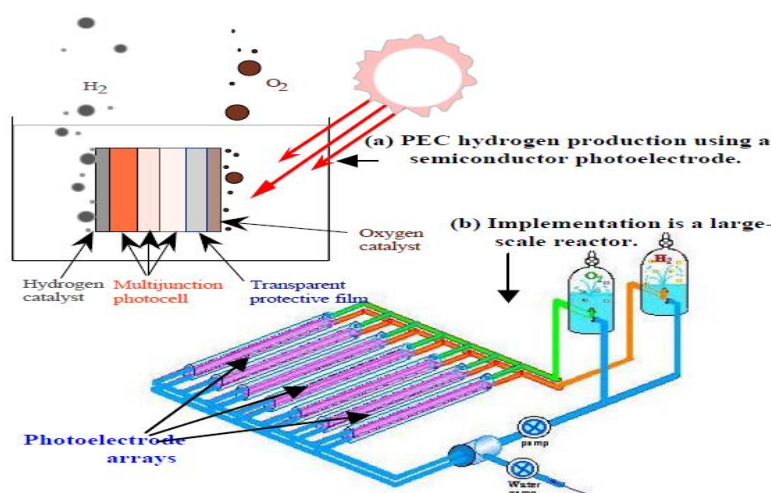
รูปที่ 2.1 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า
ที่มา : http://www.greencarcongress.com/2004/11/milestone_for_h.html

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส (Photobiological process) เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแตกโมเลกุลของน้ำโดยอาศัยพลังงานแสง ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเร็วมากและสามารถที่จะนำมาใช้ทำการผลิตในระยะยาวได้ นอกจากนี้ กระบวนการผลิตยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้สามารถที่จะแบ่งออกได้ 2 กระบวนการ ดังนี้

1.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตอิเล็กโทรเคมีคอล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตอิเล็กโทรเคมีคอล เกิดจากการแยกโมเลกุลของน้ำเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตอิเล็กโทรเคมีคอล ซึ่งจะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน แสงจะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกโมเลกุลของน้ำผ่านเซมิคอนดักเตอร์อิเล็กโทรด โดยที่แผ่นของคอนดักเตอร์จะเคลือบด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนที่บริเวณพื้นผิวของคอนดักเตอร์ กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.2

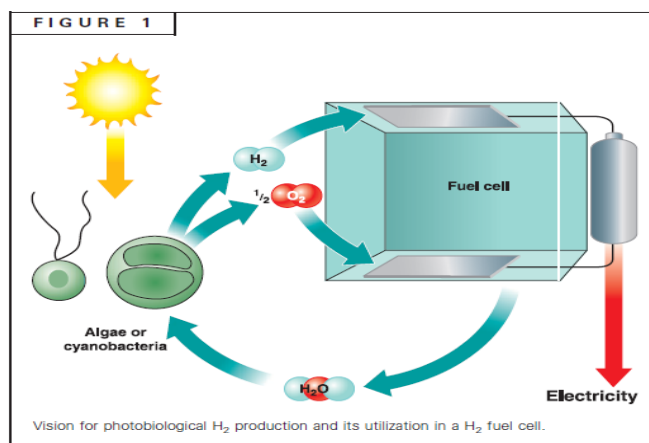


รูปที่ 2.2 กลไกการทำงานในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีโฟโตอิเล็กโทรเคมีคอลตั้งแต่ระดับของห้องปฏิบัติการจนถึงกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ที่มา : Eric and Richard, 2000

2.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตไลซิสของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตไลซิสของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาการแตกโมเลกุลของน้ำด้วยวิธีการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ เมื่อสังเคราะห์แสงแล้ว จะได้ก๊าซออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ จุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้น้ำเป็นวัตถุดิบของกระบวนการสังเคราะห์แสง เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยอาศัยเอนไซม์ต่างๆ แต่กระบวนการผลิตนี้ใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องใช้ระยะเวลานานในการแตกโมเลกุลของน้ำจากกระบวนการสังเคราะห์แสง นักวิทยาศาสตร์ได้มีการพัฒนาคัดเลือกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในอัตราที่สูง เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับขนาดใหญ่และผลิตในรูปแบบที่ต่อเนื่องได้ ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้เป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด และไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (รูปที่ 2.3)



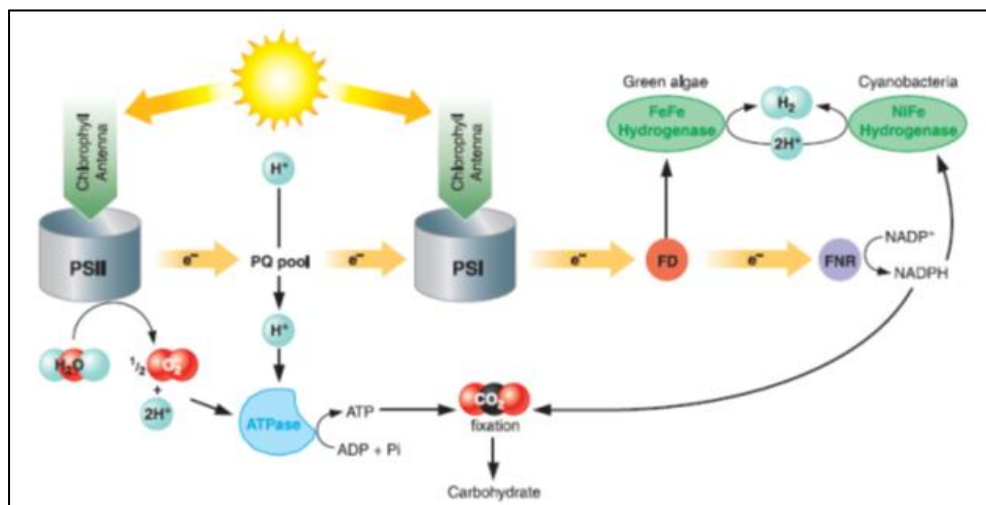
รูปที่ 2.3 กลไกของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสง

ที่มา : Pin et al., 2009

จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสำหรับสีเขียว และ ไซยาโนแบคทีเรีย กระบวนการสังเคราะห์แสงจะอาศัยรงควัตถุชนิดต่างๆ ในการดูดซับพลังงานแสง เช่น แบคทีเรียโอคลอโรฟิลล์ คลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์ บี โดยทั่วไป กระบวนการสังเคราะห์แสงจะมีระบบแสงทั้งหมด 2 ระบบ คือ ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I) และระบบแสงสอง (Photosystem II) ซึ่งระบบแสงทั้งสองจะทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อให้สามารถถ่ายทอดพลังงานแสงไปใช้ในการสร้าง ATP และ NADPH ซึ่งจุลินทรีย์จะนำสารทั้งสองนี้ไปถ่ายทอดพลังงาน เพื่อช่วยตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้แสง เกิดเป็นคาร์โบไฮเดรต ($C_m(H_2O)_n$) ต่อไป

ปฏิกิริยาแรกในกระบวนการที่ต้องใช้แสง คือ ระบบแสง สอง ซึ่งดูดซับพลังงานจากแสงที่ 680 นาโนเมตร โดยพลังงานจะถูกถ่ายทอดมาจากคลอโรฟิลล์ เอ ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ โดยอิเล็กตรอนนี้จะเคลื่อนไปตามระบบการขนส่งอิเล็กตรอน การที่อิเล็กตรอนของระบบแสงสองหลุดออกไป ทำให้เกิดการออกซิไดซ์น้ำไปเป็นออกซิเจน ไฮโดรเจน และอิเล็กตรอน ซึ่งออกซิเจนอะตอมจะรวมตัวกันเกิดเป็นโมเลกุลของออกซิเจน ส่วนอิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำจะเคลื่อนไปทดแทนอิเล็กตรอนที่หลุดออกไปจากคลอโรฟิลล์ และเคลื่อนที่ไปยังระบบแสง หนึ่งผ่านลูกลูโซนส่งอิเล็กตรอนที่มีระบบตัวนำอิเล็กตรอนชื่อพลาสโตควิโนน (Plastoquinone) ซึ่งทำหน้าที่เป็นกระสวยรับส่งโปรตอน และอาศัยการสูบโปรตอนโดยระบบไซโตโครม พลาสโตไซยานิน โดยการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองไปตามระบบการขนส่งอิเล็กตรอน ทำให้เกิดพลังงานอิสระสำหรับนำไปใช้ในการสร้าง ATP เมื่อระบบแสงหนึ่งได้รับพลังงานจากแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกและส่งผ่านไปยังตัวรับอิเล็กตรอน จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ จากนั้น เอนไซม์ $NADP^+$ reductase (FNR) ส่งอิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินไปให้ $NADP^+$ ร่วมกับ $2H^+$ กลายเป็น NADPH และได้ก๊าซไฮโดรเจนโดยการเร่งปฏิกิริยาของ

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเฟอร์รีดอกซินจะมีความเกี่ยวข้องโดยตรงต่อกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 กลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง
ที่มา : Pin et al., 2009

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย

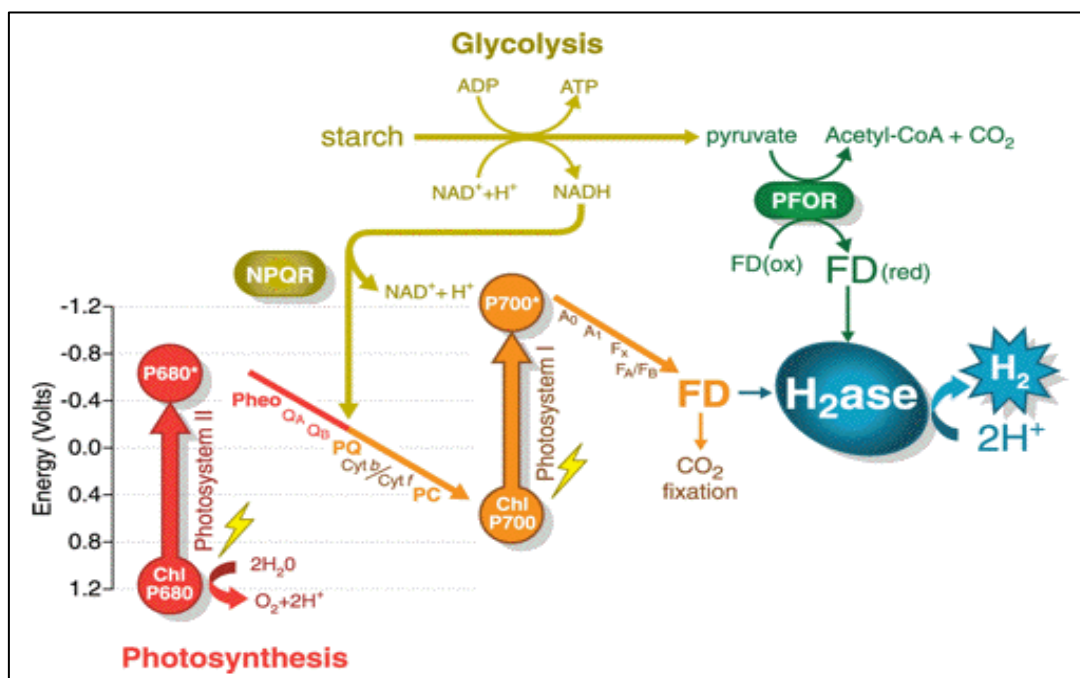
การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ยูคาริโอตที่สังเคราะห์ด้วยแสง ได้แก่ สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีน้ำตาล การผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์โปรคาริโอตที่มีกลไกการสังเคราะห์ด้วยแสงแบบเดียวกับพืช ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย

2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการบ่มที่ปราศจากออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Codium* sp., *Chlamydomonas* sp. และ *Chlorella* sp. เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำ เซลล์จะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลาย

ชนิด คือ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง จากนั้นจึงส่งต่อพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงตกกระทบบนบริเวณระบบแสงสอง (PS II) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนน ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q : Primary electron acceptor of PS II) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ : Plastoquinone) ต่อมาเมื่อน้ำมีการแตกตัวออกได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนในคลอโรฟิลล์ที่มีการสูญเสียไปในระบบ จากนั้นอิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PS I) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง คลอโรฟิลล์จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin : Fd) อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่ง ปฏิกิริยาทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น (รูปที่ 2.5)



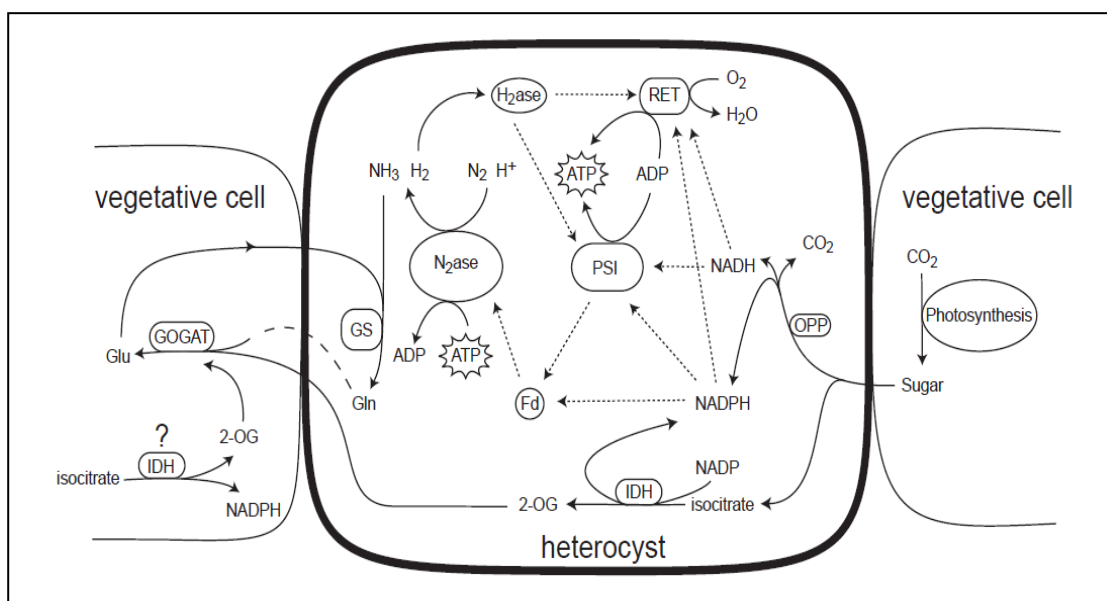
รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง
ที่มา : Posewitz, 2009

2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) มีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีคลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุเหมือนในสาหร่ายสีเขียวและพืช ไซยาโนแบคทีเรียมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก 2 กระบวนการ คือ กระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย

2.3.2.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน

กลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) จากอากาศเริ่มจากการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และอาศัยพลังงานจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งในระหว่างการตรึงไนโตรเจนจะได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (รูปที่ 2.6) และในสภาวะที่เหมาะสม ไฮโดรเจนที่ได้จะถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอนจากการกระตุ้นการทำงานด้วยเอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนส



รูปที่ 2.6 กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

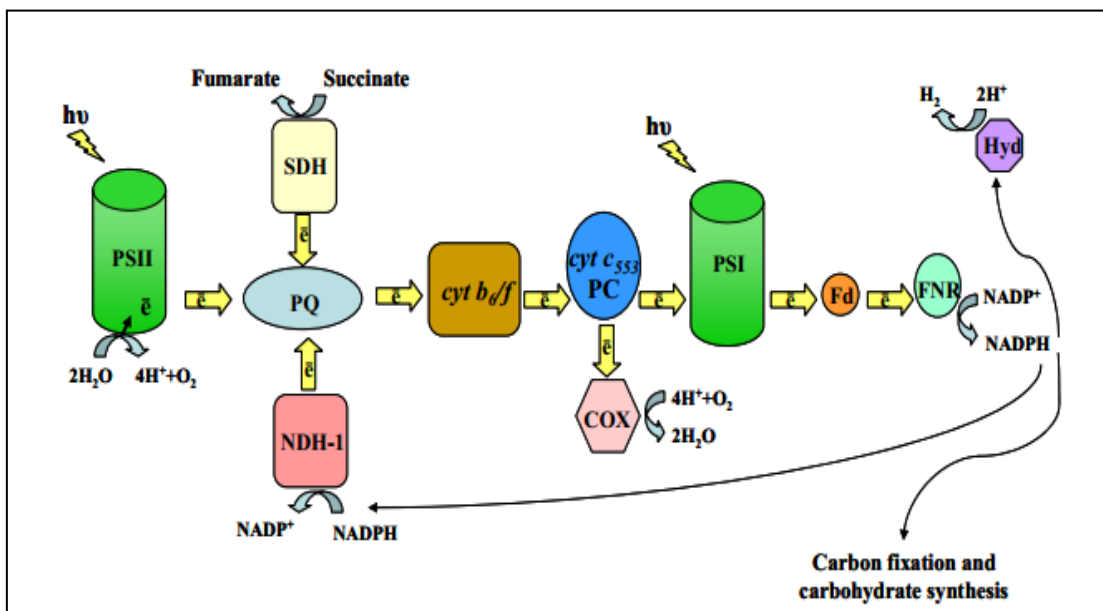
ที่มา : Lindberg, 2003

เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานในสภาวะที่มีออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ด้วยเหตุนี้ เอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงทำงานเฉพาะในสภาวะที่ไม่มีอากาศและไม่มีแสงเท่านั้น ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดจึงได้พัฒนากลไกที่ป้องกันการทำงานของเอนไซม์ จากการยับยั้งของออกซิเจน โดยการสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst cell) ขึ้นมาแยกจากเซลล์ปกติ โดยภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์

จะไม่มีระบบแสงสอง และมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ และส่งสารประกอบไนโตรเจนไปสู่เซลล์ข้างเคียง (Fay, 1992) ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะอยู่ภายในเซลล์ปกติ (Vegetative cell) กระบวนการตรึงไนโตรเจนจะทำงานในขณะที่ไม่มีแสงเท่านั้น (Bergman et al., 1997)

2.3.2.2 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

กระบวนการสังเคราะห์แสงประกอบไปด้วยระบบแสง 2 ระบบ โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเริ่มจากระบบแสงสองรับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เพื่อกระตุ้นให้มีการแตกตัวของน้ำเป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งผ่านไปยังไซโตโครม (Cytochrome complex) และส่งต่อไปยังระบบแสงหนึ่ง ซึ่งจะรับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรและส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังเฟอร์รีดอกซิน กระตุ้นให้เกิดการรีดิวซ์ NADP^+ ให้กลายเป็น NADPH และ H^+ และโปรตอนที่สะสมภายในเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ส่งถ่ายออกไปภายนอกเซลล์จากการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase และได้ ATP เป็นผลิตภัณฑ์ พลังงานที่ได้จะถูกใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านวิถี Calvin-Benson เพื่อผลิตเป็นสารประกอบอินทรีย์ ในสภาวะที่ไม่มีแสงและออกซิเจน เซลล์จะกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส เพื่อออกซิไดซ์โปรตอนและอิเล็กตรอนที่มีมากภายในเซลล์ไปเป็นไฮโดรเจนและขับออกนอกเซลล์ โดยพลังงานจากเฟอร์รีดอกซินกระตุ้นการทำงานปฏิกิริยานี้สามารถย้อนกลับได้ (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย
ที่มา : Kufryk, 2013

กระบวนการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรตจะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และได้ตัวรีดิวซ์เป็นผลพลอยได้ ตัวรีดิวซ์ที่ได้จะกระตุ้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Ferredoxin oxidoreductase) ได้เหมือนกับตัวรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่นกัน

2.4 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (Eukaryote) อยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) พบทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล น้ำกร่อย และที่ชื้นแฉะ สาหร่ายสีเขียวบางชนิดเป็นอิสระลอยอยู่ตามผิวน้ำ มีรูปร่างลักษณะมากมาย มีทั้ง เซลล์เดี่ยวหรือหลายเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว หรือรวมกันเป็นกลุ่ม มีทั้งเคลื่อนที่ได้ และเคลื่อนที่ไม่ได้ สาหร่ายสีเขียวสามารถจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

2.4.1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว

สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลัมที่ใช้ในการโบกพัดจำนวน 2-4 เส้น ตัวอย่างเช่น *Chlamydomonas* sp. เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวบางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้โดยไม่มีแฟลกเจลลัม เช่น *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. เป็นต้น

2.4.2 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์

สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์มีทั้งชนิดที่ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Ulothrix* sp., *Spirogyra* sp. เป็นต้น และที่อยู่เป็นกลุ่ม ได้แก่ *Volvox* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น

สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่พบเช่นเดียวกับรงควัตถุที่พบในพืชชั้นสูง คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ และ บี แคโรทีน และ แซนโทฟิลล์ รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันอยู่ในเม็ดสีหรือพลาสติด (Plastid) ที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ โดยอาจจะมี 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ซึ่งทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการรวมกันของแกมีตซึ่งมีทั้งแบบ Isogamy, Anisogamy และ Oogamy ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีการแบ่งเซลล์ การสร้างสปอร์ และการสร้าง Akinete

2.5 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) หรือมีชื่ออีกชื่อหนึ่งว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) จัดอยู่ในดิวิชันไซยาโนไฟตา (Cyanophyta) และจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอต (Prokaryote) ไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์แสงและได้ออกซิเจนออกมาเป็นผลผลิต เนื่องจากมีรงควัตถุที่สำคัญคือ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์และไฟโคบิลิน ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนในอากาศ ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการปรับตัวได้สูงมาก เช่น สร้างเมือกห่อหุ้มเซลล์ และในเซลล์จะมีถุงลมเพื่อช่วยการลอยตัวหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์

แสง เป็นต้น จากการที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยา สันฐานวิทยา และการพัฒนารูปร่างต่างๆ ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย ได้แก่ หิน ดิน ทะเลทราย น้ำพุร้อน น้ำจืด น้ำทะเล เป็นต้น (Mazel et al., 1990)

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถจัดจำแนกตามสันฐานวิทยาได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวหรือเป็นโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสาย (Unicellular or non filamentous form) อาจจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เช่น *Chroococcus* sp. หรืออาจจะอยู่รวมกันเป็นโคโลนีแบบพาลเมลลา เช่น *Eucapsis* sp., *Merismopedia* sp. และ *Anacystis* sp. เป็นต้น เซลล์ในกลุ่มนี้จะมีรูปร่างต่างๆ กัน เช่น กลม รูปไข่ ทรงกระบอกหรือรูปไข่แบบแหลมหัวแหลมท้าย กลุ่มที่ 2 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย (Filamentous form) เซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสายเรียกว่า ตรัยโคม (Trichome) เส้นสายนี้อาจจะตรงและเรียบไม่มีการแตกแขนง มีเซลล์ชนิดเดียวกันมาเรียงต่อกันเรียกว่า Homocystous form เช่น *Oscillatoria* sp. และ *Lyngbya* sp. เป็นต้น และอีกกลุ่มเส้นสายที่มีเซลล์ปกติและมีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ที่ทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนมาเรียงสลับหรืออยู่ที่ปลายสุดของตรัยโคมเรียกว่า Heterocystous form เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดเส้นสายนั้นอาจจะมีปลายโค้งงอหรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Arthrospira* sp. และ *Spirulina* sp. เป็นต้น (ยุวดี, 2546)

การสืบพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียเป็นแบบไม่อาศัยเพศ บางชนิดมีการสร้างสปอร์เป็นโครงสร้างของเซลล์ที่เรียกว่า เซลล์อะคิเน็ต (Akinete cell) โดยจะสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นกว่าเซลล์ปกติและสามารถคงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ มักพบในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย บางครั้งอาจสร้างสปอร์แรงจิโอสปอร์ (Sporangiospore) ซึ่งมีสปอร์ (Spore) บรรจุอยู่ โดยทั้งเซลล์อะคิเน็ตและสปอร์แรงจิโอสปอร์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

2.6 การแพร่กระจายและแหล่งที่อยู่ของสาหร่าย

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบได้ทุกหนทุกแห่งที่มีความชื้น แต่แหล่งที่สาหร่ายเจริญได้ดีที่สุดคือ แหล่งน้ำ ซึ่งจะมีคุณสมบัติทางเคมีหรือกายภาพที่เหมาะสมกับสาหร่ายชนิดนั้นๆ โดยสาหร่าย สามารถเจริญในแหล่งน้ำที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.6.1 น้ำไหล ได้แก่ แม่น้ำ ลำคลอง น้ำตก ฯลฯ สาหร่ายที่ขึ้นในสภาพที่น้ำไหลมักมีโครงสร้างภายนอกไว้อย่างมาก เช่น สาหร่ายสีเขียว *Ulothrix* sp. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Rivularia* sp. สาหร่ายสีแดง *Batrachospermum* sp. และ *Lemanea* sp. เป็นต้น

2.6.2 บ่อน้ำและสระน้ำ น้ำมักจะนิ่งและในน้ำจะมีสาหร่ายหลายชนิดที่สามารถเจริญได้ โดยการเจริญเติบโตจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความอุดมสมบูรณ์ของอินทรีย์สารในแหล่งน้ำนั้นๆ ดังนี้

2.6.2.1 พวกที่ลอยอิสระในมวลน้ำเรียกว่า แพลงก์ตอนพืช (Phytoplankton) ได้แก่ พวกสาหร่ายสีเขียวใน Order Desmidiaceae เช่น *Cosmarium* sp., *Closterium* sp., *Staurastrum*

sp. เป็นต้น และพวกที่เป็นโคลนีหรือมีเซลล์เดียว เช่น *Pediastrum* sp., *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น *Microcystis* sp., *Anabaena* sp. เป็นต้น

2.6.2.2 พวกที่ขึ้นอยู่บนต้นไม้ น้ำ เช่น ผักตบชวา จอก แหน เรียกว่าสาหร่ายพวกนี้ว่า สาหร่ายอีพิไฟติก (Epiphytic algae) เช่น สาหร่ายสีเขียว *Cladophora* sp., *Pithophora* sp. เป็นต้น

2.6.2.3 พวกที่ขึ้นหรือนอนกันอยู่ตามพื้นน้ำ เรียกว่า สาหร่ายอีพิเพลลิก (Epipellic algae) แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ พวกที่ขึ้นอยู่ตามพื้นดินหรือทรายก้นท้องน้ำ เช่น สาหร่ายไฟ *Chara* sp., *Nitella* sp., *Tolypella* sp. เป็นต้น พวกที่เคลื่อนที่ได้ มีลักษณะเป็นเมือกอยู่ตามตะกอนก้นท้องน้ำ เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิด สาหร่ายใน Division Chrysophyta และพวกที่เคลื่อนที่ได้ตามตะกอนก้นท้องน้ำ เช่น ไดอะตอมและสาหร่ายสีเขียวพวกเดสมีต เป็นต้น

2.6.2.4 พวกที่เจริญเติบโตอยู่ในพืชเรียกว่า เอนโดไฟติก (Endophytic algae)

2.6.2.5 พวกที่เกาะติดอยู่ตามตัวสัตว์ เรียกว่า สาหร่ายอีพิซุอิก (Epizooic algae)

2.6.2.6 พวกที่อาศัยอยู่ในตัวสัตว์เรียกว่า สาหร่ายเอนโดซุอิก (Endozooic algae) เช่น *Chlorella* sp. ที่อาศัยอยู่ใน *Hadra viridis*, *Paramecium bursaria* และในฟองน้ำน้ำจืดบางชนิด

2.7 การคัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยอาศัยอยู่ตามที่ขึ้นและ ผิวดิน ใบไม้ผุ แต่แหล่งที่สาหร่ายเจริญได้ดีที่สุดคือ แหล่งน้ำ ซึ่งจะมีคุณสมบัติทางเคมีหรือกายภาพที่เหมาะสมกับสาหร่ายในแต่ละชนิด

2.7.1 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจากธรรมชาติ

ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่พบในธรรมชาติมักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่มก้อน อาจอยู่เป็นอิสระหรืออยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น พบได้ตามพื้นดิน ก้อนหิน ใบไม้ผุ ในน้ำ เป็นต้น ถ้าเป็นไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่อยู่บนผิวดินหรือก้อนหิน จะเก็บตัวอย่างจากดินหรือก้อนหินนั้นมาแยก แต่ถ้าอาศัยในแหล่งน้ำ ทะเลสาบ หรือ น้ำบ่อ ก็ให้เก็บตัวอย่างน้ำมา 200-500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดน้ำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 3,000-5,000 รอบต่อนาที ไซยาโนแบคทีเรียก็จะตกตะกอนแล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น นำมาเลี้ยงลงในจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิด ภายใต้สภาวะที่มีแสงและอุณหภูมิที่เหมาะสม

ในการแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวและการทำให้บริสุทธิ์ จะต้องใช้ความเข้มของแสงที่ได้มาจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (เช่น Cool white, Warm white, Day light) ต่ำ (น้อยกว่า 500 ลักซ์) ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย ถ้ามีการให้แสงสว่างช่วงเวลาหนึ่งและหยุดการให้แสงช่วงเวลาหลัง จะทำให้การเลี้ยงได้ผลดีกว่าการให้แสงติดกันตลอดเวลา ช่วงแสงสว่างที่นิยมใช้ คือ มีด 12 ชั่วโมง และให้แสง 12 ชั่วโมง แต่บางแห่งนิยมใช้ช่วงแสงสว่าง 16 ชั่วโมง และมีด 8 ชั่วโมง

2.7.2 เทคนิคของการทำเชื้อให้บริสุทธิ์

เทคนิคของการทำเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นวิธีการเพื่อให้ได้ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่เป็นชนิดเดียวกันทั้งหมด ปัญหาที่พบในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ คือ การปะปนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น ไดอะตอมปะปนอยู่กับไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้โดยการใช้เจมิเนียมไดออกไซด์ (Germanium dioxide) 1-10 มิลลิกรัมต่อกรัม ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงเรื่องของระยะเวลาที่ใช้ด้วย หลังจากได้ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นแล้ว ต้องทดสอบความบริสุทธิ์ได้โดยการทดสอบบนอาหาร Nutrient agar ในบางครั้ง อาจมีสิ่งปนเปื้อนมาก ก็ต้องนำเอาไปปั่นแยกโดยอาศัยความแตกต่างของขนาด ถ้าสิ่งปนเปื้อนมีขนาดใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย ก็ให้กรองผ่าน Filter ที่ฆ่าเชื้อแล้วที่มีขนาด 8 ไมโครเมตรของ Millipore filter และล้างอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อลดปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน เมื่อแยกได้ดีแล้ว ก็นำไป cấyไปบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และเก็บไว้ในตู้หมักเชื้อที่มีอุณหภูมิและแสงที่เหมาะสม

ในกรณีไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดเกาะติดเป็นแผ่นแน่น ต้องทำให้แยกออกจากกันก่อนที่จะนำไปเขียนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โดยใช้ Pasteur pipette เก็บเชื้อและใช้เชื้อใหม่อีกครั้ง ถ้าจำเป็นต้องแยกในอาหารเหลวให้ใช้ไฮโมจิโนเซอร์และนำไปเขียนใหม่อีกครั้ง ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นลักษณะเส้นสายมีขนาดใหญ่และเคลื่อนที่ได้ เมื่อเจริญอยู่บนอาหารแข็งให้ใช้ Platinum spade ตัดผิวโดยรอบ นำเอาเฉพาะตรงกลางไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสักระยะหนึ่ง หลังจากนั้นจะมีสายเซลล์ที่เล็กและบางเจริญออกมาโดยรอบซึ่งสายเซลล์เหล่านี้จะปราศจากการปนเปื้อนน้ำ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่จะได้ไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย

การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ ดังนี้

1. ชนิดของจุลสาหร่าย ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจะแตกต่างกันและมีความเฉพาะตัวตามชนิดของสาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีเมตาบอลิซึมของการตรึงไนโตรเจนและการสังเคราะห์แสงแตกต่างกันไป (Hall et al., 1995)
2. ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น องค์ประกอบของธาตุอาหาร และ แร่ธาตุ ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน (Dutta et al., 2000; Weissman and Benemann, 1977) แสงและปริมาณคาร์บอน (Shah et al., 2001) ปริมาณซิลเฟออร์ (Antal and Lindblad, 2005) เป็นต้น ความเข้มแสงและ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ฯลฯ

อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	เอกสารอ้างอิง
1. <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	2.6 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Masukawa et al., 2001
2. <i>Anabaena cylindrica</i> IAMM-1	2.1 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Masukawa et al., 2001
3. <i>Anabaena cylindrica</i> IAMM-58	4.2 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Masukawa et al., 2001
4. <i>Anabaena cylindrica</i> UTEXB-629	0.91 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Masukawa et al., 2001
5. <i>Anabaena variabilis</i> AVM13	68 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Happe et al., 2000
6. <i>Anabaena variabilis</i> PK84	32.3 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Sveshnikov et al., 1997
7. <i>Anabaena variabilis</i> ATCC29413	39.4 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Sveshnikov et al., 1997
8. <i>Synechococcus</i> sp. PCC6830	0.26 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Serebryakova et al., 2000
9. <i>Synechococcus</i> sp. PCC602	0.66 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Serebryakova et al., 2000
10. <i>Synechocystis</i> sp. PCC6308	0.13 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Serebryakova et al., 2000
11. <i>Microcystis</i> sp. PCC7820	0.16 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Howarth and Codd, 1985
12. <i>Gloeocapsa alpicola</i> CALU743	0.58 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Antal and lindbald, 2005
13. <i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	0.7 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Moezelaar and Stal, 1994
14. <i>Calothrix membracea</i> B-379	0.108 $\mu\text{mol/mg dry wt/h}$	Lambert and Smith, 1977
15. <i>Oscillatoria</i> sp. Miami BG7	0.250 $\mu\text{mol/mg dry wt/h}$	Phlips and Mitsui, 1983
16. <i>Oscillatoria limnosa</i>	0.83 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Heyer et al., 1989
17. <i>Cyanothece</i> sp. 7822	0.92 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$	Van der Oost et al., 1989

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 18 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท และสาหร่ายสีเขียวจำนวน 9 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำในนาข้าวของประเทศไทย

3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในงานวิจัยมีจำนวน 9 ไอโซเลท

- 3.1.1.1 2SinS3 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดสิงห์บุรี
- 3.1.1.2 A34 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดสิงห์บุรี
- 3.1.1.3 A36ป คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดสิงห์บุรี
- 3.1.1.4 A47.1 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดอ่างทอง
- 3.1.1.5 AngS1 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดอ่างทอง
- 3.1.1.6 B14 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดนครราชสีมา
- 3.1.1.7 B35.1 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดมหาสารคาม
- 3.1.1.8 ChiS5 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดชัยนาท
- 3.1.1.9 Cyano เส้น คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดปทุมธานี

3.1.2 สาหร่ายสีเขียวที่นำมาใช้ในงานวิจัยมีจำนวน 9 ไอโซเลท

- 3.1.2.1 1SinS1.1 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดสิงห์บุรี
- 3.1.2.2 2SinS4 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดสิงห์บุรี
- 3.1.2.3 2TKS2.1 คัดแยกมาจากดินนาในอำเภอดาเกี๋ย จังหวัดนครสวรรค์
- 3.1.2.4 2TKS2.2 คัดแยกมาจากดินนาในอำเภอดาเกี๋ย จังหวัดนครสวรรค์
- 3.1.2.5 2TKW1 คัดแยกมาจากน้ำนาในอำเภอดาเกี๋ย จังหวัดนครสวรรค์
- 3.1.2.6 A27green คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดชัยนาท
- 3.1.2.7 ChiS4 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดชัยนาท
- 3.1.2.8 ChiW1 คัดแยกมาจากน้ำนาในจังหวัดชัยนาท
- 3.1.2.9 NakS4 คัดแยกมาจากดินนาในจังหวัดนครสวรรค์

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (ภาคผนวก ข)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.2.1 กรดบอริก (H_3BO_3)

3.2.2.2 กรดซิตริก (Citric Acid)

3.2.2.3 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

3.2.2.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)

3.2.2.5 โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)

3.2.2.6 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.2.7 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

3.2.2.8 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)

3.2.2.9 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)

3.2.2.10 ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)

3.2.2.11 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.2.2.12 เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$ citrate)

3.2.2.13 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.2.14 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

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

3.2.4 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.2.4.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซนต์ไนอาร์กอน (Thailand Industrail Gas Co. Ltd., Thailand)

3.2.4.2 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999%) (Thailand Industrail Gas Co. Ltd., Thailand)

3.3 อุปกรณ์

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

3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)

3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)

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

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

- 3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z38K, Germany)
- 3.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 3.3.8 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.3.9 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.3.10 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 3.3.11 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.3.12 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
- 3.3.13 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)
- 3.3.14 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (National Scientific, USA)
- 3.3.15 เชื้อฉีดก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.4 วิธีการคัดแยกเชื้อและทดสอบความบริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อจะเริ่มจากการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากแหล่งดินและแหล่งน้ำบริเวณนาข้าวใน 7 จังหวัด คือ จังหวัดชัยนาท นครราชสีมา นครสวรรค์ ปทุมธานี มหาสารคาม สิงห์บุรี และอ่างทอง นำตัวอย่างมาใส่ในอาหารเหลว BG11 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดแสง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จากนั้น นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์เป็นจำนวน 10 ครั้ง แล้วจึงนำสารละลายเซลล์มา Streak บนอาหารแข็ง BG11 จำนวน 1 ลูบต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง ในการเก็บตัวอย่างน้ำ กระทำโดยการใช้ Silk screen มากรองสาหร่าย นำ Silk screen มาตัดให้ได้ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปวางบนอาหารแข็ง BG11 จากนั้น นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในที่มืดแสง เมื่อเชื้อเจริญเติบโตจนได้โคโลนีเดี่ยว จึงนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาทดสอบความบริสุทธิ์ โดยนำมา Streak บนอาหารแข็ง LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

การเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวเพื่อใช้เป็น Starter เริ่มจากการเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวบนอาหารแข็ง BG11 จากนั้น จึงนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงต่อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีความการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรสำหรับไฮยาโนแบคทีเรีย และที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรสำหรับ

สำหรับสายสีเขียวประมาณ 0.1 จากนั้น นำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที

3.6 วิธีการวัดการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของไซยาโนแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรและวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายสีเขียวที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.7 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

นำไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ตามหัวข้อ 3.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิมเมทานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นในที่มืดเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของไซยาโนแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร และของสาหร่ายสีเขียวที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee and Shen (2004)

3.8 วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อ 3.5 แล้วนำไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวมาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งในอาหารเพาะเลี้ยงและกระจายเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปใส่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นในที่มืดโดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) เทียบกับก๊าซมาตรฐานอาร์กอน สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟแสดงในตารางที่ 3.1

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

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

3.9 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหาร BG11₀ (อาหาร BG11 ที่ปราศจากไนโตรเจน) และเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์ในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปไล่อากาศโดยการพ่นอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืดโดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.10 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และนำตะกอนเซลล์มากระจายในอาหาร BG11₀ (อาหาร BG11 ที่ปราศจากไนโตรเจน) และเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์ในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปไล่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดแก้วในที่มืดและที่สว่าง โดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.11 วิธีการศึกษาผลของแหล่งอาหารและความเข้มข้นของแหล่งอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในอาหารที่ทำการทดสอบ และถ่ายเชื้อลงในอาหาร BG11 ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารต่างๆ ดังนี้ แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหาร BG11₀ (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน) โดยให้ความเข้มข้นของกลูโคสหรือโซเดียมคาร์บอเนตเท่ากับ 0, 0.189, 1.89 และ 18.9 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร แปรผันความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟอร์ในอาหาร BG11₀ โดยให้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต 0, 0.3, 3 และ 30 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออนในอาหาร BG11₀ โดยให้ความเข้มข้นของ Fe^{3+} 0, 20, 200 และ 2,000 ไมโครโมลาร์ จากนั้น นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไต้นต่อตารางเมตร ต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว เตรียมตัวอย่างที่คัดเลือก เพื่อนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจน โดยเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปใส่อากาศโดยการพ่นอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืด โดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

3.12 วิธีการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในอาหารเพาะเลี้ยง และกระจาย ตะกอนเซลล์ลงในอาหาร BG11₀ (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน) ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสหรือโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรตและความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน จากนั้น นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไต้นต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว เตรียมตัวอย่างที่คัดเลือกเพื่อนำไปวิเคราะห์ไฮโดรเจน โดยเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและกระจายเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์ใส่ในขวดแก้วและปิดฝาขวด นำไปใส่อากาศโดยการพ่นอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืดโดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 18 วัน และวัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทุก 24 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายและผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากนาข้าวในประเทศไทย

จากการเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวแบบสุ่มจากแหล่งดินและแหล่งน้ำในนาข้าว 7 จังหวัดของประเทศไทย คือ จังหวัดชัยนาท นครราชสีมา นครสวรรค์ ปทุมธานี มหาสารคาม สิงห์บุรี และอ่างทอง พบว่าสามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 59 ไอโซเลท เป็นตัวอย่างจากแหล่งดิน 44 ไอโซเลท แหล่งน้ำ 8 ไอโซเลท และจาก Silk Screen 7 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากในนาข้าวมีลักษณะทางกายภาพและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย ทำให้พบการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวอยู่ทั่วไปในนาข้าว

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างสาหร่ายแบบสุ่มจากแหล่งดินและแหล่งน้ำบริเวณนาข้าว 7 จังหวัดในประเทศไทย คือ ชัยนาท นครราชสีมา นครสวรรค์ ปทุมธานี มหาสารคาม สิงห์บุรี และ อ่างทอง

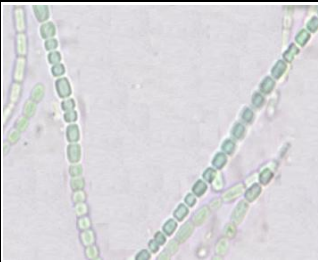
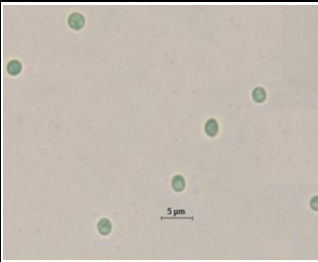
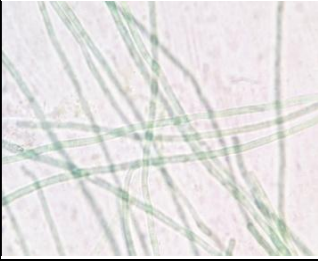
แหล่งที่มา สถานที่	แหล่งดิน	แหล่งน้ำ	Silk Screen	รวม
อ.ตาคี จ.นครสวรรค์	13	1	2	16
จ.ชัยนาท	9	1	1	11
จ.นครสวรรค์	4	-	1	5
จ.สิงห์บุรี	9	3	2	14
จ.อ่างทอง	4	3	1	8
จ.นครราชสีมา	1	-	-	1
จ.มหาสารคาม	2	-	-	2
จ.ปทุมธานี	2	-	-	2
รวม	44	8	7	59

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลท แบ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.2) และสาหร่ายสีเขียวจำนวน 9 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.3) จากนั้น นำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่บริสุทธิ์มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายยาว ไม่แตกแขนง ไม่พบเซลล์พิเศษอย่างเซลล์เฮเทอโรซิสต์และเซลล์อะคิเนท ได้แก่ ไอโซเลท 2SinS3, A36ป, B14, B35.1 และ ChiS5 กลุ่มที่ 2 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแบบถังเปียร์ เซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายสายโซ่มี 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท A47.1 กลุ่มที่ 3 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างท่อน ได้แก่ ไอโซเลท A34 และกลุ่มที่ 4 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลม ได้แก่ ไอโซเลท AngS1 และ Cyano เส้น ส่วนสาหร่ายสีเขียวสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลมอยู่แบบกระจายตัว ได้แก่ ไอโซเลท 1SinS1.1, 2TKS1.1, 2TKS1.2, 2TKW1, 2SinS4, A27green และ NakS4 กลุ่มที่ 2 สาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ได้แก่ ไอโซเลท ChiW1 และ ChiS4 ในการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถสรุปชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ยาก จึงอาจจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลการจัดจำแนกจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

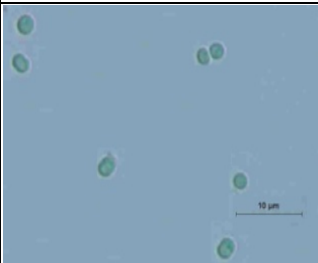
ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า)

ชื่อ	รูปถ่าย	ลักษณะ	แหล่ง คัดแยก	สถานที่	ละติจูด - ลองจิจูด
2SinS3		เซลล์รูปร่างเป็นเส้น สาย เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 1 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดสิงห์บุรี	280°W 14°56'3''N 100°21'54''E
A34		เซลล์เดี่ยวเป็นท่อน ยาว เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.5 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดสิงห์บุรี	ND

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

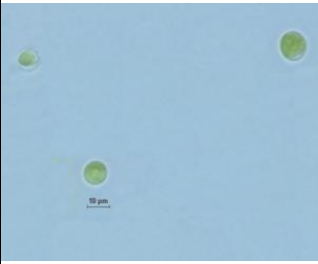
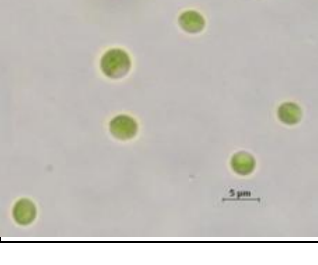
ชื่อ	รูปถ่าย	ลักษณะ	แหล่ง คัดแยก	สถานที่	ละติจูด - ลองจิจูด
A36ป		เซลล์รูปร่างเป็นเส้น สาย เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.5 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดสิงห์บุรี	ND
A47.1		เซลล์เรียงต่อกันเป็น สายโซ่ เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.5 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดอ่างทอง	ND
AngS1		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดอ่างทอง	213°SW 14°56'3''N 100°21'54''E
B14		เซลล์รูปร่างเป็นเส้น สาย เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 1 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัด นครราชสีมา	ND
B35.1		เซลล์รูปร่างเป็นเส้น สาย เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.5 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัด มหาสารคาม	ND
ChiS5		เซลล์รูปร่างเป็นเส้น สาย เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 0.5 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดชัยนาท	40NE° 15°13'12''N 100°10'11''E

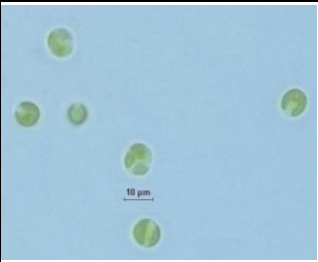
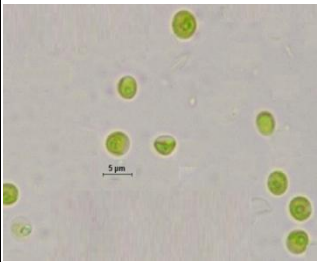
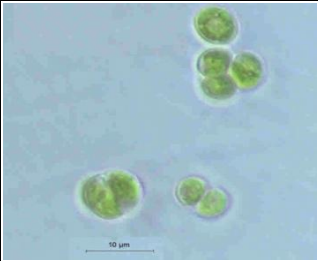
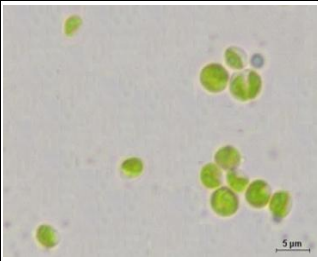
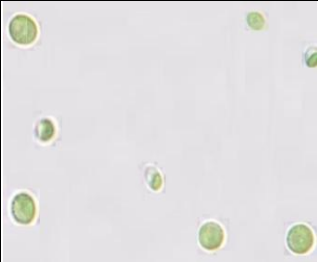
ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ชื่อ	รูปถ่าย	ลักษณะ	แหล่ง คัดแยก	สถานที่	ละติจูด - ลองจิจูด
Cyanoเส้น		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัด ปทุมธานี	ND

*ND หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจวัด

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 9 ไอโซเลท (กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า)

ชื่อ	รูปถ่าย	ลักษณะ	แหล่ง คัดแยก	สถานที่	ละติจูด - ลองจิจูด
1SinS1.1		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดสิงห์บุรี	247°SW 14°58'47''N 100°20'13''E
2SinS4		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดสิงห์บุรี	280°W 14°56'3''N 100°21'54''E
2TKS2.1		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 μm	แหล่ง ดิน	อำเภอดาคลี จังหวัด นครสวรรค์	91°E 15°6'44''N 100°23'27''E
2TKS2.2		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 μm	แหล่ง ดิน	อำเภอดาคลี จังหวัด นครสวรรค์	91°E 15°6'44''N 100°23'27''E

ชื่อ	รูปถ่าย	ลักษณะ	แหล่ง คัดแยก	สถานที่	ละติจูด - ลองจิจูด
2TKW1		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 μm	แหล่ง น้ำ	อำเภอตากลี จังหวัด นครสวรรค์	91°E 15°6'44''N 100°23'27''E
A27Green		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดชัยนาท	ND
ChiS4		เซลล์รูปร่างกลม อยู่แบบเป็นกลุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัดชัยนาท	40°NE 15°13'12''N 100°10'11''E
ChiW1		เซลล์รูปร่างกลม อยู่ แบบเป็นกลุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 μm	แหล่ง น้ำ	จังหวัดชัยนาท	40°NE 15°13'12''N 100°10'11''E
NakS4		เซลล์รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 μm	แหล่ง ดิน	จังหวัด นครสวรรค์	166°S 15°9'42''N 100°16'52''E

*ND หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจวัด

4.2 ผลการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวทั้งหมดจำนวน 18 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์มากระจายและเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 และ BG11₀ (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์อีกครั้งและกระจายเซลล์ในอาหาร BG11 และ BG11₀ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเซลล์ใส่ในขวดแก้วและนำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศ บ่มในที่มืด เป็นเวลา 2 และ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำก๊าซด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย 2SinS3 เป็นจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวที่ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ และไซยาโนแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษามีอัตราการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11₀ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้ ยังพบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11₀ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 256.612 ± 34.267 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.4) ในกรณีของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียบบางชนิด ได้แก่ 2SinS4, 2TKS2.2, A27Green, ChiS4 และ ChiW1 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิด โดยจะผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11₀ (ตารางที่ 4.5) สาหร่ายสีเขียวที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือสาหร่ายสีเขียวยายพันธุ์ ChiS4 โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 53.248 ± 1.229 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

จากการศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากนาข้าวในประเทศไทยนี้ โดยได้ทำการทดลองใน 2 สภาวะ คือ ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน (BG11) และ อาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (BG11₀) พบว่าการขาดไนโตรเจนส่งผลให้ไซยาโนแบคทีเรียเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนอย่างเห็นได้ชัด แต่จะส่งผลเพียงเล็กน้อยกับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ทั้งนี้ เนื่องจากการขาดแหล่งไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรียจะทำให้เกิดการสะสมไกลโคเจนเพิ่มมากขึ้น เมื่อ บ่มเซลล์ในที่มืดและปราศจากอากาศ เซลล์ จะเกิดสลายไกลโคเจนได้น้ำตาลรีดิวซ์จำนวนมาก เพื่อใช้ในกิจกรรมของเซลล์และเป็นแหล่งรีดักแทนท์สำหรับการผลิตไฮโดรเจน การเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารจะไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เซลล์สูญเสียอิเล็กตรอนไปในกระบวนการรีดักชันไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และยังมีผลต่อการ สร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในบางสายพันธุ์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ทำให้ภายในเซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Oscillatoria* sp. Miami BG7 (Kumazawa and Mitsui, 1981), *Gloeocapsa alpicola* (Serebryakova et al., 1998; Troshina et al., 2002), *Arthrospira maxima* (Ananyev et al., 2008) และ *Aphanothece halophytica* (Taikhao et al., 2013) ในสาหร่ายสีเขียวมีการศึกษาพบว่า การขาดแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวจะส่งผลทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (Maneeruttanarungroj et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้

ตารางที่ 4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท โดยบ่มในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ในอาหาร BG11 และ BG11₀

Isolated no.	Isolated name	Hydrogen production rate (nmolH ₂ /mg chl/h)			
		BG11 (±SD)		BG11 ₀ (±SD)	
		2 Hr	24 Hr	2 Hr	24 Hr
1	2SinS3	-	-	-	-
2	A34	-	-	111.588±25.581	41.677±5.332
3	A36ป	-	-	11.916±1.083	4.530±0.075
4	A47.1	-	-	39.919±1.466	14.302±1.338
5	AngS1	-	-	256.612±34.267	63.160±4.886
6	B14	-	-	88.049±10.929	80.028±4.624
7	B35.1	-	-	152.762±18.387	39.204±1.163
8	ChiS5	-	-	6.305±0.812	2.078±0.424
9	Cyanoเส้น	-	1.240±0.291	237.942±32.353	41.644±4.429

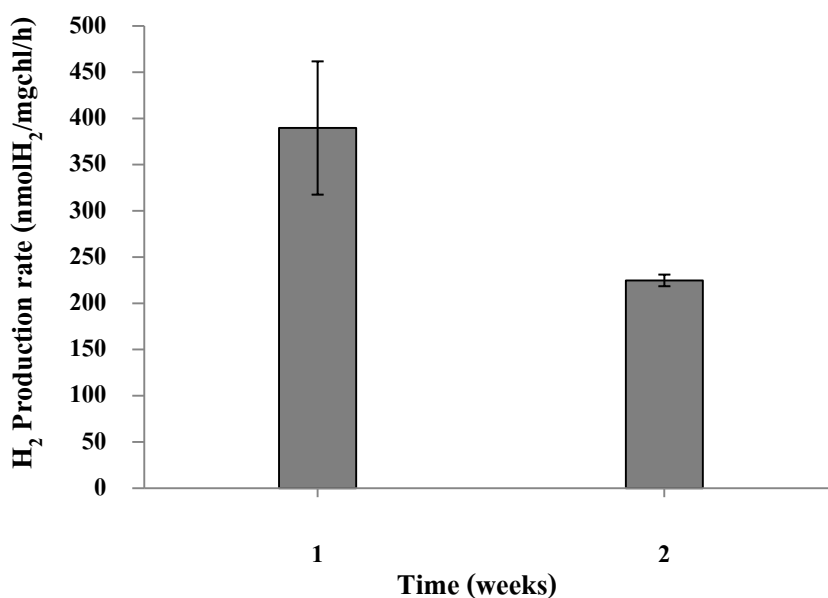
ตารางที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจำนวน 9 ไอโซเลท โดยบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ในอาหาร BG11 และ BG11₀

Isolated no.	Isolated name	Hydrogen production rate (nmolH ₂ /mg chl/h)			
		BG11 (±SD)		BG11 ₀ (±SD)	
		2 Hr	24 Hr	2 Hr	24 Hr
1	1SinS1.1	-	-	3.701±0.334	2.076±0.235
2	2SinS4	23.305±1.812	11.271±0.332	40.665±7.960	13.997±1.051
3	2TKS2.1	-	-	5.973±0.385	11.525±2.270
4	2TKS2.2	6.605±1.913	2.423±0.477	8.618±0.636	4.562±0.064
5	2TKW1	-	-	51.006±0.135	13.645±1.043
6	A27Green	19.139±2.852	2.483±0.431	23.633±0.531	7.142±0.979
7	ChiS4	21.666±2.008	2.024±0.265	53.248±1.229	9.043±0.705
8	ChiW1	12.648±0.019	0.774±0.033	15.924±1.040	6.903±0.713
9	NakS4	-	-	15.785±2.202	6.350±1.441

ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรีย AngS1 ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน สูงที่สุดมาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.3 ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 โดยเขย่าที่ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว BG11₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้วและนำไปปรับตัวในที่มืดภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำไป วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยผลิตได้ 389.630 ± 72.084 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.1) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในสัปดาห์ที่ 1 เป็น ระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่อยู่ในระยะ log phase มีการผลิตพลังงานที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงและสะสมสารประกอบคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์มากขึ้น พลังงานและคาร์โบไฮเดรตที่ สะสมนี้จะกลายเป็นแหล่งอิเล็กตรอนในสภาวะที่เซลล์อยู่ในระยะการปรับตัวภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่งจะ นำไปสู่การผลิตไฮโดรเจนที่มากขึ้น ทั้งนี้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้ออีกด้วย ด้วยเหตุนี้ ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

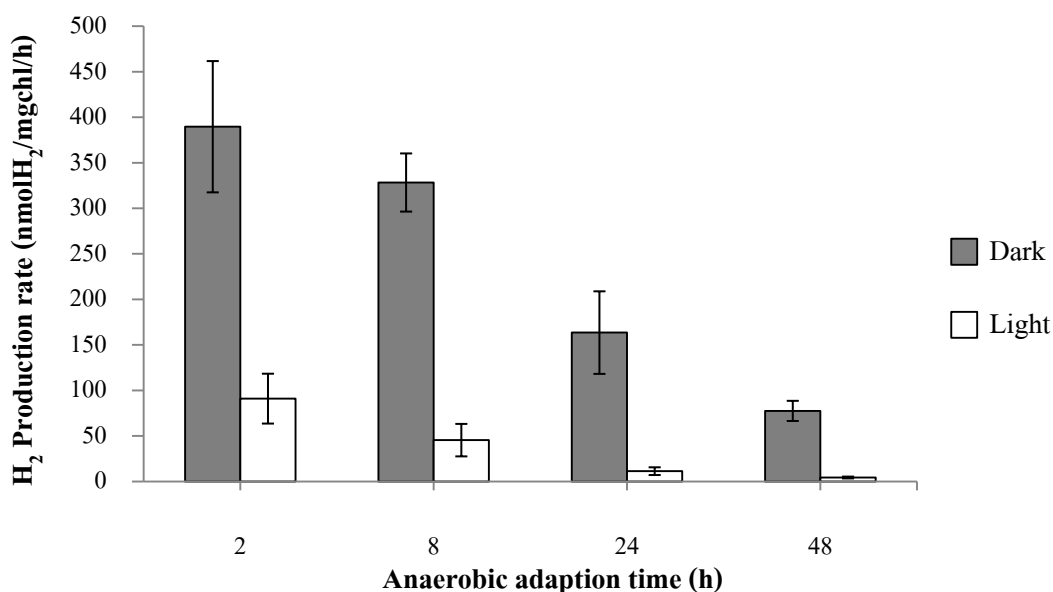


รูปที่ 4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์

4.4 ผลของระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและผลของแสงต่อการผลิต

ไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว BG11₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว นำไปบ่มในที่มืดและที่สว่างภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่บ่มในที่มืดภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่อชั่วโมงสูงสุดคือ 389.630 ± 72.084 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.2) ในสภาวะที่มีแสง ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าเซลล์ที่บ่มในสภาวะมืด เนื่องจากในสภาวะที่มีแสง เซลล์จะมีปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งออกซิเจน ที่ได้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจิเนสหรือเอนไซม์ไนโตรจิเนสในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะปราศจากออกซิเจน (Fay, 1992) นอกจากนี้ ยังพบว่า การบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดใน 2 ชั่วโมงแรกของการบ่ม หลังจากนั้น อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์จะลดลง ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในระยะเริ่มต้นของการบ่มการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจิเนสจะมีประสิทธิภาพสูงสุด เซลล์จะมีสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนอยู่มาก ดังนั้น ในการทดลองครั้งต่อไป จึงเลือกใช้ระยะเวลาการบ่มในที่มืดภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

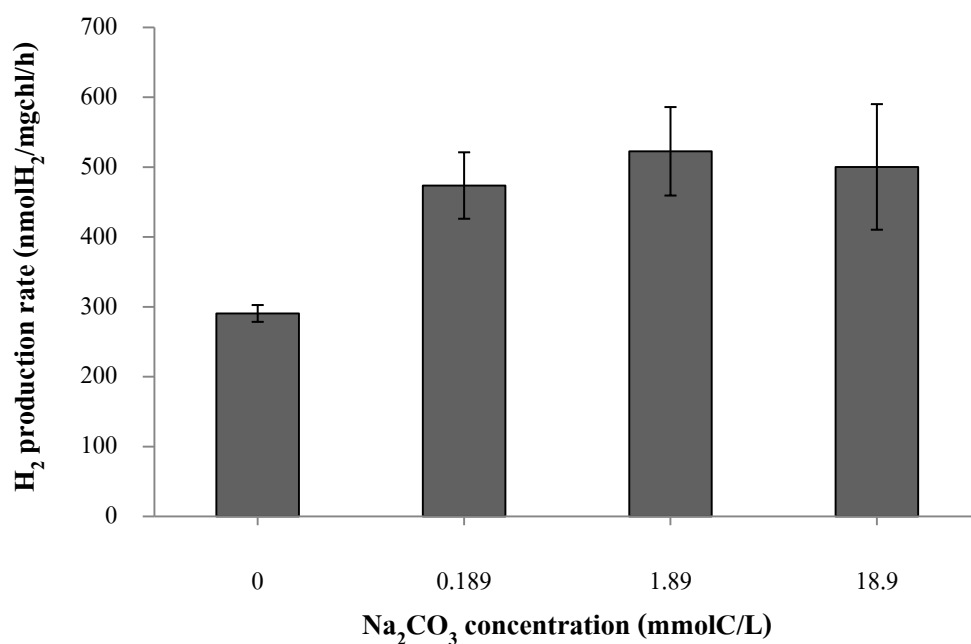


รูปที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการแปรผันระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศและการให้แสง

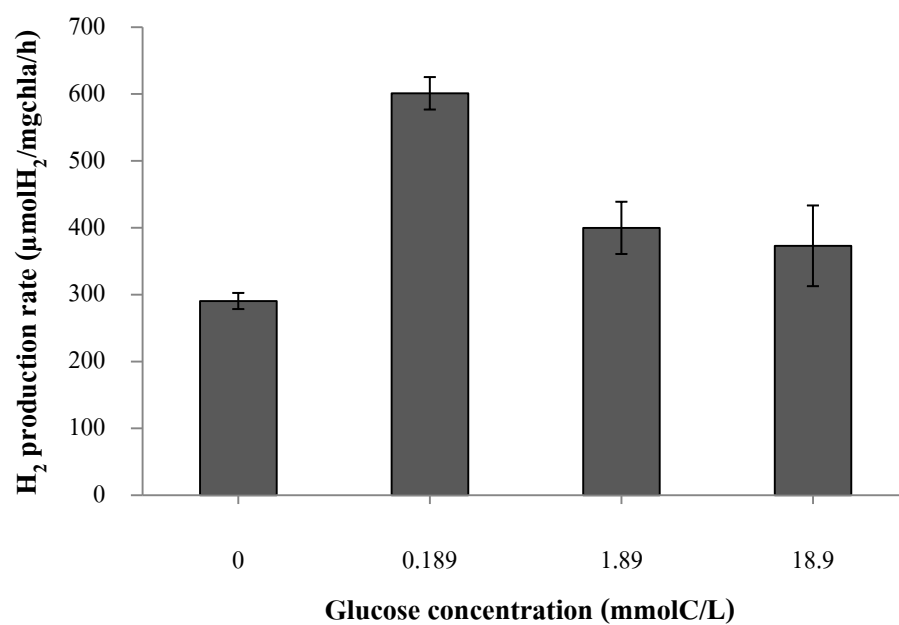
4.5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มา ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเหลว BG11₀ ที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตตั้งแต่ 0, 0.189, 1.89 และ 18.9 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร และในอาหารเหลว BG11₀ ที่เติมน้ำตาลกลูโคสแทนโซเดียมคาร์บอเนต โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 0, 0.189, 1.89 และ 18.9 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว นำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้โซเดียมคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1.89 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 522.513 ± 63.335 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ (รูปที่ 4.3) โดยทั่วไป แหล่งคาร์บอนในอาหารจัดเป็นแหล่งของอิเล็กตรอนแหล่งหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยส่งผลต่อกิจกรรม การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Dutta et al., 2005) ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ เพื่อสร้างสารประกอบคาร์โบไฮเดรตผ่านวิถี Calvin-Benson เมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ละลายน้ำจะได้สารประกอบคาร์บอนที่อยู่ในรูปของคาร์บอนิก ดังนั้น ในการทดลองนี้ การเพิ่มปริมาณคาร์บอนจากโซเดียมคาร์บอเนตจึงเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งอิเล็กตรอน ซึ่งเป็นสับสเตรทให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตจากอาหารสูตรปกติสามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้จนถึงระดับหนึ่ง หลังจากนั้น การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนตจะไม่มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้โซเดียมคาร์บอเนต (รูปที่ 4.4) โดยทั่วไปแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกออโตโทรป (Autotroph) ซึ่งสามารถสังเคราะห์สารอาหารได้เองจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ ทั้งนี้ไซยาโนแบคทีเรียมีความหลากหลาย บางชนิดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากภายนอกได้ แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทำให้เกิดความแตกต่างของตัวให้อิเล็กตรอนที่แตกต่างกันและมีต่อการผลิตไฮโดรเจน (Datta et al., 2000) จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 601.052 ± 24.288 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และพบว่ามีการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 4.4) น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากจะไปเพิ่มการรีดิวซ์ NAD(P)H ให้เอนไซม์ไบโอไดเรกชันนัลไฮโดรจีเนสที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตไฮโดรเจน ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง ทำให้เซลล์ใช้พลังงานในการขับน้ำตาลที่มากเกินไปออกนอกเซลล์ จึงทำให้ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Baebprasert et al., 2010) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน คือ 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร



รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนต

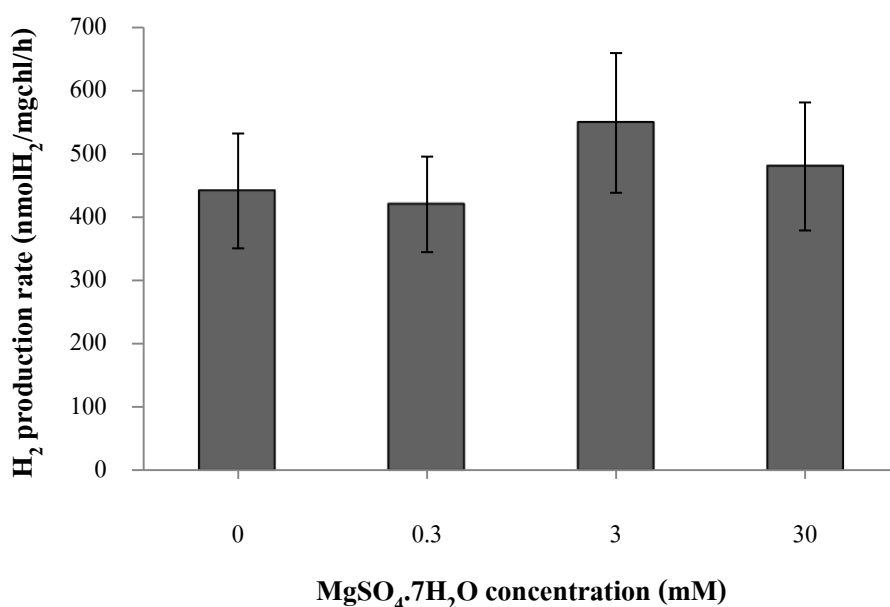


รูปที่ 4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

4.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท

AngS1

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเหลว BG11₀ ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตตั้งแต่ 0, 0.3, 3 และ 30 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์มากระจายในอาหารเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว นำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11₀ ที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 549.066 ± 110.482 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูป 4.5)



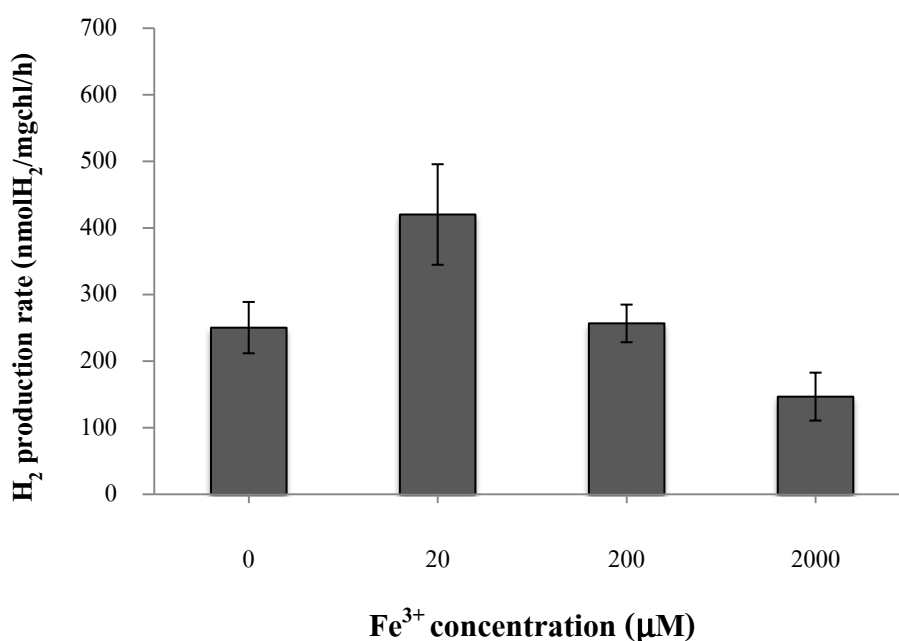
รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต

ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียได้ ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารหลัก ชนิดหนึ่งที่สำคัญสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ซึ่งมีความสำคัญในการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ โดย ซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมทไทโอนีน การที่เซลล์ขาดแหล่งซัลเฟอร์จะทำให้การสังเคราะห์โปรตีนเป็นไปอย่างไม่ถูกต้องและสมบูรณ์ ทำให้เซลล์มีกิจกรรมต่างๆ ลดลง รวมถึงการผลิตไฮโดรเจนด้วย จากรูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนคือ 3 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากเซลล์ได้รับปริมาณของซัลเฟอร์ที่เพียงพอและเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ความเข้มข้นของ

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตที่มากกว่า 3 มิลลิโมลาร์ จะทำให้โปรตีนในระบบแสงสองทำงานดีขึ้นและผลิตออกซิเจนมายับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง

4.7 ผลของความเข้มข้นของเหล็กไอออนต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1

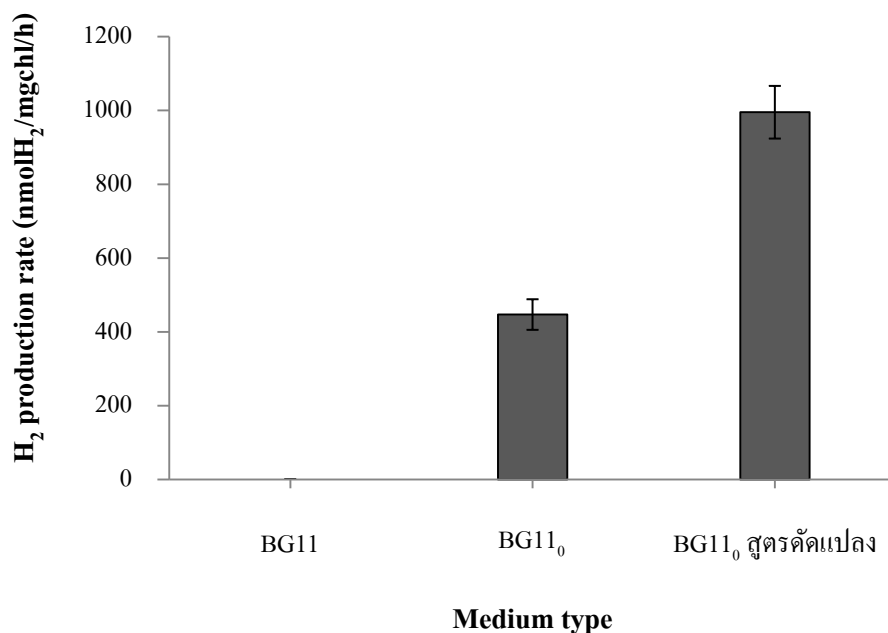
จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเหลว BG11₀ ที่แปรผันความเข้มข้นของ Fe^{3+} ตั้งแต่ 0, 20, 200 และ 2,000 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว และนำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11₀ ที่มีความเข้มข้นของ Fe^{3+} 20 ไมโครโมลาร์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีอัตราผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 420.199 ± 75.530 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูป 4.6) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า เหล็กเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่มีผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์และการตรึงไนโตรเจน โดยเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Kupper et al., 2008) จากการทดลองนี้พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Fe^{3+} 20 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Fe^{3+} เป็น 200 และ 2,000 ไมโครโมลาร์ เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าธาตุเหล็กในอาหารเพาะเลี้ยงปกติมีความเข้มข้นเพียงพอต่อการเจริญ รวมทั้งการนำไปใช้เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของ Fe^{3+} ที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนคือ 20 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของ Fe^{3+}

4.8 ผลของสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหาร 3 ชนิด คืออาหาร BG11, อาหาร BG11₀ (อาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน) และอาหาร BG11₀ สูตรดัดแปลง (อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งได้จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.5-4.7 โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ Fe^{3+} 20 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารที่ทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว นำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่บ่มในอาหารสูตรดัดแปลงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 995.165 ± 71.349 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตมากกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร BG11₀ อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.7) แต่ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ที่บ่มในอาหาร BG11 (รูปที่ 4.7) การที่เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11₀ สูตรดัดแปลง เนื่องจากเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งซัลเฟต และแหล่ง Fe^{3+} ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าเซลล์จะไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน แสดงว่าไนโตรเจนจะมีผลยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงและปัจจัยภายนอกที่เหมาะสม

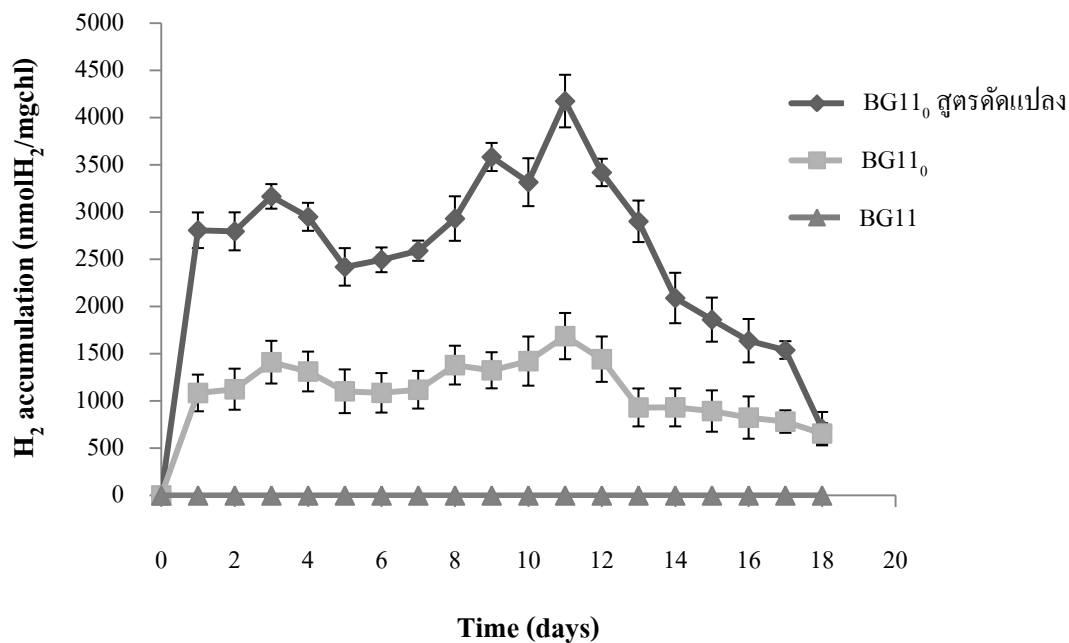


รูปที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, อาหาร BG11₀ (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน) และอาหาร BG11₀ สูตรดัดแปลง (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ Fe³⁺ 20 ไมโครโมลาร์)

4.9 ผลของสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนในระยะยาวของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหาร 3 ชนิด คืออาหาร BG11, อาหาร BG11₀ และอาหาร BG11₀ สูตรดัดแปลงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ Fe³⁺ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหารที่ทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดเตาสารละลายเซลล์ลงในขวดแก้ว นำไปปรับตัวในสภาวะปราศจากอากาศในที่มืด เป็นเวลา 18 วัน และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนทุก 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่บ่มในอาหารสูตรดัดแปลงมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร BG11₀ และไม่พบการผลิตในเซลล์ที่บ่มในอาหาร BG11 (รูปที่ 4.8) จะเห็นได้ว่า เซลล์ที่บ่มในอาหาร BG11₀ สูตรดัดแปลงมีการผลิตไฮโดรเจนคงที่หลังจากวันที่ 1 ของการบ่มและเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เซลล์จะมีการสะสมไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นในระดับหนึ่งเท่านั้น โดยพบว่าเซลล์มีการสะสมไฮโดรเจนสูงที่สุดในวันที่ 11 ของการบ่ม ซึ่งมีผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ $4,174.364 \pm 278.324$ นาโนโมล

ไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ดังนั้น อาหารที่มีการดัดแปลงสูตรตามการศึกษาข้างต้นมีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1



รูปที่ 4.8 ผลผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, อาหาร BG11₀ (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน) และอาหาร BG11₀ สูตรดัดแปลง (อาหาร BG11 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจนและมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ Fe^{3+} 20 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 18 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำของนาข้าวในประเทศไทย สรุปได้ดังนี้

1. ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำบริเวณนาข้าวของประเทศไทย สามารถแยกได้บริสุทธิ์ทั้งหมด 18 ไอโซเลท แบ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท และสาหร่ายสีเขียวจำนวน 9 ไอโซเลท และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถแบ่งกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะเป็นเส้นสายยาวไม่แตกแขนง ไม่มีเซลล์พิเศษอย่างเซลล์เฮเทอโรซิสต์และเซลล์อะคินีท กลุ่มที่ 2 มีรูปร่างเป็นแบบถังเบียร์ เซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายสายโซ่ กลุ่มที่ 3 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างท่อน กลุ่มที่ 4 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม ส่วนสาหร่ายสีเขียวสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลม อยู่แบบกระจายตัว กลุ่มที่ 2 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

2. ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อ ใช้เซลล์ที่มีอายุ 1 สัปดาห์

3. ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ภายหลังการปรับตัวให้อยู่ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิต 389.630 ± 72.084 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

4. จากการศึกษการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งซัลเฟอร์ และ เหล็กไอออนในอาหาร BG11₀ ที่มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11₀ ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และ ความเข้มข้นของ Fe^{3+} 20 ไมโครโมลาร์

5. จากการศึกษอัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ในอาหาร BG11, BG11₀ และอาหาร BG11₀ ที่แปรผันความเข้มข้นของกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ Fe^{3+} 20 ไมโครโมลาร์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ในอาหารสูตรดัดแปลง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 995.165 ± 71.349 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

6. จากการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียไฮโซเลท AngS1 ในอาหาร BG11, BG11₀ และอาหาร BG11₀ ที่แปรผันความเข้มข้นของกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต 3 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ Fe^{3+} 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียไฮโซเลท AngS1 มีการผลิตไฮโดรเจนเป็นระยะเวลา 18 วัน และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ $4,174.364 \pm 278.324$ นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในวันที่ 11 ของการบ่ม

บรรณานุกรม

- ธรรมบุญ ศรีทวงค์. 2550. พลังงานไฮโดรเจน. สืบค้นเมื่อ 10 มกราคม 2557. จาก <http://www.kmitnbxmie8.com/index.php?lay=show&ac=article&id=568260&Ntype=3>.
- ประพันธ์ คูชลธรา . 2551. การลดปริมาณสารในกระบวนการแกซิฟิเคชันของชีวมวลโดยตัวเร่งปฏิกิริยา $K_2CO_3/NiO/Al_2O_3$ ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ยุวดี พิรพรพิศาล . 2546. สาหร่ายวิทยา(Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- สมนึก บุญพาไสว. 2549. เซลล์เชื้อเพลิง สืบค้นเมื่อ 10 มกราคม 2557. จาก http://www.ipst.ac.th/design/document/Fuel_cell.pdf.
- Ananyev G, Carrieri D, Dismukes GC (2008) Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium "*Arthrospira maxima*". Appl Environ Microbiol 74:6102–6113
- Antal TK, Lindblad P (2005) Production of H_2 by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. J Appl Microbiol 98:114–120
- Baebprasert W, Lindblad P, Incharoensakdi A (2010) Response of H_2 production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Int J Hydrog Energy 35:6611–6616
- Bergman B, Gallon JR, Rai AN, Stal LJ (1997) N_2 fixation by non-heterocystous cyanobacteria. FEMS Microbiol Rev 19:139–185
- Datta M, Nikki G, Shah V (2000) Cyanobacterial hydrogen production. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 16:8-9
- Dutta D, De D, Chaudhuri S, Bhattacharya SK (2005) Hydrogen production by cyanobacteria. Microb Cell Fact 4:36–46
- Eric M, Richard R (2000) Photoelectrochemical hydrogen production: Proceeding the 2000 Hydrogen Program Review. 1:1–14
- Fay P (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiological Reviews 56:340-373
- Hall DO, Markov SA, Watanabe Y and Rao KK (1995) The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. Photosynth Res 46:159-167

- Happe T, Schuetz K and Boehme H (2000) Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC29413. *J Bacteriol* 182:1624-1631
- Heyer H, Stal LJ and Krumbein WE (1989) Simultaneous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limnosa* incubated anaerobically in the dark. *Arch Microbiol* 151:1558-1564
- Howarth DC and Codd GA (1985) The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 131:1561-1569
- Kufryk G (2013) Advances in Utilizing Cyanobacteria for Hydrogen Production. *Advances in Microbiology* 3:66-68
- Kumazawa S, Mitsui A (1981) Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by saltwater blue-green algae, *Oscillatoria* sp. Miami BG7. I. Enhancement through limiting the supply of nitrogen nutrients. *Int J Hydrog Energy* 6:339-348
- Kupper H *et al* (2008) Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation. *New Phytol* 179:784-798
- Lambert GR, Smith GD (1977) Hydrogen formation by marine blue-green algae. *FEBS Lett* 83:159-162
- Lee YK, Shen H (2004) Basic culturing techniques. In : Richmond, A. [Eds], *Handbook of microalgal culture*. IS Press. p40-50
- Lindberg P (2003) Cyanobacterial hydrogen metabolism-Uptake hydrogenase and hydrogen production by nitrogenase in filamentous cyanobacteria. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*
- Madawar D, Garg N, Shah V (2000) Cyanobacterial hydrogen production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:757-767
- Maneeruttanarungroj C, Lindblad P, Incharoensakdi A (2011) A newly isolated green algae, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 35:13193-13199
- Masukawa H, Nakamura K, Mochimaru M and Sakurai H (2001) Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria. In: Miyake J, Matsunaga T, San Pietro A, editors. *Biohydrogen II*. Elsevier pp63-66.

- Mazel D, Houmard J, Castets AM, Tandeau de Marsac N (1990) Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *J Bacteriol* 172:2755–2761
- Moezelaar R and Stak LJ (1994) Fermentation in the unicellular cyanobacterium *Microcystis* PCC 7806. *Arch Microbiol* 162:63–69
- Phlips EJ, Mitsui A (1983) Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7. *Appl Environ Microbiol* 45:1212–1220
- Pin CM, Jlanping Y, Carrle E, Maria LG (2009) Photobiological hydrogen production—Prospects and challenge. *Microbe* 4:275–280
- Posewitz MC, Dubini A, Meuser JE, Seibert M, Ghirardi ML (2009) Hydrogenases, hydrogen production and anoxia. In *Organellar and Metabolic Processes*, 2ed. Edited by Stern DB. In *The Chlamydomonas Sourcebook*, Vol. 2. Edited by Harris EE. The Chlamydomonas Sourcebook. Vol. 2 Academic Press. 217–246.
- Serebryakova LT, Sheremetieva M, Tsygankov AA (1998) Reversible hydrogenase activity of *Gloeocapsa alpicola* in continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* 166:89–94
- Serebryakova LT, Sheremetieva M, Lindblad P (1999) Hydrogenase activity of the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU743 under conditions of nitrogen limitation. *Microbiology* 68:249–253
- Shah V, Garg N, Madamwar D (2001) Ultrastructure of the fresh water cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production. *FEMS Microbiol Lett* 194:71–75
- Sveshnikov DA, Sveshnikova NV, Rao KK and Hall DO (1997) Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. *FEBS Microbiol Lett* 147:297–301
- Taikhao S, Junyapoon S, Incharoensakdi A, Phunpruch S. (2013) Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *J Appl Phycol* 25:575–585
- Troshina O, Serebryakova LT, Sheremetieva M, Lindblad P (2002) Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU743 during fermentation. *Int J Hydrog Energy* 27:1283–1289
- Van der Oost J, Bulthuis BA, Feitz S, Krab K and Kraayenhof R (1989) Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC7822. *Arch Microbiol* 152:415–419

Weissman JC, Benemann JR (1977) Hydrogen production by nitrogenstarved cultures of *Anabaena cylindrica*. Appl Env Microbiol 33:123–131

กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า. วันที่สืบค้น 4เมษายน 2556. ที่มา http://www.greencarcongress.com/2004/11/milestone_for_h.html.

ภาคผนวก ก

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

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
$\text{FeNH}_4\text{.Citrate}$ (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15

นาที

ภาคผนวก ข

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

ส่วนประกอบอาหาร

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

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

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นางสาวธัญญา พันธุ์พุกษ์

เพศ ☐ ชาย ☒ หญิง วันเดือนปีเกิด 21 พฤศจิกายน 2512 อายุ 43 ปี

สถานภาพ ☐ โสด ☒ สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2534
วท.ม.	เทคโนโลยีทางชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
Dr. rer. nat	Biology/Botany	Philipps University, Marburg Germany	2542

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ชีววิทยาระดับโมเลกุลของมัยโคแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

เทคโนโลยีชีวภาพของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2537	รางวัลเรียนดี	มูลนิธิแถบนิลนิต

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2535-36	ทุนผลิตและพัฒนาอาจารย์	ทบวงมหาวิทยาลัย
2538-42	Deutscher Akademischer Austausch-Dienst (DAAD) Scholarship	DAAD, Germany
2544-45	Sustainable Use of Marine Microorganisms and Marine Natural Chemicals	JICA, Japan
2543-45	การศึกษายีน <i>betB</i> ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด ทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i>	สวทช

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2544-45	การค้นหายีนที่ผลิตไฮโดรจีเนสและการจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) และ Southern blot	คณะวิทย์ สจล.
2545-46	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hup</i> ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน <i>Anabaena siamensis</i>	คณะวิทย์ สจล.
2546-47	การตัดส่วนของยีน <i>hup</i> ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน <i>Anabaena siamensis</i> เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน	คณะวิทย์ สจล.
2547-48	การศึกษาการส่งสัญญาณควอรัมเซนซิงจากแบคทีเรียในทะเล	คณะวิทย์ สจล.
2548-49	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย <i>Anabaena siamensis</i>	ส่งเสริมนักวิจัย คณะวิทย์ สจล.
2547-48	Cloning and functional characterization of squalene-hopene cyclase (SHC) from <i>M. tuberculosis</i>	Biotec
2549-50	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i>	คณะวิทย์ สจล.
2549-50	การศึกษาริคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณในแบคทีเรียแกรมลบ	บัณฑิตวิทยาลัย สจล.
2548-50	Molecular characterization of genes associated with resistant phenotype of Thai MDR-TB isolates	Drug resistant tuberculosis research fund, Siriraj Foundation
2550-51	การผลิตไบโอไฮโดรเจนพลังงานทดแทนแหล่งใหม่จากจุลสาหร่าย	คณะวิทย์ สจล.
2552-53	การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ	คณะวิทย์ สจล.
2553-54	สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาเพื่อผลิตไฮโดรเจน	คณะวิทย์ สจล.
2554-55	การประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i>	คณะวิทย์ สจล.

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2554-56	การตรวจหากลไกการดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycoside ที่ยังไม่เคยมีรายงานในเชื้อวัณโรค	งบรายได้ คณะวิทย์ สจล.
2555-56	การผลิตพลาสติกชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย	วช
2555-56	การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Anabaena siamensis</i> โดยการตรึงเซลล์	คณะวิทย์ สจล.
2556-57	การผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากน้ำข้าวของประเทศไทย	คณะวิทย์ สจล.

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

- Taikhao, S., Incharoensakdi A. and **Phunpruch, S.** 2015 Dark fermentative hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in seawater. *Journal of Applied Phycology* 25:187-196.
- Sowajassatakul A, Prammananan T, Chaiprasert A and **Phunpruch S.** 2014 Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand. *BMC Microbiology* 14: 165.
- Ongmali R, **Phunpruch S** and Thawornchaisit U. 2014 Cellular lipid production of a heterotrophic bacterium isolated from poultry processing wastewater. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 36(3): 359-365.
- Phunpruch S**, Warit S, Suksamran R, Billamas P, Jaitrong S, Palittapongarnpim P, Prammananan T. 2013 A role for 16S rRNA dimethyltransferase (ksgA) in intrinsic clarithromycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 41: 548-551.
- Taikhao, S., Junyapoon S, Incharoensakdi A. and **Phunpruch, S.** 2013 Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Journal of Applied Phycology* 25(2):575-585.
- Prammananan T, **Phunpruch S**, Jaitrong S, Palittapongarnpim P. *Mycobacterium tuberculosis uvrC* essentiality in response to UV-induced cell damage. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 2012; 43: 370-375.
- Nanasombat, S., **Phunpruch, S.** and Jaichalad, T. 2012 Screening and identification of lactic acid bacteria from raw seafoods and Thai fermented seafood products for

- their potential use as starter cultures. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 34(3): 255-262.
- Junyapoon, S., Buala, W. and **Phunpruch, S.** 2011 Hydrogen production with *Escherichia coli* isolated from municipal sewage sludge. Thammasat International Journal of Science and Technology. 16(1): 9-15.
- Nanasombat, S., **Phunpruch, S.**, Sriwong, N., Jaichalad, T., Onnom, W. and Odthon, S. 2008 Characterization of the antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from raw fish and nham-plaa. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 42: 747-757.
- Prammananan, T., Cheunoy, W., Taechamahapun, D., Yorsangsukkamol, J., **Phunpruch, S.**, Phdarat, P., Leechawengwong, M. and Chaiprasert, A. 2008 "Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of a rapid methof for mutation detection." Clin. Microbiol. Infect. 14: 446-453.
- Phunpruch, S.**, Baebprasert, W., Thongpeng, C. and Incharoensakdi, A. 2006 "Nucleotide sequencing and transcriptional analysis of uptake hydrogenase genes in the filamentous N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" Journal of Applied Phycology 18: 713-722.
- Pramananan, T., **Phunpruch, S.**, Tingtoy, N., Srimuang, S. and Chaiprasert, A. 2006 "Distribution of *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis patters among *Mycobacterium avium* complex isolates in Thailand." J. Clin. Microbiol. 44(10): 3819-3821.
- Gutekunst, K., **Phunpruch, S.**, Schwarz, C., Schuchart, S., Schulz-Friedrich, R. And Appel, J. 2005 "LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator." Mol. Microbiol. 58(3): 810-823.
- Papsing, C. and **Phunpruch, S.** 2005 "Molecular cloning of the dinitrogenase genes in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" In : AgBiotech Graduate Conference II 16-17 May, 2005 Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand. p.131.
- Phunpruch, S.**, Thongpeng, C., Baebprasert, W. and Incharoensakdi, A. 2005 "Cloning, sequencing and expression of the uptake hydrogenase genes in the nitrogen-fixing

- cyanobacterium *Anabaena siamensis*” In : 2nd National conference on algae and plankton, 23-25 March 2005, Holiday Garden hotel, Chaingmai, Thailand. p. OP1-12.
- Baebprasert, W. and **Phunpruch, S.** 2004 “The degradation of acyl homoserine lactone signal molecule of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27823 by the recombinant acyl homoserine lactonase enzyme.” Journal of Science Ladkrabang. 13(2):22-37. (in Thai)
- Phunpruch, S.** and Kamino, K. 2004 “Study on the acyl-homoserine lactone production of a gram-negative bacterium *Sphingomonas xenophaga* by co-cultivation with *Variovorax paradoxus*.” Kasetsart Journal (Nat. Sci.) 38:21-28.
- Kutako, M., Powthongsook, S., and **Phunpruch, S.** 2004 “Batch and continuous cultivation of a marine diatom *Amphora delicatissima* AM9901 under heterotrophic condition.” Journal of Scientific Research Chulalongkorn University (Section T) 3:309-321. (in Thai)
- Phunpruch, S.,** and Baebprasert, W. 2003 “Isolation of quorum sensing-signal producing bacteria from seawater and artificial sponges collected at Laem Taen.” Suranaree J. Sci. Technol. 10(4):307-316.
- Phunpruch, S.** 2003 “Signaling and Communication of Bacterial Cells.” Journal of Science Ladkrabang 12(1):36-43. (in Thai)
- Phunpruch, S.** 2002 “Osmoprotective Substances in Cyanobacteria.” King Mongkut’s Agricultural Journal 20(2): 73-79. (in Thai)
- Phunpruch, S.,** Yagop, B., Poempoonpattana, P., Rodbamreo, P., and Incharoensakdi, A. 2002 “Screening of hydrogenase gene in cyanobacteria by polymerase chain reaction.” Journal of Science Ladkrabang 11(1):22-34. (in Thai)
- Phunpruch, S.** 2001 “Hydrogen from Cyanobacteria : A New Alternative Energy Source.” Suranaree J. Sci. Technol. 8(4):247-252. (in Thai)
- Appel, J., **Phunpruch, S.,** Steinmueller, K., and Schulz, R. 2000 “The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC6803 works as an electron valve during photosynthesis.” Arch. Microbiol. 173(5-6):333-338.

การเสนอผลงานวิชาการ

- Rattana, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Hydrogen production of the green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 under heterotrophic conditions. In: The

- 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 4-6 October, 2010. Pattaya, Thailand. p.114-120.
- Ongmali, R., Thawornchaisit, U. and **Phunpruch, S.** Lipid-accumulating capacity of bacteria isolated from a poultry processing wastewater. In: The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 4-6 October, 2010. Pattaya, Thailand. p.121-126.
- Taikhao, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Effect of sulphate and nitrate limitations on hydrogen production of a unicellular halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: Commission on Higher Education Congress III- University Staff Development Consortium. 9-11 September, 2010. Royal Cliff Grand Hotel and Spa, Pattaya, Thailand. p.364.PD-27
- Phunpruch, S.**, Taikhao, S. and Incharoensakdi, A. Hydrogen production of a halophilic unicellular cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: Cyanobacteria&Algae Biotechnology Symposium. 31 March, 2010. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. p.13
- Suksamran, R., Prammananan, T., Warit, S. and **Phunpruch, S.** Study of transposon localization on genome of macrolide-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mutants. In: The 11th Graduate Research Conference. 12 February 2010. Khon Kaen, Thailand. 907-915.
- Taikhao, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Hydrogen production of a unicellular halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT Asian Core Program & The 7th Conference on Lactic Acid Bacteria in Thai Food and Feed Industries and The 2009 Asian Bio-Hydrogen Symposium. 26-28 August, 2009 Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. p.47.Hy3O1
- Rattana, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Hydrogen production of a unicellular green alga *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR8261. In: The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT Asian Core Program & The 7th Conference on Lactic Acid Bacteria in Thai Food and Feed Industries and The 2009 Asian Bio-Hydrogen Symposium. 26-28 August, 2009 Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. p.146.Hy3P1

- Phunpruch, S.**, Baebprasert, W., Ratanajaraya, C. and Thongpeng, C. 2004 “Use of the expression recombinant enzyme lactonase from *Agrobacterium tumefaciens* for the study of growth and signaling in gram-negative bacteria.” In : “The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference”, Kasetsart University, Bangkok, 3-6 February 2004, p.143-151. (in Thai)
- Phunpruch, S.** and Kamino, K. 2004 “Study on the acyl-homoserine lactone production of a gram-negative bacterium *Sphingomonas xenophaga* by co-cultivation with *Variovorax paradoxus*.” In : “The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference”, Kasetsart University, Bangkok, 3-6 February 2004, p.332-341.
- Baebprasert, W., Thongpeng, C., and **Phunpruch, S.** 2003 “Quorum sensing signal producing bacteria isolated from seawater and artificial sponges collected in Thailand.” In : “BioThailand2003”, PEACH, Pattaya, 17-20 July 2003, p.244.
- Phunpruch, S.** and Kamino, K. 2003 “Utilization of quorum sensing signal degrading enzyme from *Variovorax paradoxus* in the gram-negative bacterial population control.” In : “BioThailand2003”, PEACH, Pattaya, 17-20 July 2003, p.212.
- Kutako, M., Powtongsook, S., **Phunpruch, S.** and Tantiwaranurak, C. 2002 “Heterotrophic Growth of a Marine Diatom *Amphora delicatissima* AM9901 in Batch Cultivations.” In : The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology 12-15 November, 2002 Hotel Sofitel Orchid, Khon Kaen, Thailand. p.42. (in Thai)
- Kutako, M., Powtongsook, S., and **Phunpruch, S.** 2002 “Effects of organic nutrient sources, glucose and aeration on heterotrophic growth of a marine diatom *Amphora delicatissima* AM9901 in dark cultivation” In : 28th Congress on Science and Technology of Thailand 24-26 October 2002, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. p.13-36-O (in Thai)
- Appel, J., **Phunpruch, S.**, Steinmueller, K., and Schulz, R. 1999 “The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC6803 is functioning as an electron valve during photosynthesis.” In : “IV European workshop on the molecular biology of cyanobacteria”, Humbolt-University, Berlin, 15-17 September 1999
- Appel, J., **Phunpruch, S.**, and Schulz, R. 1998 “Hydrogenase(s) in *Synechocystis*: Tools for photohydrogen production?” In : “BioHydrogen Proceedings of the International Conference on Biological Hydrogen Production”, Kona, Hawaii, USA, 23-26 July 1997, Zaborsky, O.R. (ed.), Plenum Press, New York, London, p.189-196.

- Schulz, R., Appel, J., **Phunpruch, S.**, Stangier, K., and Wuenschiers, R. 1998 "Biotechnological approach for future use of solar energy: Photohydrogen production by the green *alga Scenedesmus obliquus* and the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." In : "Hydrogen Energy Progress XII Proceeding of the 12th World Hydrogen Energy Conference", Buenos Aires, Argentina, 21-26 July 1998, Vol. III, Bolcich, J.C., and Veziroglu, T.N. (eds.), p.2069-2078.
- Wuenschiers, R., Appel, J., Stangier, K., **Phunpruch, S.**, and Schulz, R. 1996 "Investigations to apply biologically produced photohydrogen as a future energy source." In : "Biomass for energy and the environment Proceedings of the 9th European bioenergy conference", Vol. III, Chartier, P., Ferrero, G.L., Henius, U.M.m Hultberg, S., Sachau, J., and Winblad, M (eds), Pergamon, Elsevier Science, Oxford, New York, Tokyo, p.1668-1673.
- Incharoensakdi, A., and **Phunpruch, S.** 1996 "Environmental factors affecting the beta-carotene content in *Spirulina platensis*." In : "Proceedings of the 3rd Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology : Issues and Choices", Melia Hotel, Prachuabkhirikhan, 10-15 November 1996, p.587-592.