รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม purple non-sulfur

Bio-Hydrogen production from purple non-sulfur photosynthetic bacteria

พลสัณห์ มหาขันธ์

จุฑาพร แสวงแก้ว

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากแหล่งธรรมชาติ โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง ดิน, โคลนและน้ำ จาก จังหวัดนครราชสีมา, ขอนแก่น, ชัยภูมิ, สกลนครและมุกดาหาร จำนวน 65 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ โดยวิธี enrichment ใน Winogradsky column และในอาหารเหลว G5 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยการให้แสงที่มีความเข้มแสง 10,000 lux ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน แยกเชื้อจากตัวอย่างที่เกิดสีม่วง, น้ำตาลหรือแดง ทั้งใน Winogradsky column และในอาหารเหลว G5 โดย streak ลงในอาหาร Ormerod's agar ที่ใช้ malic acid เป็นแหล่งคาร์บอนและ glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มใน Desicator cabinet ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจน เลือกโคโลนีสีม่วง, น้ำตาลหรือแดง ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak plate แยกเชื้อได้ทั้งหมดจำนวน 50 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซ มีเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจำนวน 39 ไอโซเลทที่สามารถผลิตก๊าซได้ คัดเลือก 14 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซสูงมาทำการวัดการผลิตก๊าซอย่างละเอียดภายในระยะเวลา 20 วัน พบว่ามี 3 ไอโซเลทคือ sp 2/1-3, SK 1-6, HK 2- 3 มีความสามารถในการผลิตก๊าซสูงสุดเท่ากับ 4750 µl, 3000 µl, 5600 µl ในหลอดทดสอบปริมาตรต่างๆ เลือกไอโซเลทที่ผลิตก๊าซได้สูงที่สุดคือ HK 2-3 เพื่อขยายขนาดเลี้ยงเป็นปริมาตร 250 มิลลิลิตร พบว่าไอโซเลท HK 2-3 ผลิตก๊าซได้ 4000 µl เมื่อวัดการเจริญโดยหาน้ำหนักแห้งได้เท่ากับ 0.750 กรัมต่อลิตร pH เท่ากับ 7.40

Abstract

Photosynthetic bacteria were isolated from 65 samples of soil, mud and water which from Nakhon Ratchasima, Khon Kaen, Chaiyaphum, Sakon Nakhon and Mukdahan. The study of ability to produce biohydrogen was to be enrichment in Winogradsky column and test tube with G5 broth in anaerobic-light conditions as light intensity 10,000 lux, incubated at room temperature for 14 day. The samples that gave purple, brown or red colour in Winogradsky column and/or G5 broth were streaked on Ormerod's agar plate with malic acid as carbon source and glutamic acid as nitrogen source and incubated in desicator cabinet under nitrogen conditions. The 50 isolates which produced purple, brown or red colony were purified by cross streak plate. There were twenty-four high level gas producing isolates from 39 isolates of gas production strain. The isolate Sp2/1-3, SK 1-6 and HK 2- 3 could produce 4750 µl, 3000 µl, 5600 µl of gas in various volumn of testube in 20 days of incubation. The isolate HK 2-3 were selected to produce gas in 250 ml culture medium. The result showed that, this isolate could produce 4000 µl of gas, cells mass as 0.750 g/l of dry weight and pH was 7.4 in 20 days

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 จาก มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขอขอบคุณ นางสาวสิริพร ท้าวสูงเนิน นักศึกษาช่วยงานวิจัย ที่ได้ช่วยให้การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ลุล่วงไปด้วยดี และขอบขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ ทรัพยากร และทุนวิจัยบางส่วน ในการดำเนินการวิจัยนี้

พลสัณห์ มหาขันธ์

สารบัญ

เนื้อเรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญกราฟ	ช
บทที่ 1	
- บทนำ	1-4
- วัตถุประสงค์	5
- ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย	5
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	6-16
บทที่ 3	
- วัสดุอุปกรณ์	17
- เครื่องมือ	18
- อาหารเลี้ยงเชื้อ	18
บทที่ 4 วิธีดำเนินงานวิจัย	19
1. วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	19
1.1 การเก็บตัวอย่างดิน โคลนและน้ำในธรรมชาติ	19
2. การแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากแหล่งธรรมชาติ และทำให้บริสุทธิ์	20
2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยวิธี Winogradsky column	21
3. คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์	22
4. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง purple non- sulphur สายพันธุ์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน	23
4.1 คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดย วิธี Semi-solid agar และ Durham tube	23
5. ศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างระเอียดโดยการวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น โดยวิธีการแทนที่น้ำ	23
5.1 ศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างระเอียดในหลอดวัดก๊าซขนาด 8 และ 15 ml	23
5.2 ศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างระเอียดในขวดวัดก๊าซขนาด 120 และ 250 ml	24

สารบัญ(ต่อ)

เนื้อเรื่อง	หน้า
6. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	25
6.1 วิเคราะห์การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง และวิเคราะห์การหาน้ำหนักแห้ง ตั้งแต่วันที่ 0-24 วัน	25
7. วิเคราะห์พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงเชื้อ 24 วัน โดยใช้เครื่อง pH มิเตอร์	25
8. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง purple non-sulfur bacteria ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธี Gram's staining	26
9. การสกัด Bateriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ	26
บทที่ 5 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
1. ผลการทดลองการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากธรรมชาติและจาก Stock culture	27-29
2. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซเบื้องต้น	30-32
3. ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในระยะเวลา 20 วัน	33-38
4.ผลการวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน	39-44
5. ผลการวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน	45-48
6. ผลการวัด pH ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน	49-51
7. ผลการการสกัด Bateriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ	52-54
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	55-56
บรรณานุกรม	57-61
ภาคผนวก	62
ภาคผนวก ก.	
- สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	63-64
ภาคผนวก ข.	
- ภาพรูปร่าง ภาพวัดการเจริญ	65-88

สารบัญตาราง

เนื้อเรื่อง **หน้า**

ตารางที่ 1 การจัดจำแนก วงศ์, สกุล, สายพันธุ์ของ Phototrophic Bacteria มีดังนี้ 6

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนแบคทีเรียนสังเคราะห์แสงที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ 28

ตารางที่ 3 แสดงการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซเบื้องต้นของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 30

ตารางที่ 4 แสดงการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำ
ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในระยะเวลา 20 วัน 33

ตารางที่ 5 แสดงการวัดการเจริญของตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ 39

ตารางที่ 6 แสดงการวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มี
ความสามารถในการผลิตก๊าซ 45-47

ตารางที่ 6 แสดงการวัด pH ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ
ภายในระยะเวลา 24 วัน 49-51

ตารางที่ 7 การสกัด Bateriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง
ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ 52-53

สารบัญรูปภาพ

เนื้อเรื่อง **หน้า**

ภาพที่ 1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ Chromatiaceae 8

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ Rhodospirillaceae

ภาพที่ 2 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ Chlorobiaceae 9

ภาพที่ 3 กลุ่ม purple non-sulfur bacteria 10

ภาพที่ 4 แสดงกลไกการผลิตไฮโดรเจน 11

ภาพที่ 5 ลักษณะรูปร่างของเอนไซม์ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenise) 12

ภาพที่ 6 กลไกการตึงไฮโดรเจนด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) 13

ภาพที่ 7 ลักษณะของ COLUMN ภายหลังการบ่มไว้ 1-4 อาทิตย์ 21

ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเมื่อเลี้ยงโดยวิธี Winogradsky column บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาพวะแสงที่มีความเข้มข้นแสง 10000 lux เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 27

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะการแตกของวุ้นจากการผลิตก๊าซของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 32

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะการผลิตก๊าซของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในหลอดดักก๊าซ 32

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะการแทนที่น้ำของการผลิตก๊าซจากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 34

ภาพที่ 12 การทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 34-35

ภาพที่ 13 ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในอาหาร Ormerod's, ลักษณะโคโลนีและรูปร่าง ทางสันฐานวิทยา 65-78

ภาพที่ 14 แสดงภาพวัดการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในระยะเวลา 24 วัน 79-88

สารบัญกราฟ

เนื้อเรื่อง **หน้า**

กราฟที่ 1 แสดงผลการวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถ
ในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน 41

กราฟที่ 2 กราฟหาน้ำหนักแห้งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถ
ในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน 48

กราฟที่ 3 กราฟการสกัด Bateriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง
ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ 54

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาที่สำคัญของประเทศไทย คือ พลังงานที่มีราคาแพงและการขาดแคลนพลังงาน โดยเฉพาะพลังงานฟอสซิล จนต้องมีการนำเข้าพลังงานในแต่และปีมูลค่าหลายแสนล้านบาท และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้น พลังงานนำเข้าที่สำคัญ คือ พลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิง โดยเฉพาะน้ำมันดีเซล ที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งเมื่อสถานการณ์น้ำมันในตลาดโลกปรับตัวสูงขึ้น ทำให้ต้องนำเข้าน้ำมันในราคาที่แพง ส่งผลให้ราคาน้ำมันที่จำหน่ายในประเทศแพงขึ้น และทำให้ต้นทุนการผลิตทั้งในภาคอุตสาหกรรมและภาคเกษตรกรรมสูงตามไปด้วย (กระทรวงพลังงาน, 2549) รัฐบาลจึงหาวิธีการแก้ไขเพื่อลดการนำเข้าพลังงาน วิธีการหนึ่ง คือ การลดการใช้พลังงาน โดยรณรงค์ให้คนไทยทั้งประเทศประหยัดพลังงาน ซึ่งจะต้องทำอย่างต่อเนื่อง อีกวิธีการหนึ่ง คือ การหาพลังงานทดแทนภายในประเทศมาใช้ที่มีความยั่งยืนกว่าและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม พลังงานทดแทนที่สำคัญ คือ พลังงานจากพืชที่เรียกว่าเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel) (ธวัชชัย, 2548) โดยเป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากสิ่งมีชีวิตหรือผลผลิตจากการสร้างและสลายของสิ่งมีชีวิต เช่น มูลสัตว์ เป็นต้น (วิกิพีเดีย, 2549) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้มากมายในการใช้เชื้อเพลิงอื่น ๆ แทนการใช้น้ำมัน เช่น ก๊าซธรรมชาติ มีเทน หรือแอลกอฮอล์ในรูปแบบต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อเพลิงเหล่านี้ยังคงไม่ใช่ตัวเลือกที่ดีที่สุดในการผลิตพลังงานทดแทน เพราะปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงมากที่สุด คือ ด้านต้นทุนการผลิตและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่สะอาดที่สามารถใช้ทดแทนแหล่งพลังงานที่กำลังจะหมดลงได้ในอนาคต ซึ่งพลังงานนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ จึงมีความสำคัญในการหาพลังงานทดแทนเพื่อนำมาทดแทนพลังงานที่กำลังจะหมดลง เนื่องจากพลังงานไฮโดรเจนนั้นเป็นพลังงานที่สะอาด ในกระบวนการเผาไหม้นั้นได้ผลิตภัณฑ์ คือ น้ำ พลังงานและความร้อน ไม่มีก๊าซเรือนกระจกซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโลกร้อน และไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้หลายวิธี โดยสามารถใช้จุลินทรีย์ในการผลิตได้ซึ่งช่วยให้ได้พลังงานและไม่ก่อให้เกิดมลพิษ โดยกระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการทางชีวภาพเกิดขึ้นได้ด้วยกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่ม purple non-sulfur bacteria ซึ่งสามารถใช้กรดอินทรีย์เป็นตัวรีดิวส์หรือแหล่งให้อิเลคตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง และใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไร้ออกซิเจน (Lascelles, 1973)พลังงานไฮโดรเจนนับเป็นพลังงานทดแทนรูปแบบหนึ่งที่หลายคนอาจจะมองข้ามไป โดยไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่มีศักยภาพสูง สามารถปลดปล่อยพลังงานได้ปริมาณมาก ผลิตได้จากหลายแหล่ง และเป็นพลังงานที่สามารถแปลงเป็นพลังงานอื่นได้ง่าย (เอ็นเนอจี พลัส, 2547)

กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนโดยการใช้พลังงานแสงอาทิตย์ การสลายตัวจากความร้อนโดยตรง (Themolysis) การอาศัยวัฏจักรทางเทอร์โมเคมี (themochemical cycle) กระบวนการโฟโตไลซีส (photolysis) ซึ่งรวมถึงกระบวนการโฟโตอิเล็คโทรไลซัส (photoelectrolysis) กระบวนการโฟโตไลซีสแบบใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalytic photolysis) และกระบวนการโฟโตไลซีสทางชีวภาพ (biophotolysis)

คุณสมบัติของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำที่เป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดของสิ่งมีชีวิตบนโลก เป็นโมเลกุลมีทั่วไปตามธรรมชาติ บรรยากาศในโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ppm. มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุล เท่ากับ 436 kJ/mol (104 kcal/mol) ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิ ใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยนิวเคลียส์ อยู่กลาง ภายในนิวเคลียส์ ประกอบด้วยโปรตอน และนิวตรอน และมีอิเลคตรอนวิ่งรอบนอก เหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทปขึ้นกับจำนวนโปรตอน และจำนวนนิวตรอนที่ต่างกัน ดังนี้

1. ไฮโดรเจน (Hydrogen) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 1.0078
2. ดิวเทอเรียม (Deuterium) มีจำนวนโปรตอน 2 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 2.0141
3. ตริเที่ยม (Tritium) มีจำนวนโปรตอน 3 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 3.0161

ลักษณะทั่วไปของไฮโดรเจนทั้ง 3 สถานะ ไฮโดรเจนที่เป็นของแข็ง ไม่มีสี โครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม MolarVolume = 22.56 cm3/mol ไฮโดรเจนที่เป็นของเหลวไม่มีสี ค่า Viscosity ต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว ไฮโดรเจนที่เป็นก๊าซ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ ก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม

การผลิตไฮโดรเจน

ในปัจจุบันก๊าซไฮโดรเจนผลิตได้จากวัตถุดิบสองแหล่งหลัก คือ เชื้อเพลิงฟอสซิล จำพวกก๊าซธรรมชาติ ถ่านน้ำมัน และเชื้อเพลิงจากพลังงานหมุนเวียน เช่น ชีวมวล และน้ำ เทคโนโลยีในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบ่งได้เป็น 3 เทคโนโลยีหลัก ได้แก่ Thermal Processes, Electrolytic Processes และ Photolytic Processes ดังนี้

Thermal Process

เป็นการใช้ความร้อนกับแหล่งพลังงาน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน ชีวมวล เชื้อเพลิงเหลว เป็นต้นเพื่อให้ได้ ผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจน เช่น Reforming Gasification Partial Oxidation High-temperature Water Splitting

Electrolytic Process

เป็นการใช้ไฟฟ้าเพื่อแยกน้ำเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจะไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศแต่ขึ้นกับแหล่งในการผลิตกระแสไฟฟ้าตัวอย่างของแหล่งในการผลิตกระแสไฟฟ้า ได้แก่ พลังงานทดแทนหรือพลังงานหมุนเวียน (Renewable sources) และ นิวเคลียร์ **Photolytic Process หรือ Biophotolysis**

เป็นการใช้พลังงานแสงเพื่อแยกน้ำเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน เช่น Photobiological Water Splitting Photoelectrochemical Water Splitting ปัจจุบันการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเชิงพาณิชย์ จะผลิตจากก๊าซธรรมชาติโดยวิธี Strean Reforming เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ถูกที่สุด

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลนั้นมีทั้งพวกที่เป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เจริญภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anoxygenic phototrophic bacteria) และ blue green bacteria และ ยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งได้แก่พวกที่เป็นสาหร่ายสีเขียว (Tohru and Yasuo, 1989) แต่ก็จะมีการศึกษาในแบคทีเรียสงเคราะห์แสงมากกว่าพวกที่เป็นยูคาริโอต เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญและผลิตไฮโดรเจนได้โดยการใช้สารอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ น้ำตาล รวมทั้งน้ำทิ้ง จากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรหลายประเภท เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำตาล และ โรงงานผลิตสับปะรด เป็นต้น (Sasikala et.al., 1992 and Singh et.al., 1994)อัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรีย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความหนาแน่นของเซลล์ และสภาวะแวดล้อม เป็นต้น อย่างเช่นได้มีรายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนมีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้รวมถึงยังมีผลต่อการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนอีกด้วย กลไกในการผลิตไฮโดรเจนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าเป็น การเกิดขึ้นของไฮโดรเจนเป็นผลโดยตรงที่ได้จากการสังเคราะห์แสงแบบ non-cyclic photophosphorylation และการใช้กรดอินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ผ่านวัฏจักรกรดซิตริก(citric acid cycle) เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม(Hillmer and Gest, 1977) รูปแบบในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ต่างกัน ก็มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนเช่นกันดังจะเห็นได้จากการศึกษาของ Kim และคณะ (1982) ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง Rhodo$pseudomonas sp. เพื่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการเพาะเลี้ยง 3 รูปแบบ คือ แบบเขย่าและให้แสงต่อเนื่อง สภาวะนิ่งและให้แสงต่อเนื่อง และ สภาวะนิ่งและให้แสงไม่ต่อเนื่อง พบว่าในแต่ละรูปแบบของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ต่างกัน คือ ร้อยละ 74.5, 66.0 และ 58.6 ตามลำดับรูปแบบในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ต่างกัน

(http://www.hydrogenpowerwatercar.com/index_page1.html)

ข้อดีของพลังงานเชื้อเพลิงจากไฮโดรเจน

1. แหล่งพลังงานดั้งเดิมก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ซึ่งก๊าซชนิดนี้ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลกโดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนมอนออกไซด์ ซึ่งเกิดจากการสันดาป (Combustion) ของสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำมัน แต่พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด ไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ดังนั้นจึงไม่ส่งผลให้เกิดภาวะเรือนกระจก

2. การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงดั้งเดิม ไม่ว่าจะมาจากยานพาหนะหรือแหล่งอุตสาหกรรมต่าง ๆ ก่อให้เกิดกลุ่มควันและฝุ่นละออง แต่พลังงานไฮโดรเจนไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศเหล่านี้

3. พลังงานไฮโดรเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานที่ต้องใช้พลังงานดั้งเดิมได้ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับครัวเรือน เครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น

4. ค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน และเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอร์ เช่น เมทานอล 2.5 เท่า และเอทานอล 5 เท่า

5. ก๊าซไฮโดรเจนสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้า ซึ่งอยู่ระหว่างการพัฒนาและคาดว่าจะนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอนาคต

(http://www.hydrogenpowerwatercar.com/index_page1.html)

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม purple non-sulfur bacteria จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน
2. ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียที่แยกได้

ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

1. คัดแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากแหล่งธรรมชาติ และทำให้บริสุทธิ์
2. คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
3. ศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการแทนที่น้ำ
4. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง purple non-sulfur bacteria

สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัย ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงประเภท Purple non-sulfur bacteria จากธรรมชาติได้
2. ได้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงประเภท purple non-sulfur bacteria ที่มีประสิทธิภาพสูงในการถผลิตไฮโดรเจน
3. สามารถผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

รายงานการศึกษาจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนเช่น Phototropic green and purple bacteria, cyanobacteria, fermentative bacteria บางชนิดและมีความสำคัญได้แก่ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง บางชนิด purple non-sulfur ซึ่งมีรายงานการใช้แบคทีเรียดังกล่าวหลายชนิดได้แก่ *Rhodospirillum rubrum, Rhodomicrobium vannielii, Rhodopseudomonas capsulaste, Rhodospseudomonas palustris, Rhodopseudomonas sphaeroides* หรือ *Rhodopseudomonas gelatinosa* และที่ปัจจุบันเปลี่ยนเป็น rubrivivax galatinosus เป็นต้น(Ormerod, et. al., 1998)

พบว่า *Rhodopseudomonas sulfidophilum* และ *Rhodopseudomonas vannielii* สามารถใช้ acids lactate and butyrate ในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยอัตราการผลิต 100-926 มิลลิลิตรของไฮโดรเจนต่อลิตรต่อวัน และเมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีไนโตเจนจะสามารถผลิตได้สูงขึ้นถึง 760 มิลลิลิตรของไฮโดรเจนต่อลิตรต่อวัน (segers และ verstrate, 1983)

<u>การจัดจำแนก (Classification)</u>

โดยทั่วไปจะแบ่งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (purple photosynthetic bacteria) และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (green photosynthetic bacteria) (Pfenning และ Truper, 1989; Kobayashi, 2000) ดังแสดงตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจัดจำแนก วงศ์, สกุล, สายพันธุ์ของ Phototrophic Bacteria มีดังนี้

(Order) ชั้น	(family) วงศ์	(Genus) สกุล	(species) สายพันธุ์
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	*Rhodospirillum* *Rhodopseudomonas* *Rhodomicrobium*	*Rubrum,tenue,fulvum,inolischianum* *Photonietricum* *Palustris,viridls,acidophilia,* *gelatinosa,capsulata,sphaeroldes* *vannielii*

	Chromatiaceae	*Chromatium*	*Okenii,weissel,warmingil, buderi, minus,Violascens,vinosum,gracilIsi mum,minutissium*
		Thiocystis *Thiosarcina* *Thiospirillum* *Thiocapsa* *Lamprocystis* *Thiodictyon* *Thiopedia* *Amoebobacter*	*violace , gelatrnosa* *rosea* *sanguineu , jenens, rosenbergil* *roseopersicin , pfennigil* *roseopersicina elegans, bacillosum* *rosea* *roseus , pendens*
	Ectothiorhodospiracea	*Ectothiorhofospira*	*mobilis, shaposhnikovil , halophila*
Chlorobiales	Chlorobiaceae	*Chlorbium*	*limicola,vlbrioforme, phaeobacteroides , phaeovibrioides*
		Prosthecochloris	*Aestuaril*
		Choropseudomonas	*Ethylica*
		Pelodictyon	*ciathratifornie , luteolum*
		Clathrochloris	*Sulphurica*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kabayashi (2000); Levett (1990); Imhoff (1992); Pfenning และ Truper (1989)

1. แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (purple photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ Chromatiaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (รูปภาพที่1) พบว่าสามารถเจริญได้ดีในสภาพโฟโตออโตโทรฟ (photoautotroph) ซึ่งสามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์ ซัลไฟต์ และไทโอซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์

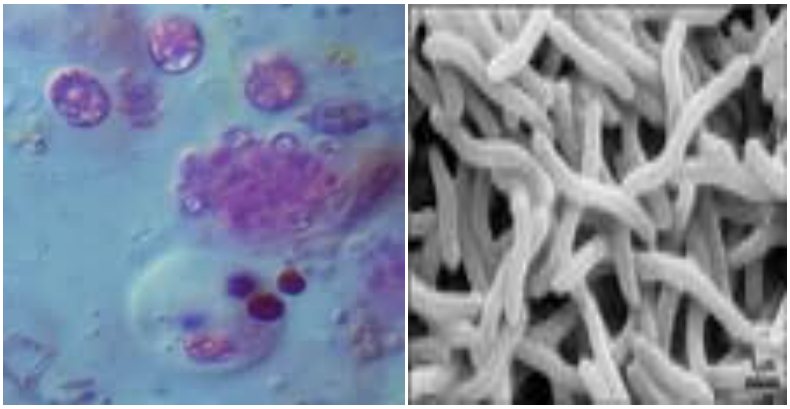
ได้ (Imhoff, 1992; VanNiel, 1944) แสดงสมการดังนี้ และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ Chromatiaceae สะสมกำมะถันไว้ในเซลล์

$$CO_2 + 2H_2S \quad \text{แสงสว่าง} \quad (CH_2O) + H_2O + 2S$$

$$S + CO_2 + 3H_2O \quad \text{แสงสว่าง} \quad (CH_2O) + H_2SO_4 + H_2$$

$$2CO_2 + Na_2S_2O_3 + 3H_2O \quad \text{แสงสว่าง} \quad 2(CH_2O) + Na_2SO_4 + H_2SO_4$$

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ *Rhodospirillaceae* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่สามารถใช่ซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็คตรอนเพื่อรีดิวซ์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ และมีการสันดาป (metabolism) ดีกว่าแบคทีเรียม่วงที่ใช้ซัลเฟอร์ เนื่องจากสามารถเจริญได้ทั้งแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟ และโฟโตออโตโทรฟ โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนต่อสภาพที่มีออกซิเจน จึงสามารถเจริญได้ ภายใต้สภาวะแบบเฮเทอโรโทรฟที่มีอากาศไม่มีแสงมีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ หลายชนิดในการสังเคราะห์แสง

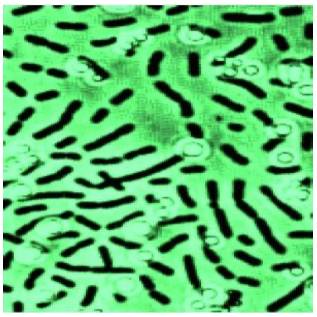


<u>ภาพที่ 1</u> a คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ Chromatiaceae
b คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ Rhodospirillaceae

2. แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (green photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะอยู่ในวงศ์ Chlorobiaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว มีลักษณะเซลล์เป็นแบบเส้นสาย ไม่มีระบบอินตราไซโตพลาสมิกเมมเบรน (intracytoplasmic membrane system) มีโครงสร้างพิเศษ คือ คลอโรเบียม (chlorobium vesicle) หรือ คลอโรโซม (chlorosome) จะพบอยู่ภายในไซโตพลาสมิก หรือติดอยู่ที่ผิวของไซโตพลาสมิกเมมเบรน คลอโรโซม มีขนาดใหญ่ประกอบด้วย แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ซี ดี และ อี และ มีโครงสร้างในการจับพลังงานแสง (light-harvesting) ศูนย์กลางของปฏิกิริยา

ของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบอยู่ในไซโตพลาสมิกเมมเบรนอยู่ติดกับคลอโรโซม (Imhoff, 1992) และจะสะสมกำมะถันไว้ในเซลล์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวงศ์ Chlorobiaceae

1. แบคทีเรียแสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur bacteria)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เล่ม 9 ได้จำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันไว้ใน กลุ่มที่ 10 (anoxygenic phototrophic bacteria) กลุ่มย่อย (subgroup) ที่ 3 (purple non-sulfur bacteria) มี6 สกุล ดังนี้ (Staley และคณะ, 1994)

1. Rhodospirillum

2. Rhodopila

3. Rhodobacter

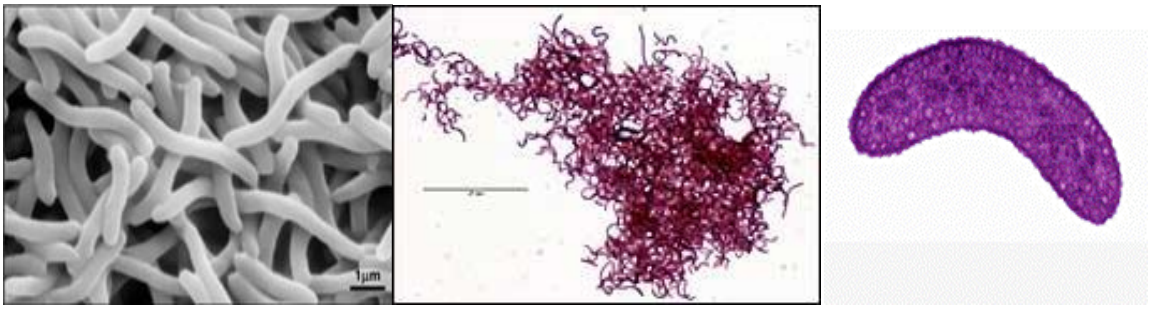
4. Rhodopseudomonas

5. Rhodomicrobium

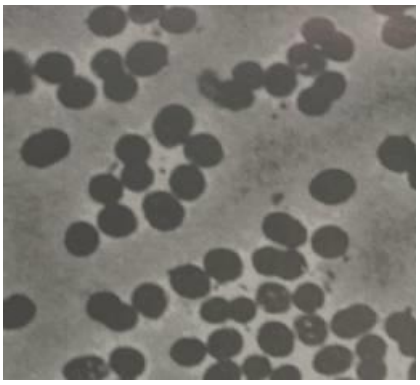
6. Rhodocyclus

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในชั้นน้ำที่มีแสงสว่างส่องถึงมีสารอินทรีย์ และพบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มในแหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจนมีแสงเล็กน้อย ในแหล่งน้ำจืดที่มีซัลไฟด์อยู่จะพบน้อยมาก แต่บางชนิดก็อาศัยอยู่ได้ในที่ที่มีปริมาณซัลไฟด์อยู่สูง (Imhoff, 1992) นอกจากนี้ยังพบได้ในพื้นดินสระน้ำ คลอง หรือแหล่งน้ำที่สกปรก เช่น บ่อบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง จึงเป็นแหล่งที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มดังกล่าวเจริญได้ดี โดยทั่วไปจะพบการเจริญอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (Pfenning และ Truper, 1992; Olliver และคณะ, 1994)

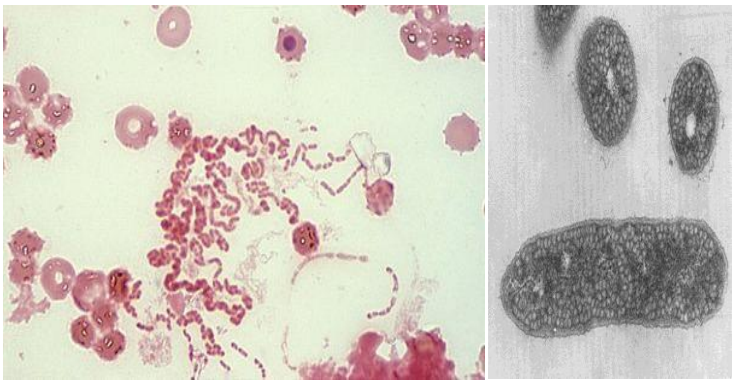
<u>ภาพที่ 3</u> กลุ่ม purple non-sulfur bacteria



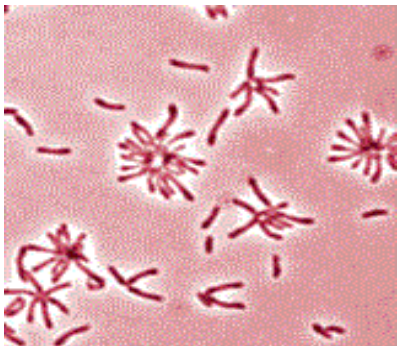
Rhodospirillum



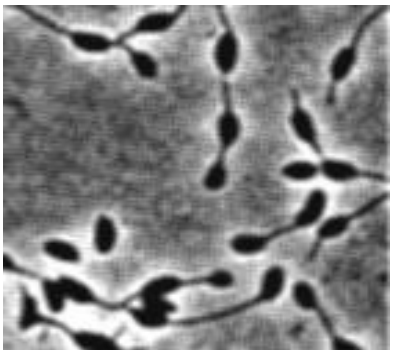
Rhodopila



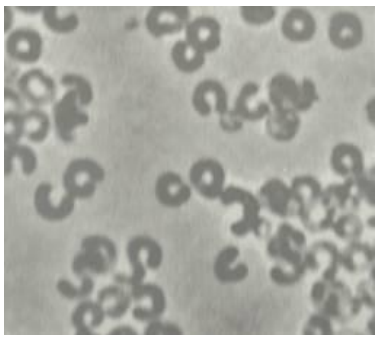
Rhodobacter



Rhodopseudomonas



Rhodomicrobium



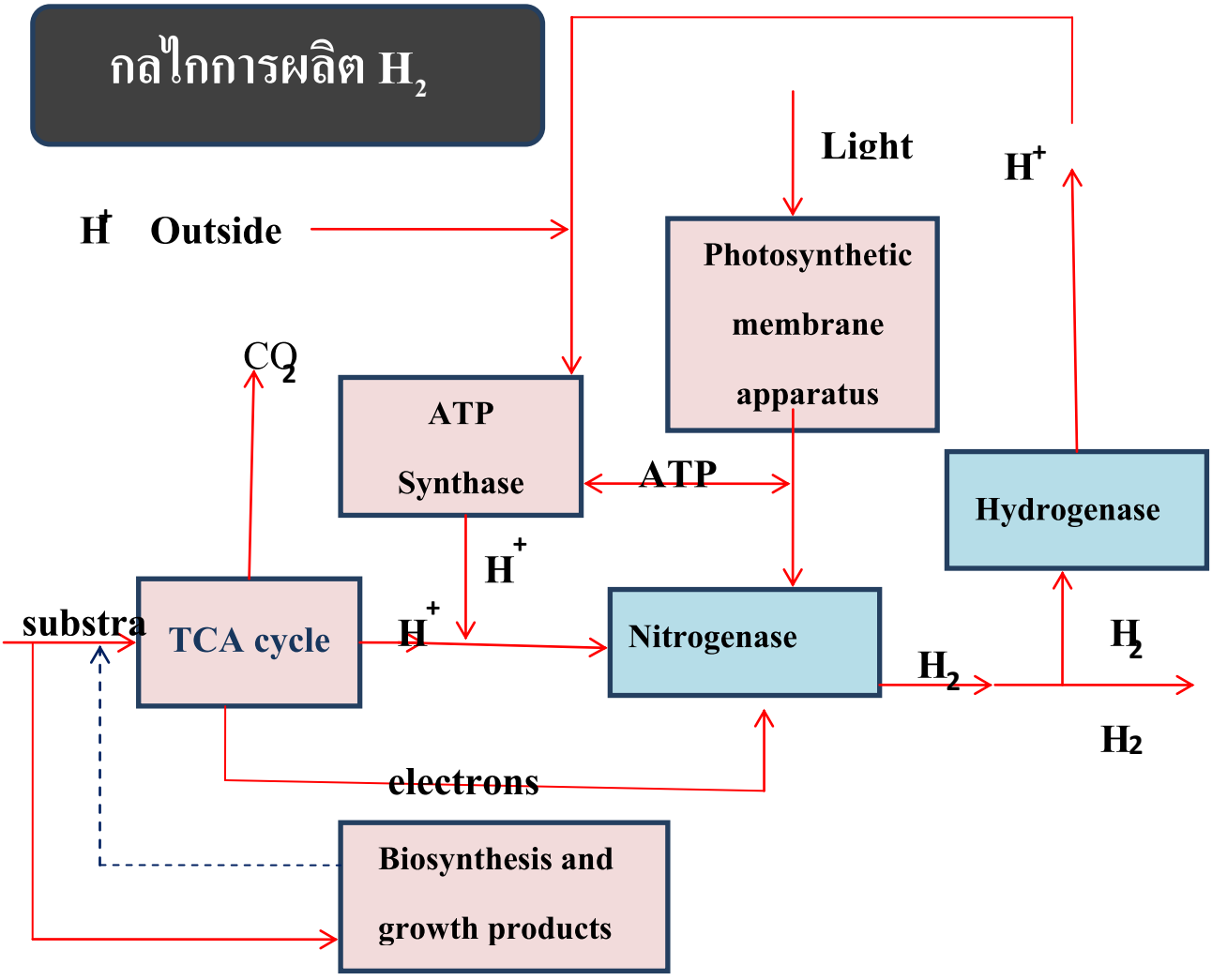
Rhodocyclus

กลไกการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ โดยในสภาวะที่มีแสง แสงจะช่วยให้เกิดกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนโดยมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่เป็น terminal catalyze ส่วนในสภาวะไร้อากาศไร้แสงนั้นเป็นแบคทีเรียที่ในกลุ่ม fermentative bacteria แต่การผลิตไฮโดรเจนในสภาวะไร้อากาศไร้แสงจำเป็นต้องใช้พลังงานและค่าใช้จ่ายสูงกว่าการผลิตในสภาวะไร้อากาศมีแสง กลไกการเกิดไฮโดรเจนเป็นไปตามแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากกรดแต่ละตัวจะมี reduction state ต่างกันไป นอกจากนี้แบคทีเรียแต่ละชนิดยังมีรูปแบบในการเมตาบอลิซึม (metabolism) แตกต่างกัน

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงประเภท purple non-sulphur bacteria จะใช้สารประกอบอินทรีย์หรือสารตัวกลางที่ได้จากวัฏจักรกรดซิตริกเป็นตัวให้อิเล็กตรอนภายใต้สภาวะ anaerobic photosynthetic growth โดยมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่เป็น terminal catalyse ทำให้เกิดการสร้างไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์

ภาพที่ 4 แสดงกลไกการผลิตไฮโดรเจน



(Akkerman. Et. al., 2002 ; koku. et. al., 2002)

<u>การตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง</u>

การตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 แบบ

<u>1.การตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีแสง</u>

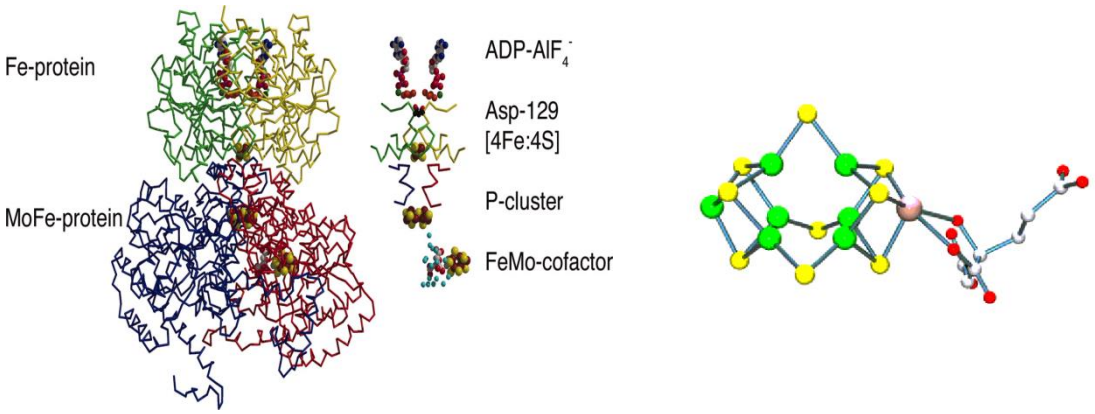
แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง เช่น *Rhodospirillum rubrum* จะหยุดตรึงไนโตรเจนทันที่ถ้าไม่มีแสง

<u>2. การตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่ไม่มีแสง</u>

แม้ว่าการตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นในอัตราการที่เหมาะสมในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนมีแสง แต่จะพบระดับการตรึงไนโตรเจนที่ต่ำๆ แต่มีนัยสำคัญที่เกิดขึ้นได้ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและไม่มีแสงโดย *Rhodospirillum rubrum* และ Chromatium sp. เนื่องจากมีการสะสมสารตัวกลางจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแสงและในระหว่างที่มการตรึงไนโตรเจนเป็นเวลานานๆในที่มืด จุลินทรีย์จะใช้คาร์โบไฮเดรตที่สะสมไว้ไปใช้ในการสร้าง ATP และ reductant ที่จำเป็นสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

ภาพที่ 5 ลักษณะรูปร่างของเอนไซม์ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase)

<u>เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase)</u>



นอกจากปัจจัยทางกายภาพและสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแล้ว ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งซึ่งจำเป็นอย่างมากต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง คือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งโดยไนโตรเจน ซึ่งเป็นสับสเตรต (substrate) ของเอนไซม์ชนิดนี้ เอนไซม์นี้พบได้ทั้งในแบคทีเรียจำพวก facultative anaerobic และ obligate anaerobe โดยเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (enzyme complex) ที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1. โปรตีนที่มีธาตเหล็ก (Fe-Protein) หรือ reductant ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย

2. โปรตีนที่มีธาตุเหล็กและโมลีบดีนัม (Mo-Fe-Protein) หรือ dinitrogenase ซึ่ง ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย

การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ ส่วนแรกจะทำหน้าที่รับอิเล็กตรอน และสลาย ATP เพื่อผลักดันอิเล็กตรอนให้กับส่วนที่ 2 ซึ่งทำหน้าที่รีดิวซ์ (reduce) ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย เข้าสู่วิถีเมตาบอลซึมของกรดอะมิโนและกรดนิวคลีอิค

ภาพที่ 6 กลไกการตรึงไฮโดรเจนด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase)

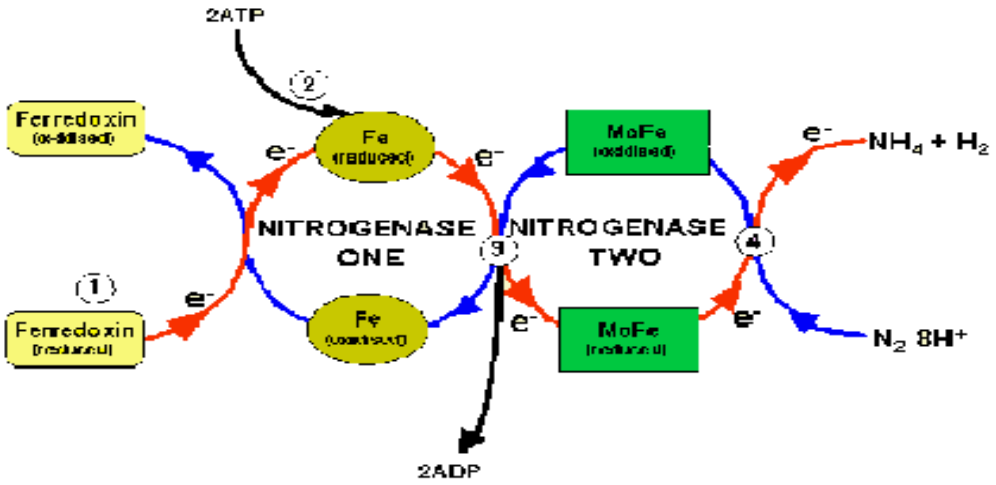


Figure 21: Nitrogenase redox cycle [77]

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นกระบวนการที่ต้องการแสง การศึกษาในปัจจุบันมีการให้แสงจากหลอดไฟ ซึ่งจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ เนื่องจากการแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงพวก Purple non-sulfur จะมีการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องซาเซลเซียส เพราะแบคทีเรียไม่สามารถเจริญในอุณหภูมิสูงได้ เช่น *Rhodopseudomonas sp.* สายพันธุ์ TN3 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Watanabe และคณะ, 1979) *Rhopseudomonas gelatinosa* สายพันธุ์ A1-A4 และ *Rhodopseudomonas sphaeroide* สายพันธุ์ B1-B6 จะเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 45 องสาเซลเซียส และกิจกรรมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส (Watanabe และคณะ, 1989) เป็นต้น ทำให้ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิที่เกิดขึ้นให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นเพื่อให้เป็นการประหยัดพลังงานในการรักษาระดับอุณหภูมิที่เกิดขึ้นให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นเพื่อให้เป็นการประหยัดพลังงานในการรักษาระดับอุณหภูมิ จึงมีความจำเป็นที่ต้องคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการทดอุณหภูมิสูงเพื่อนำมาผลิตไฮโดรเจนมีการศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่อุณหภูมิต่างๆเปรียบเทียบกับ *Rhodopseudomonas sphaeroide* สายพันธุ์ B5 มีกิจกรรมการผลิตไฮโดรเจนในที่ที่มีแสงซึ่งใช้พลังงานแสงอาทิตย์(Kim และคณะ, 1982) นอกจากนี้ได้มีการคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงจากตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บมาจากบริเวณพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย ศึกษาคุณสมบัติและลักษณะทางสรีระวิทยาในการเจริญที่อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส และได้ศึกษาความสารถในการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูง (เลอลักษณ์ และคณะ, 2526; yoneyama และคณะ, 1983; Buranakarl และคณะ, 1984)

มีการค้นพบแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas sulfidophilum* เมื่อยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มีแสง มีไนโตรเจน จะมีการสร้างไฮโดรเจนด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส จนกระทั้งกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในระดับที่เพียงพอแล้วจะมีการใช้สับสเตรท และเปลี่ยนไปเป็นสาร poly-(3-hydrogen) (PHB) ซึ่งมีผลให้มีการลดลงของสัดส่วนสับสเตรทที่เปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจน ดังนั้นเพื่อป้องกันการเกิด PHB จึงได้มีการศึกษาวิธีการเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้ไม่มีระยะ lag สำหรับการผลิตไฮโดรเจน (Maeda และคณะ, 1998)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงพบกระจายทั่วไปในธรรมชาติ ตามแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม ทะเลสาบน้ำเค็ม น้ำทะเลสาบที่มีความเป็นด่าง น้ำที่มีความเป็นกรด น้ำพุร้อน น้ำทะเลบริเวณขั้วโลกเหนือ นอกจากนี้ยังพบตามแหล่งน้ำเสีย บ่อบำบัดน้ำเสีย บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีความสำคัญในกระบวนการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ (CO_2-assimilation) และการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) นอกจากนี้ยังมี

บทบาทสำคัญในห่วงโซ่อาหารซึ่งสัตว์ขนาดเล็ก ปลา กุ้ง หอย และปู สามารถนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมาใช้เป็นอาหาร นอกจากนี้ในน้ำเสียบ้านเรือนและน้ำเสียจากทำปสุสัตว์สามารถบำบัดด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Levett, 1990; Broch, 1998)

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทดแทนที่สะอาดกว่าเชื้อเพลิงฟอสซิล Photosynthetic bacteria ผลิตไฮโดรเจนจากสารอินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ซึ่งอาศัยพลังงานแสงในการย้ายอิเล็กตรอน ซึ่งศึกษา Photosynthetic bacteria 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (*Rhodopseudomonas* sp., *Rhodospseudomonas palustris,* และ non-indentified strain) จากความแตกต่าง 4 แบบในการย่อย (shot-chainorganic acids lactate, malate, acetate and butyrate) และความเข้มแสงมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยให้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 2 แบบ โดยใช้ acetate เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยเปรียบเทียบอัตราการผลิตให้ไฮโดรเจนและความเข้มแสงพบว่า *Rhodopseudomonas* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงสุด ผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตรามากสุดที่ 25 ml H_2 l^{-1} h^{-1} ภายใต้ความเข้มแสงที่ 680 umolphotons m^{-2} s^{-1} และมีประสิทธิภาพมากที่สุดที่ 6.2% นอกจากนี้ความเข้มข้นของ acetate ยังลดลงจาก 22 ไปเป็น 11 mM ซึ่งมีในการลดลงของไฮโดรเจนนั้นลดลงจาก 214 ไปเป็น 27 ml H_2 pre vessel (Barbosa et.al.,2001)

ใช้เชื้อ photobioreactor 2 สายพันธุ์ของ Photosynthetic bacteria ได้แก่ *Rhodopseudomonas sphaeroide* RV และ MTP4 ของ บริษัทลดเม็ดสี เพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสองสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน พลังงานแสงและอัตราการผลิตไฮโดรเจนมีผลต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลง RV และ MTP4 พลังงานแสงมากจะมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าแสงน้อย ดังนั้นเครื่องปฏิกรณ์จะช่วยกระจายแสงทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 3.64 $l/M^2/h$ ที่ความเข้มแสง 500 W/M^{-2} ใน 24 ชั่วโมง (Masayasu, 2002)

Rhodopseudomonas capsulate สามารถใช้ volatile fatty acid เป็นตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนที่ใช้พลังงานแสง ศึกษาถึงการผสมของ acetate, propionate และ butyrate เพื่อใช้เป็นซับสเตรทสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากเมล็ดใน photo-bioreactor ร่วมกับ *Rhodopseudomonas capsulate* ส่วนผสมของ acetate 1.8 g/l, propionate 0.2g/l และ butyrate 1.0 g/l ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ 37.8 ml/g dry weigth (dwt)/h ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงแสงอยู่ที่ 69% และ 45% คือประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงซับสเตรท โดยจะได้ไฮโดรเจนเป็นผลผลิตออกมาจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม acidogenic ซึ่ง H_2-producing จะผลิตได้มากที่สุดอยู่ที่ 24.9 ml/gdwt/h โดย *Rhodopseudomonas capsulate* และ H_2 yield จะ

เพิ่มขึ้นโดย three-fold ผ่านการรวมกันของการผลิตไฮโดรเจนของ anaerobic fermentative bacteria และ *Rhodopseudomonas capsulate* เปรียบเทียบกับ dark-fementation(shi.et.al.,2006)

ลักษณะของการผลิตไฮโดรเจนจากการผสมกรดไขมันระเหย (VFAs) เปรียบเทียบ 3 สายพันธุ์ ของ Photosynthetic bacteria (*Rhodopseudomonas* sp., *Rhodospseudomonas palustris* W004. และ *Rubrivivax* sp.) ซึ่ง *Rhodopseudomonas* sp. และ *Rhodospseudomonas palustris* W004. เปลี่ยน butyrate และ acetate เป็นไฮโดรเจน ส่วน *Rubrivivax* sp. สามารถย่อย butyrate และ acetate แต่ไม่ผลิตไฮโดรเจนได้ หลังจากใช้ (VFAs) เป็น substrate จำนวนไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2191.7 ml/L ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา COD เท่ากับ 85.3% และได้ H_2 468.3 ml H_2 /gCOD เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ให้ผลดีสุด ใช้ butyrate เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้หลังจากการผสม (VFAs) สามารถย่อยได้อย่างสมบรูณ์ (Xiaomin Wu, 2009)

บทที่ 3

วัสดุและอุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml
2. Petri dish
3. Beaker
4. Loop
5. Needle
6. Pipette
7. Rack
8. Dessicator
9. Slide
10. Auto Pipette
11. Eppendorfep TIPS
12. Durham tube
13. Thermometer
14. *ฟิลเตอร์*
15. Aluminium foil
16. หลอดไฟ
17. กระบอกตวง
18. เครื่องวัดความเข้มแสง
19. หลอด
20. หม้อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
21. ช้อนตักสาร
22. หลอดฉีดยา
23. เข็มฉีดยา
24. แผ่นพาราฟิล์ม
25. สายน้ำเกลือ
26. หลอดดักก๊าซ
27. ไฟแช็ค
28. ขวดพลาสติก
29. ถุงพลาสติก
30. ตระกร้า

เครื่องมือ

1. pH meter
2. Autoclave
3. Larminar flow
4. เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
5. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
6. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น
7. Spectrophotometer รุ่น

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Minimal medium of Ormerod
2. G5 medium

บทที่ 4
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน โคลนและน้ำในธรรมชาติ

เก็บตัวอย่าง ดิน โคลนและน้ำในแหล่งธรรมชาติต่างๆที่สะอาด ภายในพื้นที่ 5 จังหวัด ซึ่งบริเวณที่เก็บตัวอย่างต้องมีแสงส่องถึงอย่างน้อย 1 เซนติเมตร

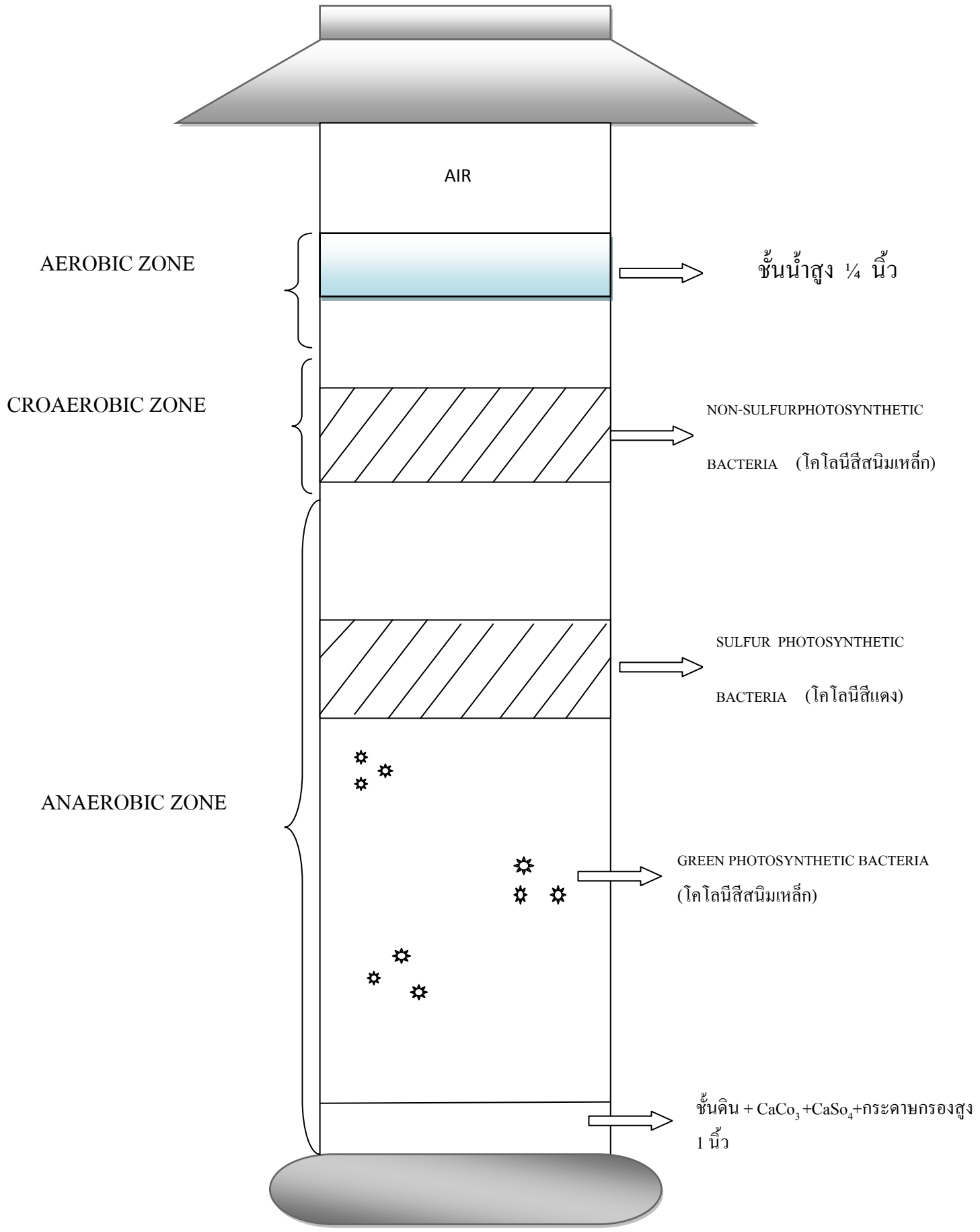
ตารางแสดงการเก็บตัวอย่างภายในพื้นที่ 5 จังหวัดและจำนวนครั้งที่เก็บตัวอย่าง

สถานที่เก็บ	ตัวอย่างที่เก็บ	จำนวนครั้งที่เก็บ	จำนวนตัวอย่างที่คาดว่าจะได้
1.ขอนแก่น	ดินโคลนและน้ำ	3	15
2.ชัยภูมิ	ดินโคลนและน้ำ	3	15
3.นครราชสีมา	ดินโคลนและน้ำ	2	8
4.มุกดาหาร	ดินโคลนและน้ำ	2	7
5. สกลนคร	ดินโคลนและน้ำ	1	5
6. Stock culture	ดินโคลนและน้ำ		11
รวม			61

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากแหล่งธรรมชาติ และทำให้บริสุทธิ์

2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยวิธี Winogradsky column

1. เตรียมภาชนะที่สามารถใส่ตัวอย่างลงไปได้โดยทั่วไปไม่จำกัดขนาด แต่ปกตินิยม ความสูงประมาณ 6-8 นิ้วและกว้างประมาณ 1.5-2 นิ้ว หรือใช้ขวดน้ำมาตัดให้มีปลายด้านหนึ่งเปิดออกเพื่อสามารถนำตัวอย่างลงไป
2. การเตรียมดินตัวอย่าง ถ้าแห้งเกินไปให้เติมน้ำที่มาจากแหล่งเดียวกันลงไปกำจัดเศษไม้ ใบไม้ หญ้าออกไปก่อนที่จะนำดินลงใน Column ถ้ามีลักษณะเป็นโคลนอยู่แล้วไม้ต้องผสมน้ำ
3. เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCo_3$) 1 ช้อนชา และเติมแคลเซียมซัลเฟต ($CaSo_4$) 1 ช้อนชา ลงในดินที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน
4. ฉีกกระดาษกรอง หรือกระดาษทิชชูเป็นชิ้นเล็กๆผสมลงในดิน เพื่อให้กระดาษถูกย่อยสลายไปเป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ใน Column
5. ใช้ช้อนตักดินที่ผสมอาหารแล้วลงใน ฉolumn โดยบรรจุดินให้สูงประมาณ 1 นิ้ว สลับกับดินที่ไม่ถูกเติมสารอาหารลงไปในปริมาณที่เท่ากันขั้นตอนนี้จะต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศในชั้นของดิน ทำเช่นนี้จนสูงประมาณ 4-5 นิ้ว แล้วเติมน้ำลงไปทับบริเวณผิวหน้าดิน ปิดฝา Column ด้วยแผ่นพลาสติก รัดด้วยยางรัด
6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและให้แสงสว่างอยู่เพียงด้านเดียวของ Column วางหลอดให้ห่างพอที่จะไม่ทำให้ร้อนเกิน 35 องศาเซลเซียส
7. หลังจากนั้นบ่มเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ให้คอยดูชั้นของเหลวซึ่งอยู่ด้านบนไม่ควรให้มากกว่า 0.6 ซม. ถ้ามีน้อยไปให้เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปหรือใช้น้ำที่เก็บมาจากแหล่งเดียวกันเติมลงไป
8. บ่ม Column ในลักษณะดังกล่าวเป็นเวลา 1 เดือน ให้คอยสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและคอยระวังไม่ให้น้ำบนชั้นดินใน Column แห้ง
9. เมื่อพบ Column ในด้านที่มีแสงไฟส่อง เกิดมีสีม่วงหรือสีแดงให้นำมาแยกแบคทีเรียสังเคราะห์ แสงต่อไป



ภาพที่ 7 ลักษณะของ COLUMN ภายหลังการบ่มไว้ 1-4 อาทิตย์

3. คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium of Ormerod (Ormerod และคณะ,1961) ที่เปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตเจนไปตามวัตถุประสงค์ของแต่ละการทดลอง และเติมวิตามิน 4 ชนิด คือ วิตามิน บี1 (thiamine HCl), กรดนิ โคตินิก (nicotinic acid), ไบโอติน (biotin) และกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค (aminobenzoic acid) ซึ่งการแยกเชื้อจากธรรมชาติใช้ malic acid 30 mM เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้อาหาร G5 (Kohlmiller และ Gest,1951)
2. นำตัวอย่างดินโคลนจากแหล่งธรรมชาติที่พบว่ามีสีม่วงหรือสีแดงใส่ลงในหลอดอาหารเหลว Ormerod's/G-5 ปิดฝาหลอดให้แน่นเพื่อทำให้เกิดสภาพขาดออกซิเจนบ่มภายได้สภาพะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน
3. เมื่ออาหารมีสีแดงหรือสีน้ำตาล แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดย streak ลงในอาหาร Ormerod's agar ที่ใช้ malic acid เป็นแหล่งคาร์บอนและ glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มใน Desicator cabinet ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนที่มีความเข้มแสง 10000 lux ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เลือกโคโลนีที่มีสีม่วง, น้ำตาลหรือแดง ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak plate
4. ขูดโคโลนีที่บริสุทธิ์ลงในอาหาร Ormerod's บ่มภายใต้สภาพะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน หรือเก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี stab เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันที่มีลักษณะเป็น deep tube บ่มภายใต้สภาพะแสงที่มีความเข้มข้นแสง 10000 lux ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน เมื่อเชื้อเจริญนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถในการผลิตก๊าซ

4.1 คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธี Semi-solid agar และ Durham tube

1. Inoculate เชื้อแต่ละ Isolate 1 ml ลงในอาหาร semi-solid agar 9 ml พีเอช 6.8 ที่มี malic acid 30 mM เป็นแหล่งให้อิเลคตรอน และ glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่ความเข้มแสง 10000 lux อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน (สังเกตการแตกหักของวุ้นและชิ้นวุ้นที่ถูกดันขึ้นมาเนื่องจากก๊าซที่แบคทีเรียสร้างก๊าซขึ้น คัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างก๊าซได้ในหลอดอาหารวุ้น จากนั้นนำมาศึกษาต่อไปตามวิธีข้อ 5)
2. Inoculate เชื้อแต่ละ Isolate 1 ml ลงในอาหาร Ormerod's 7 ml ที่ใส่ durham tube บ่มในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่ความเข้มแสง 10000 lux อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน (สังเกตแก๊สที่เกิดขึ้นภายใน durham tube คัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างก๊าซได้ 120 µl ขึ้นไปในหลอดดักก๊าซ จากนั้นนำมาศึกษาต่อไปตามวิธีข้อ 5)

5. ศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยการวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นโดยวิธีการแทนที่น้ำ

5.1 ศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดในหลอดวัดก๊าซขนาด 8 และ 15 ml

1. คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถผลิตก๊าซจากการทดสอบในข้อที่ 2 (Isolate ที่สามารถผลิตก๊าซได้ใน durham tube 120 µl ขึ้นไป)
2. เตรียมอาหาร Ormerod's พีเอช 6.8 ที่มี malic acid 30 mM เป็นแหล่งให้อิเลคตรอน และ glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน ในหลอดปริมาตร 7 ml หรือ 13 ml (โดยฝาหลอดจะถูกเชื่อมต่อด้วยเข็มฉีดยาและสายยาง) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อ Autocalve อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที
3. Inoculate เชื้อแต่ละ Isolate 1 ml ลงในอาหาร Ormerod's เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้ม
4. Inoculate เชื้อแต่ละ Isolate 1-2 ml ลงในหลอดอาหาร Ormerod's ที่ใช้สำหรับวัดปริมาณก๊าซ
5. บ่มหลอดวัดก๊าซภายใต้สภาพวะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน โดยนำสายน้ำเกลืออีกด้านเชื่อมต่อกับหลอดที่บรรจุน้ำผสมกับแคลเซียมซัลเฟตจนเต็ม
6. บันทึกผลการทดลองทุกๆ 3 วัน ตรวจผลการทดลองตามหลักการแทนที่น้ำ ถ้าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตก๊าซได้จะดันน้ำออกจากขวดซึ่งปริมาณน้ำที่ออกจะเท่ากับปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น

5.2 ศึกษาความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดในขวดวัดก๊าซขนาด 120 และ 250 ml

1. คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถผลิตก๊าซจากการทดสอบในข้อที่ 5.1 (Isolate ที่สามารถผลิตก๊าซได้ 3000 µl ขึ้นไป)
2. เตรียมอาหาร Ormerod's พีเอช 6.8 ที่มี malic acid 30 mM เป็นแหล่งให้อิเลคตอน และ glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน ในขวดปริมาตร 110 ml หรือ 200 ml (โดยฝาหลอดจะถูกเชื่อมต่อด้วยเข็มฉีดยาและสายน้ำเกลือ) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อ Autocalve อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที
3. Inoculate เชื้อแต่ละ Isolate 5 ml ลงในอาหาร Ormerod's เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้ม
4. Inoculate เชื้อแต่ละ Isolate 5-10 ml และ 50 ml ลงในขวดอาหาร Ormerod's ปริมาตร 110 และ 250 ml ที่ใช้สำหรับวัดปริมาณก๊าซ
5. บ่มขวดวัดก๊าซภายใต้สภาพวะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน โดยนำสายน้ำเกลืออีกด้านเชื่อมต่อกับหลอดที่บรรจุน้ำผสมกับแคลเซียมซัลเฟตจนเต็ม
6. บันทึกผลการทดลองทุกๆ 3 วัน ตรวจผลการทดลองตามหลักการแทนที่น้ำ ถ้าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตก๊าซได้จะดันน้ำออกจากขวดซึ่งปริมาณน้ำที่ออกจะเท่ากับปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น

6. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

6.1 วิเคราะห์การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงและวิเคราะห์การหาน้ำหนักแห้ง ตั้งแต่วันที่ 0-24 วัน

1. เตรียมอาหาร Ormerod's พีเอช 6.8 ที่มี malic acid 30 mM เป็นแหล่งให้อิเลคตรอน และ glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน ในหลอดปริมาตร 7 ml ฆ่าเชื้อด้วยหม้อ Autocalve อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที
2. Inoculate เชื้อแต่ละ Isolate 1 ml ลงในอาหาร Ormerod's เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้ม
3. Inoculate เชื้อแต่ละ Isolate 1 ml ลงในอาหาร Ormerod's 7 ml ในหลอดวันที่ 0,6,12,15,18,24 วัน
4. บ่มภายใต้สภาพวะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 วัน
5. วัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ละ Isolate โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ความยาวคลื่น 600 nm
6. อบกระทงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 24 ชั่งโมง และชั่งน้ำหนักกระทง
7. เทอาหารที่วัดการเจริญในวันที่ 24 ในแต่ละ Isolate ลงในกระทงที่ผ่านการอบและชั่งน้ำหนักแล้ว อบกระทงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้ใน Desicator cabinet จนเย็น
8. นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง โดยนำน้ำหนักกระทงบวกเซลล์ที่ชั่งได้นำมาลบกับน้ำหนักกระทง

7. วิเคราะห์พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงเชื้อ 24 วัน โดยใช้เครื่อง pH มิเตอร์

1. นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวันที่ 0 และวันที่ 24 เทลงในกระทงอะลูมิเนียมปริมาตร 4 ml
2. เลือกกด calibration mode แล้วหน้าจอจะปรากฏข้อความ "measure temperature buffer"
3. จุ่ม pH electrode ลงใน buffer ตัวที่ 1 (pH7) เปลี่ยนใส่ buffer ตัวที่ 2 (pH 4 หรือ 10) โดยต้องล้าง pH electrode ก่อนด้วยน้ำกลั่นเช็ด Electrode ด้วยกระดาษทิชชูให้สะอาด
4. วัด pH อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ละ Isolate ตั้งแต่วันที่ 0 และ 24 ในกระทงอะลูมิเนียมปริมาตร 4 ml จุ่ม pH electrode ลงในสารละลายเชื้ออ่านตัวเลขที่ปรากฏบนหน้าจอ ล้าง pH electrode ด้วยน้ำกลั่นเช็ด Electrode ด้วยกระดาษทิชชูให้สะอาด จึงทำการวัด Isolate ทัดไป

8. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง purple non-sulfur bacteria ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธี Gram's staining

1. หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนสไลด์ ประมาณ 1 หยด
2. ใช้ลูป (loop) แตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้
3. เกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากจนเกินไปและปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)
4. ตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ซึ่งจะทำให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้งแล้วไปผ่านไป อย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง
5. หยดสี คริสตอลไวโอเลต (Crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้ง
6. หยดสารละลายแกรมไอโอดีน (Lugol' iodine) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายแกรมไอโอดีนจะทำหน้าที่เป็น มอแดนท์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น
7. ล้างสีออกด้วย เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 % (Ethyl alcohol) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น
8. หยดสีซาฟรานิน (Safranin) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่หัวกำลังขยาย 100

9. การสกัด Bateriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ

1. เตรียมสารสกัด โดยเติม alcohol และ Acetate ในอัตราส่วน 3 : 2
2. ดูด suppletion 1 ml ลงในหลอด เติมสารละลาย alcohol และ Acetate ในอัตราส่วน 3 : 2 1 ml
3. ทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 358 นาโมเมตร, 488 นาโนเมตร, 754 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer
5. บันทึกข้อมูลแล้วนำไปวาดกราฟ

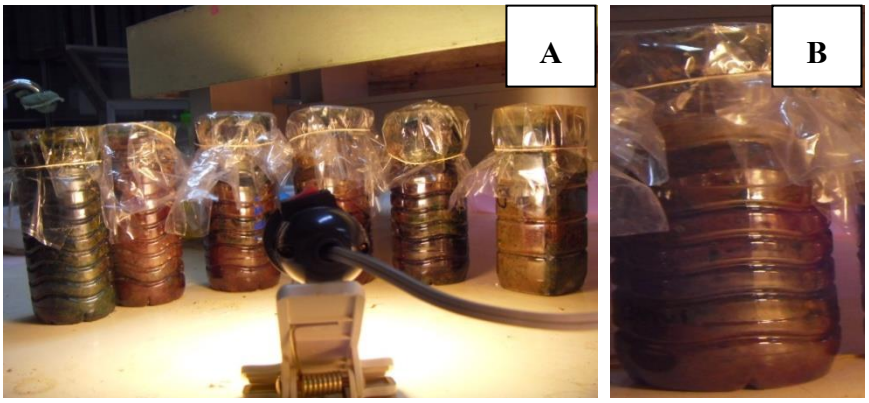
บทที่ 5

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการทดลองการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากธรรมชาติและจาก Stock culture

จากการสุ่มเก็บตัวอย่าง ดิน, โคลนและน้ำตามแหล่งธรรมชาติภายในจังหวัดนครราชสีมา, ขอนแก่น, ชัยภูมิ, สกลนคร,มุกดาหารและจาก Stock culture ประกอบด้วยตัวอย่างดินโคลน 45 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินโคลนและน้ำจาก Stock culture จำนวน 15 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวน 65 ตัวอย่าง ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้วิธี Winogradsky column ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตและแคลเซียมซัลเฟตและกระดาษทิชชูที่ฉีกเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งจุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของคอลัมน์เมื่อมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยดินโคลนจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีม่วง ดังแสดงในรูปภาพที่ 1

ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเมื่อเลี้ยงโดยวิธี Winogradsky column บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาพะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux เป็นเวลา 4 สัปดาห์



A. ลักษณะการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยวิธี Winogradsky column ในสภาพะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux
B. ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในคอลัมน์โดยดินโคลนจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีม่วง

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ

แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์ จากตัวอย่างที่นำมาทดลองดังวิธีที่กล่าวมาในข้างต้น เมื่อนำมาแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Selective medium ชนิด Ormerod's /G5 โดยมีพีเอช 6.8 โดยมี malic acid เป็นแหล่งคาร์บอนและ glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มใน Desicator cabinet ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนในสภาพวะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux เป็นเวลา 14 วัน เลือกโคโลนีที่มีสีม่วง, น้ำตาลหรือแดง ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak plate

สถานที่เก็บ	ตัวอย่างที่เก็บ	จำนวนครั้ง	จำนวนตัวอย่างที่ได้	Isolate
1. ขอนแก่น	ดินโคลน	4	20	17
2. ชัยภูมิ	ดินโคลน	2	15	2
3. นครราชสีมา	ดินโคลน	1	15	2
4. มุกดาหาร	ดินโคลน	2	10	10
5. สกลนคร	ดินโคลน	2	5	4
6. Stock culture	ดินโคลน,น้ำ	-	-	15
รวม		11	65	50

จากการทดลองที่ 1 พบว่ามีการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในคอลัมน์ในสภาพวะที่ไม่มีออกวิเจนที่มีความเข้มแสง 10000 lux โดยสังเกตได้จากดินที่เปลี่ยนสีเป็นสีแดง, สีม่วง, สีน้ำตาล สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลทจาก 65 ตัวอย่าง เนื่องจากในระหว่างการแยกให้บริสุทธิ์มีการปนเปื้อนจากสาหร่ายทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงตายไป พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเนื่องจากสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ใช้เลี้ยงที่มีความจำเพาะสำหรับกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและสามารถใช้กรดอินทรีย์ ได้แก่ malic acid และ glutamic acid เป็นแหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจนและแหล่งให้อิเลคตรอนได้ในสภาวะ anaerobic-light ซึ่งเซลล์สามารถสังเคราะห์แสงได้ เมื่อนำมาศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาพบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนเล็ก แกรมลม ตามที่ (Staley และคณะ, 1994) แสดงดังตารางภาพที่1

(รัชฎาวรรณ บุญเศษ, 2552) ได้ทำการเก็บตัวอย่างมาจากแหล่งธรรมชาติต่างๆในเขตพื้นจังหวัดขอนแก่น, สุรินทร์, อุดรธานี, ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ทางการค้าและปุ๋ย EM จากหมู่บ้านในเขตจังหวัดขอนแก่น ประกอบด้วย ตัวอย่างดินโคลนและน้ำ โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยวิธี Winogradsky column ในสภาพวะแสงที่มีความเข้มแสง 10000 lux ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตและแคลเซียมซัลเฟตและกระดาษทิชชูที่ฉีกเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งจุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำมาแยกให้บริสุทธิ์อาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Selective medium ชนิด Ormerod's /G5 ที่มีพีเอช 6.8 มี malic acid 30 mM เป็นแหล่งให้คาร์บอนและ glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส สามารถแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เจริญมีสีแดงและสีชมพูอ่อนหรือสีขาวได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลทจาก 70 ตัวอย่าง

2. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซเบื้องต้น

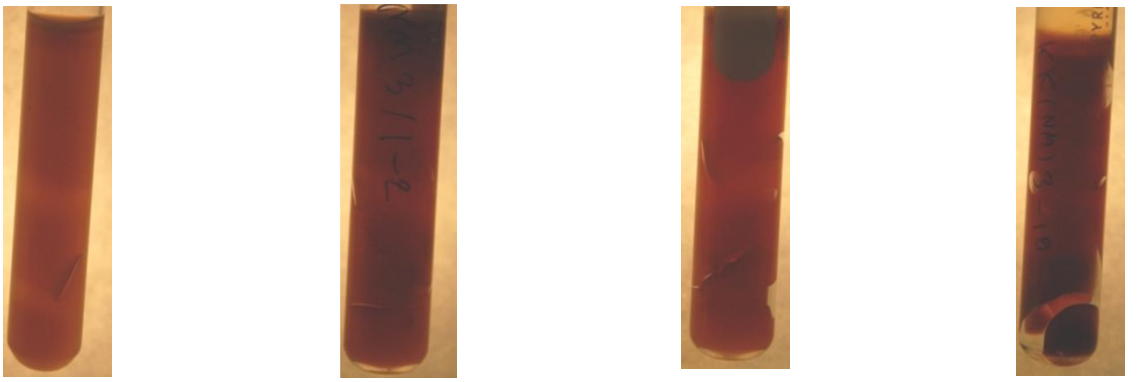
จากการทดสอบการผลิตก๊าซของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในหลอดดักก๊าซและในอาหาร Semi-solid agar พบว่า 50 Isolate มี 39 Isolate ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซและ 11 Isolate ไม่สามารถผลิตก๊าซ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 2

ตารางที่ 3 แสดงการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซเบื้องต้นของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

ลำดับ	รายชื่อตัวอย่าง (Isolate)	ทดสอบคุณสมบัติในการผลิตก๊าซ		
		หลอดดักก๊าซ (Durham tube)		สังเกตการแตกของวุ้น
		ครั้งที่1	ครั้งที่ 2	
1.	NM 1/2	170 µl	50 µl	++++
2.	NM 1/3	90 µl	90 µl	-
3.	NM 3/1-1	90 µl	100 µl	++
4.	NM 3/1-2	120 µl	20 µl	-
5.	S1	350 µl	350 µl	-
6.	S1-2	70 µl	40 µl	+
7.	S3	-	-	++
8.	Sp 1/1-1	-	-	++
9.	Sp 2/1-3	150 µl	150 µl	-
10.	vp 1/1	120 µl	80 µl	-
11.	vp 1/2	170 µl	170 µl	-
12.	KK(KKU) 2-3	100 µl	100 µl	-
13.	KK(KKU) 4-2	140 µl	50 µl	++
14.	KK(KKU) 4-3	-	10 µl	-
15.	KK(KKU) 4-5.1	70 µl	280 µl	++++
16.	KK(KKU) 4-7	210 µl	150 µl	+
17.	KK(NM) 3-1	70 µl	150 µl	-
18.	KK(NM) 3-8	50 µl	140 µl	-
19.	KK(NM) 3-9	100 µl	50 µl	-
20.	KK(NM) 3-10	80 µl	-	-
21.	KK(NM) 3-16	190 µl	190 µl	++++
22.	KK(NM) 3-17	100 µl	150 µl	
23.	KK(NM) 3-18	90 µl	90 µl	+++

24.	KK(NM) 3-20	-	-	+
25.	KK(NM) 3-21	70 µl	10 µl	+
26.	NM 3/7	40 µl	-	+
27.	NM3/17	70 µl	120 µl	+
28.	Muk 1-2	-	-	+
29.	Muk 2-1	70 µl	20 µl	-
30.	Muk 2-5	70 µl	70 µl	-
31.	Muk 2-18	10 µl	10 µl	-
32.	SK 1-1	-	-	++
33.	SK 1-4	40 µl	150 µl	-
34.	SK 1-6	120 µl	190 µl	++++
35.	SK 2-2	-	-	+++
36.	HK 1-1	200 µl	200 µl	++
37.	HK 2-3	200 µl	200 µl	-
38.	KR 1-2	40 µl	-	+++
39.	KR 1-3	-	-	++
40.	NM1/4	-	-	-
41.	NM1/4-1	-	-	-
42.	NM3/3	-	-	-
43.	VP ¼	-	-	-
44.	Muk 2-3	-	-	-
45.	Muk 2-4	-	-	-
46.	Muk 2-7	-	-	-
47.	Muk 2-14	-	-	-
48.	Muk 2-16	-	-	-
49.	Muk 2-17	-	-	-
50.	KK(NM) 3-19	-	-	-

ภาพที่ 9 ลักษณะการแตกของวุ้นจากการผลิตก๊าซของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง



\+ ++ +++ ++++

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะการผลิตก๊าซของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในหลอดดักก๊าซ

10 µl 70 µl 100 µl 140 µl 210 µl

3. ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในระยะเวลา 20 วัน

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ทดสอบการผลิตก๊าซเบื้องต้น ซึ่งจะเลือก Isolate ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซตั้งแต่ 120 µl ขึ้นไปทั้งสองครั้งการทดลอง เพื่อนำมาศึกษาการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำตามที่ได้กล่าวมาในข้างต้น ผลการทดลองดั้งตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในระยะเวลา 20 วัน

ลำดับ	รายชื่อตัวอย่าง (Isolate)	การทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซ						
		หลอดปริมาตร 8 ml			หลอดปริมาตร 15 ml	ขวดขนาด 100 ml		ขวดขนาด 250 ml
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1
1.	S1	-	-	น้อยมาก	-	-	*	*
2.	Sp 2/1-3	-	4750 µl	น้อยมาก	น้อย	-	น้อย	*
3.	vp 1/2	-	-	-	-	-	*	*
4.	KK(KKU) 4-5.1	-	-	น้อยมาก	น้อย	-	*	*
5.	KK(KKU) 4-7	-	-	50 µl	น้อย	-	*	*
6.	KK(NM) 3-1	-	-	น้อย	น้อย	-	*	*
7.	KK(NM) 3-8	-	-	น้อย	น้อยมาก	-	*	*
8.	KK(NM) 3-16	-	-	น้อย	น้อย	-	*	*
9.	KK(NM) 3-17	-	-	น้อย	น้อยมาก	-	*	*
10.	NM3/17	-	-	น้อย	น้อยมาก	-	*	*
11.	SK 1-4	-	-	น้อย	น้อย	-	*	*
12.	SK 1-6	3000 µl	-	50 µl	น้อย	-	น้อย	*
13.	HK 1-1	-	-	น้อย	น้อย	-	*	*
14.	HK 2-3	-	5600 µl	น้อย	1000 µl	-	2000 µl	4000 µl

หมายเหตุ : - คือ ไม่สามารถผลิตก๊าซ

* คือ Isolate ที่ไม่ได้ทำการทดสอบ (เนื่องจากจะคัดเฉพาะตัวที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซแต่ละครั้งที่สูงที่สุดนำไปทำการทดลองในการขยายขนาดการผลิตก๊าซต่อ)

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะการแทนที่น้ำของการผลิตก๊าซจากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

น้อยมาก น้อย 50 µl 2000 µl

ภาพที่ 12 การทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

A คือ วิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดในหลอดปริมาตร 8 ml

B คือ วิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดในหลอดปริมตร 15 ml

C คือ วิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดในขวดปริมตร 100 ml

D คือ วิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดในขวดปริมตร 250 ml

จากการทดลองการทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 14 Isolate ภายในระยะเวลา 20 วัน พบว่า ในการทดสอบในหลอดปริมาตร 8 ml ในครั้งที่ 1 SK 1-6 สามารถผลิตก๊าซได้ 3000 µl แต่ 13 Isolate ไม่สามารถผลิตก๊าซได้, ครั้งที่ 2 Sp 2/1-3 และ HK 2-3 สามารถผลิตก๊าซได้ 4750 µl และ 5600 µl แต่ 12 Isolate ไม่สามารถผลิตก๊าซได้, ครั้งที่ 3 แบคที่เรียสังเคราะห์แสง11 Isolate สามารถผลิตก๊าซได้แต่ผลิตในปริมาณที่น้อยถึงน้อยมาก, Isolate KK(KKU) 4-7 และ SK 1-6 สามารถผลิตก๊าซได้ 50 µl, Isolate vp 1/2 ไม่สามารถผลิตก๊าซได้

เมื่อขยายขนาดเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เป็น 15 ml 11 Isolate สามารถผลิตก๊าซได้แต่ผลิตในปริมาณที่น้อยถึงน้อยมาก, Isolate HK 2-3 สามารถผลิตก๊าซได้ 1000 µl, Isolate S1 และ vp 1/2ไม่สามารถผลิตก๊าซได้

ขยายขนาดเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพิ่มเป็น 100 ml ครั้งที่ 1, 14 Isolate ไม่สามารถผลิตก๊าซได้ เมื่อทดลองในครั้งที่ 2 จึงคัดเลือก Isolate ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซได้สูงที่สุด 3 Isolate จากการทดลองในการทดลองในหลอดปริมาตร 8 ml และ15 ml ได้แก่ Sp 2/1-3, SK 1-6 และ HK 2-3 พบว่า HK 2-3 สามารถผลิตก๊าซได้ 2000 µl ส่วน Isolate Sp 2/1-3 และ SK 1-6 สามารถผลิตก๊าซได้น้อย

ขยายขนาดเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพิ่มเป็น 250 ml เลือก Isolate HK 2-3 มาทำการทดสอบการผลิตก๊าซเนื่องจากในการทดลองเลี้ยงในขวด 100 ml สามารถผลิตก๊าซได้สูงที่สุดจากทั้งหมด 3 Isolate พบว่า HK 2-3 สามารถผลิตก๊าซได้ 4000 µl

(Barbosa et.al.,2001) Photosynthetic bacteria 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (*Rhodopseudomonas* sp., *Rhodospseudomonas palustris,* และ non-indentified strain) จากความแตกต่าง 4 แบบในการย่อย (shot-chainorganic acids lactate, malate, acetate and butyrate) และความเข้มแสงมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยให้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 2 แบบ โดยใช้ acetate เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยเปรียบเทียบอัตราการผลิตให้ไฮโดรเจนและความเข้มแสงพบว่า *Rhodopseudomonas* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงสุด ผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตรามากสุดที่ 25 ml H_2 l^{-1} h^{-1} ภายใต้ความเข้มแสงที่ 680 umolphotons m^{-2} s^{-1} และมีประสิทธิภาพมากที่สุดที่ 6.2% นอกจากนี้ความเข้มข้นของ acetate ยังลดลงจาก 22 ไปเป็น 11 mM ซึ่งมีในการลดลงของไฮโดรเจนนั้นลดลงจาก 214 ไปเป็น 27 ml H_2 pre vessel

ใช้เชื้อ photobioreactor 2 สายพันธุ์ของ Photosynthetic bacteria ได้แก่ *Rhodopseudomonas sphaeroide* RV และMTP4 ของ บริษัทลดเม็ดสี เพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสองสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน พลังงานแสงและอัตราการผลิตไฮโดรเจนมีผลต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลง RVและMTP4 พลังงานแสงมากจะมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าแสงน้อย ดังนั้นเครื่องปฏิกรณ์จะช่วยกระจายแสงทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 3.64 $l/M^2/h$ ที่ความเข้มแสง 500 W/M^{-2} ใน 24 ชั่วโมง(Masayasu, 2002)

Rhodopseudomonas capsulate สามารถใช้ volatile fatty acid เป็นตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนที่ใช้พลังงานแสง ศึกษาถึงการผสมของ acetate, propionate และ butyrate เพื่อใช้เป็นซับสเตรสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากเมล็ดใน photo-bioreactor ร่วมกับ *Rhodopseudomonas capsulate* ส่วนผสมของ acetate 1.8 g/l, propionate 0.2g/l และ butyrate 1.0 g/l ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ 37.8 ml/g dry weigth (dwt)/h ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงแสงอยู่ที่ 69% และ 45% คือประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงซับสเตรท โดยจะได้ไฮโดรเจนเป็นผลผลิตออกมาจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม acidogenic ซึ่ง H_2-producing จะผลิตได้มากที่สุดอยู่ที่ 24.9 ml/gdwt/h โดย *Rhodopseudomonas capsulate* และ H_2 yield จะเพิ่มขึ้นโดย three-fold ผ่านการรวมกันของการผลิตไฮโดรเจนของ anaerobic fermentative bacteria และ *Rhodopseudomonas capsulate* เปรียบเทียบกับ dark-fementation(shi.et.al.,2006)

การผลิตไฮโดรเจนจากการผสมกรดไขมันระเหย (VFAs) เปรียบเทียบ 3 สายพันธุ์ ของ Photosynthetic bacteria (*Rhodopseudomonas* sp., *Rhodospseudomonas palustris* W004., และ *Rubrivivax* sp.) ซึ่ง *Rhodopseudomonas* sp.และ *Rhodospseudomonas palustris* W004. เปลี่ยน butyrate และ acetate เป็นไฮโดรเจน ส่วน *Rubrivivax* sp. สามารถย่อย butyrate และ acetate แต่ไม่ผลิตไฮโดรเจนได้ หลังจากใช้ (VFAs) เป็น substrate จำนวนไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2191.7 ml/L ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา COD เท่ากับ 85.3% และได้ H_2 468.3 ml H_2 /gCOD เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ให้ผลดีสุด ใช้ butyrate เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้หลังจากการผสม (VFAs) สามารถย่อยได้อย่างสมบรูณ์(Xiaomin Wu, 2009)

การผลิตไฮโดรเจนจากการผสมกรดไขมันระเหย (VFAs) เปรียบเทียบ 3 สายพันธุ์ ของ Photosynthetic bacteria (*Rhodopseudomonas* sp., *Rhodospseudomonas palustris* W004., และ *Rubrivivax* sp.) ซึ่ง *Rhodopseudomonas* sp.และ *Rhodospseudomonas palustris* W004. เปลี่ยน butyrate และ acetate เป็นไฮโดรเจน ส่วน *Rubrivivax* sp. สามารถย่อย butyrate และ acetate แต่ไม่ผลิตไฮโดรเจนได้ หลังจากใช้ (VFAs) เป็น substrate จำนวนไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2191.7 ml/L ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา COD เท่ากับ 85.3% และได้ H_2 468.3 ml H_2 /gCOD เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ให้ผลดีสุด ใช้ butyrate เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้หลังจากการผสม (VFAs) สามารถย่อยได้อย่างสมบรูณ์(Xiaomin Wu, 2009)

งานตรวจสอบสรีระของ *R. rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodopseudomonas palustris* เกี่ยวกับ cellularmetabolism ต่อการผลิต H_2 หรือการสะสมลิเมอร์ที่ถูกเก็บในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงผลิตไฮโดรเจนโดยการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ไม่ต้องการออกซิเจนคือ *Rhodospirillum rubrum* ในอาหารที่ไม่มีการเติม sulfur ทำให้ขาดกำมะถันในการเจริญ จึงทำให้หยุดการสะสม bacteriochlorophyll and protein accumulation, และยับยั้งการผลิตก๊าซ H_2 ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมากและจำนวนพอลิเมอร์จะมาก พบว่ามีการสะสม extracellularly. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) เพิ่มขึ้นประมาณ 3.5 เท่าภายใน 24 ชั่วโมงของการ S-deprivation . เซลล์ส่วนใหญ่ยังคงทำงานได้หลังจาก 100 ชั่วโมงของการ S-deprivation และสามารคเลี้ยงให้กลับมาเลี้ยงให้เจริญและ เพิ่มการผลิต H_2 เมื่อเติมซัลเฟต จากการศึกษาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของ nitrogenase enzyme ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน H_2 ลดลงเมื่อประมาณครึ่ง 15 ชั่วโมงหลังการลดลงของกำมะถัน เมื่อทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้สูงถึง 1500 ml/hr นำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง GC พบว่า H2 บริสุทธิ์ 85-98%(Matthew R, 2009)

เลอลักษณ์ พบแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยง แบคทีเรีย 5.7 ลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 16 ลิตร และ ต่ำสุด 5.8 ลิตร จากการใช้แป้งดิบ 5 ชนิด และแป้งดิบถูกใช้ไปในการสร้างพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง คือ แป้งดิบถูกใช้ถึง 82 - 99 %

จากผลการทดลองการทดสอบการผลิตก๊าซอย่างละเอียดที่ได้กล่าวมาในข้างต้น พบว่าความสามารถในการผลิตก๊าซในละแต่ครั้ง ในการทดลองยังให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันเนื่องจากเชื้อแบคที่เรียสังเคราะห์แสงแต่ละไอโซเลทยังไม่เสถียรทำให้การผลิตก๊าซยังไม่คงที่และสภาพวะที่ใช้เลี้ยงยังไม่เหมาะสมได้แก่

1. อุณหภูมิไม่คงที่ เนื่องจากไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องทำให้อุณหภูมิขึ้นๆลงๆตามสภาพอากาศในแต่ละวัน
2. ความเข้มของแสงซึ่งในแต่ละจุดไม่ถึง 10000 luk ทำให้ได้รับแสงไม่เท่ากันจึงทำให้สังเคราะห์แสงได้ไม่เต็มที่ทำให้ได้พลังงานไปใช้ในเซลล์น้อย
3. อาหารที่ใช้เลี้ยงอาจจะยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาปริมาตรของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง
4. สภาพอากาศภายในหลอดหรือขวดทดลองไม่ได้ดูดอากาศออกแล้วเติมก๊าซไนโตรเจนเข้าไปแทนที่จึงทำให้ไม่อยู่ในสภาพไร้ออกซิเจนอาจส่งผลให้ไม่สามารถผลิตก๊าซได้
5. เกิดจากผู้ทำวิจัยเนื่องจากในขั้นตอนของการเตรียมเชื้อเริ่มต้นไม่ได้ทำการวัดความขุ่นให้ปริมาตรของเชื้อเริ่มต้นเท่ากันก่อนจึงอาจจะส่งผลให้การเจริญได้ไม่เต็มที่จึงผลิตก๊าซได้น้อย

4. ผลการวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน

ตารางที่ 5 แสดงการวัดการเจริญของตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ

ลำดับ	รายชื่อตัวอย่าง (Isolast)	ระยะเวลา(วัน)					
		0	6	12	15	18	24
1.	NM 1/2	0.183	0.548	0.763	0.594	0.641	0.699
2.	NM 1/3	0.333	1.454	2.469	2.025	1.902	3.768
3.	NM 3/1-1	0.105	0.187	0.556	0.663	0.710	0.808
4.	NM 3/1-2	0.623	2.394	2.601	3.935	2.395	3.575
5.	S1	0.225	1.424	1.308	1.052	1.376	1.536
6.	S1-2	0.210	0.693	0.670	1.460	0.966	0.902
7.	S3	0.133	0.148	0.332	0.463	0.519	0.728
8.	Sp 1/1-1	0.206	0.169	0.277	0.293	0.432	0.595
9.	Sp 2/1-3	0.197	0.519	0.684	0.621	0.658	1.554
10.	vp 1/1	0.316	0.819	1.335	1.764	1.538	1.256
11.	vp 1/2	0.158	1.316	1.330	1.218	1.386	1.784
12.	KK(KKU) 2-3	0.364	1.108	1.980	1.515	2.631	2.301
13.	KK(KKU) 4-2	0.273	0.195	0.301	0.902	0.875	0.826
14.	KK(KKU) 4-3	0.190	1.148	1.282	1.616	1.192	0.705
15.	KK(KKU) 4-5.1	0.212	1.256	1.170	0.462	0.576	0.407
16.	KK(KKU) 4-7	0.072	0.224	0.451	0.703	0.748	1.092
17.	KK(NM) 3-1	0.214	0.317	0.431	0.376	0.996	0.594
18.	KK(NM) 3-8	0.128	1.382	1.246	1.292	1.122	1.930
19.	KK(NM) 3-9	0.216	0.241	0.339	1.281	0.479	1.112
20.	KK(NM) 3-10	0.252	0.760	0.578	0.386	0.462	0.793
21.	KK(NM) 3-16	0.469	2.478	2.856	2.517	1.065	2.748
22.	KK(NM) 3-17	0.243	0.433	0.485	1.370	1.530	1.512
23.	KK(NM) 3-18	0.191	0.377	0.236	0.497	0.648	0.579
24.	KK(NM) 3-20	0.161	0.326	0.145	0.262	0.212	0.519
25.	KK(NM) 3-21	0.183	0.488	1.305	0.464	3.076	1.167
26.	NM 3/7	0.279	1.066	1.364	1.644	1.590	1.280
27.	NM3/17	0.126	0.273	1.218	1.282	1.068	0.880

28.	Muk 1-2	0.139	0.369	0.934	0.828	0.160	0.367
29.	Muk 2-1	0.191	0.622	1.208	1.494	1.490	1.176
30.	Muk 2-5	0.222	0.525	1.090	1.028	0.483	0.572
31.	Muk 2-18	0.140	0.401	1.166	1.148	1.190	0.566
32.	SK 1-1	0.169	0.465	1.305	0.384	0.292	0.333
33.	SK 1-4	0.072	0.119	0.644	0.474	2.265	1.860
34.	SK 1-6	0.301	0.234	0.505	0.541	0.809	1.422
35.	SK 2-2	0.316	0.607	1.617	2.679	1.686	1.977
36.	HK 1-1	0.191	0.584	0.292	0.306	0.695	1.412
37.	HK 2-3	0.238	0.651	1.296	1.236	1.160	0.694
38.	KR 1-2	0.199	0.430	1.488	0.635	0.578	0.970
39.	KR 1-3	0.320	0.696	1.368	1.947	1.269	1.467

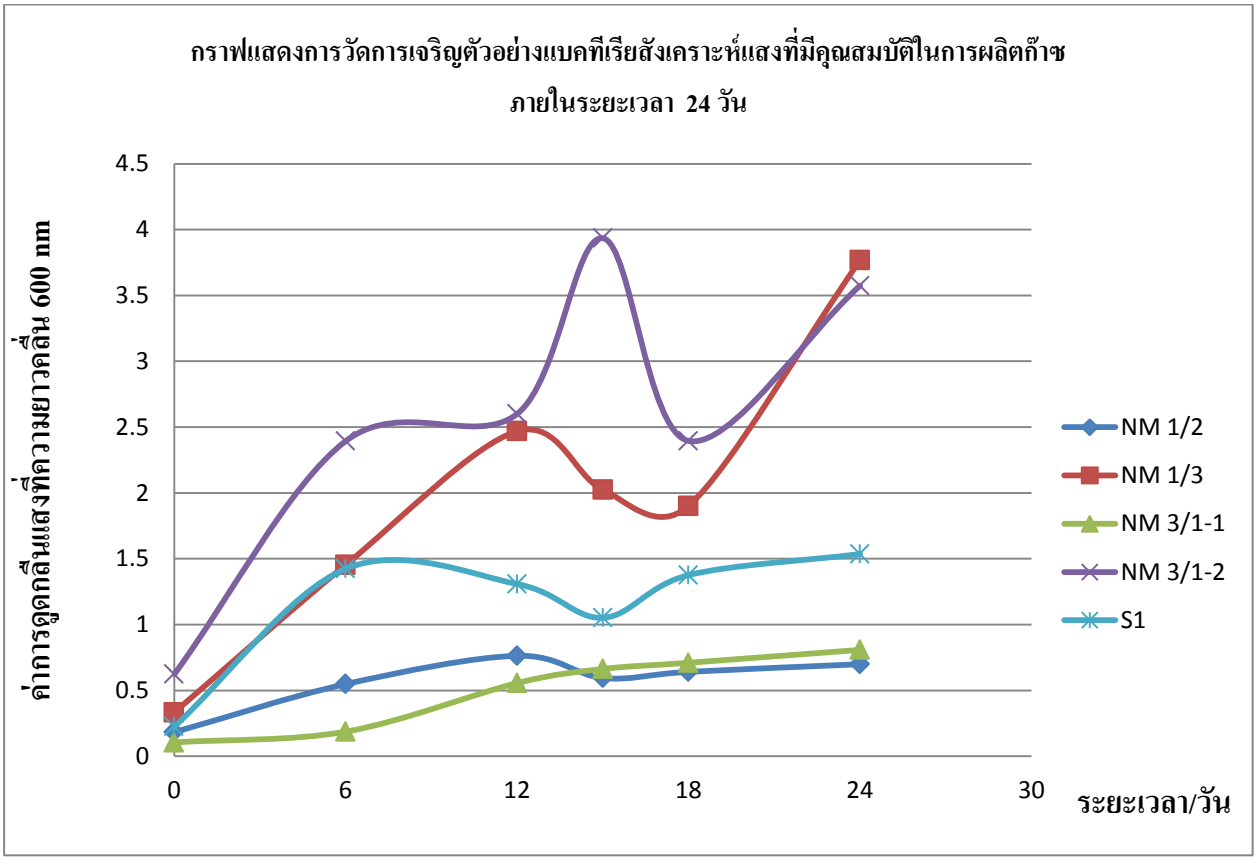
จากการทดลองการวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งพบว่าวันที่12 มีการเจริญสูงสุด 9 Isolate, วันที่15 มีการเจริญสูงสุด 11 Isolate, วันที่18 มีการเจริญสูงสุด 6 Isolate, วันที่24 มีการเจริญสูงสุด 13 Isolate ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ

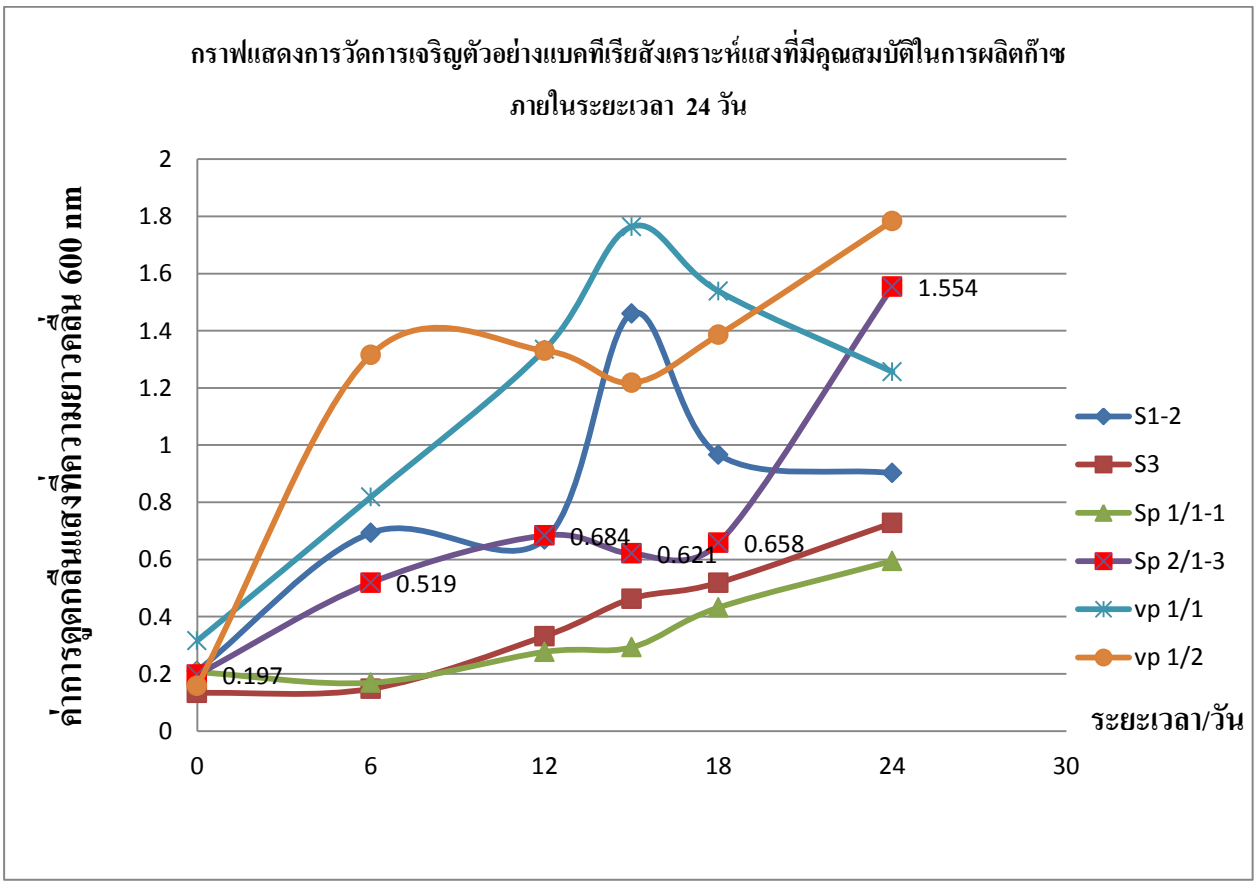
1. กลุ่มที่เจริญอยู่ในช่วง Log phase ที่ 0 - 12 วันซึ่งมีการเจริญอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่และเริ่มเข้าสู่ช่วง Stationary phase ในช่วง 12 วันเป็นต้นไป เป็นระยะที่แบคทีเรียจะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีกถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย

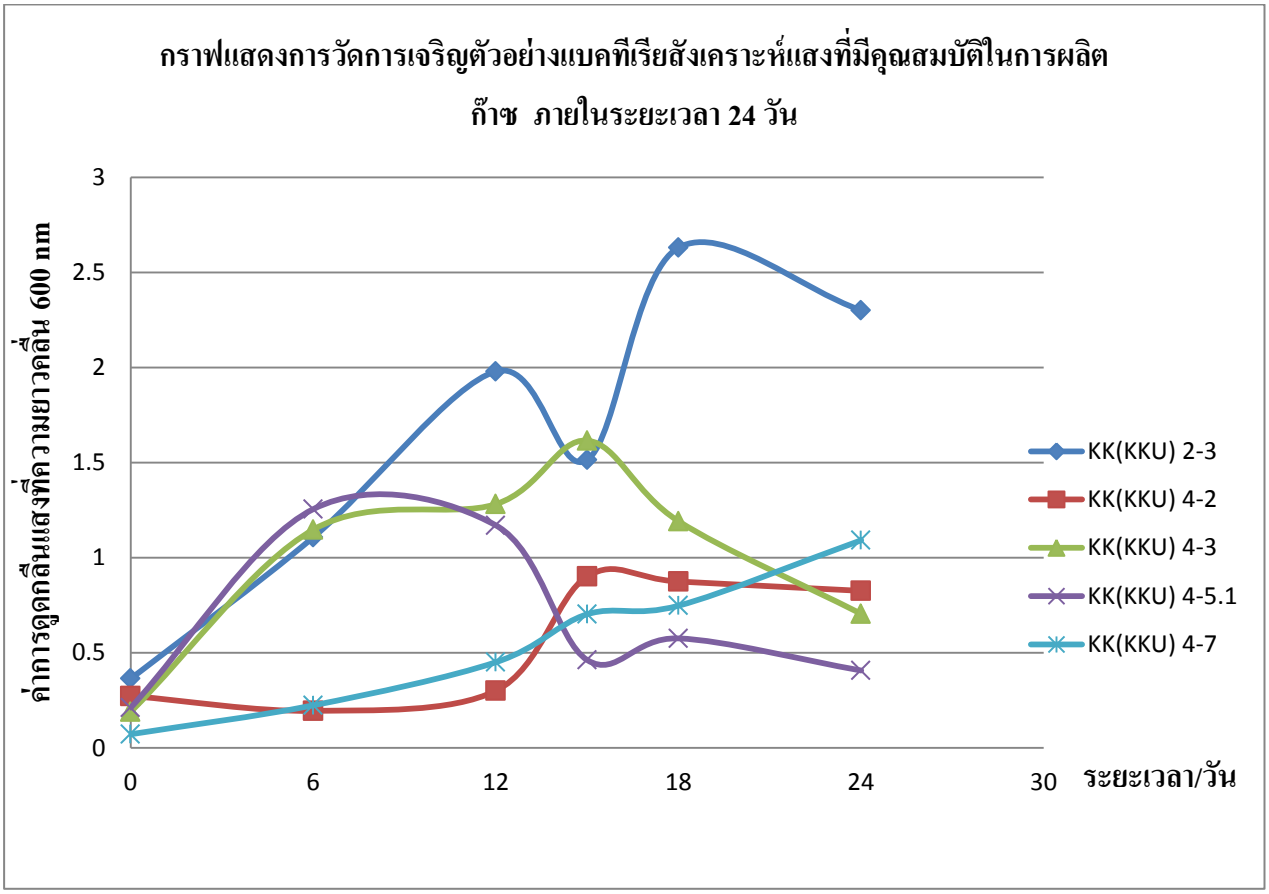
2. กลุ่มที่เจริญอยู่ในช่วง Log phase ที่ 6 – 18 วันซึ่งมีการเจริญอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่และเริ่มเข้าสู่ช่วง Stationary phase ในช่วง 18 วันเป็นต้นไป เป็นระยะที่แบคทีเรียจะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีกถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย

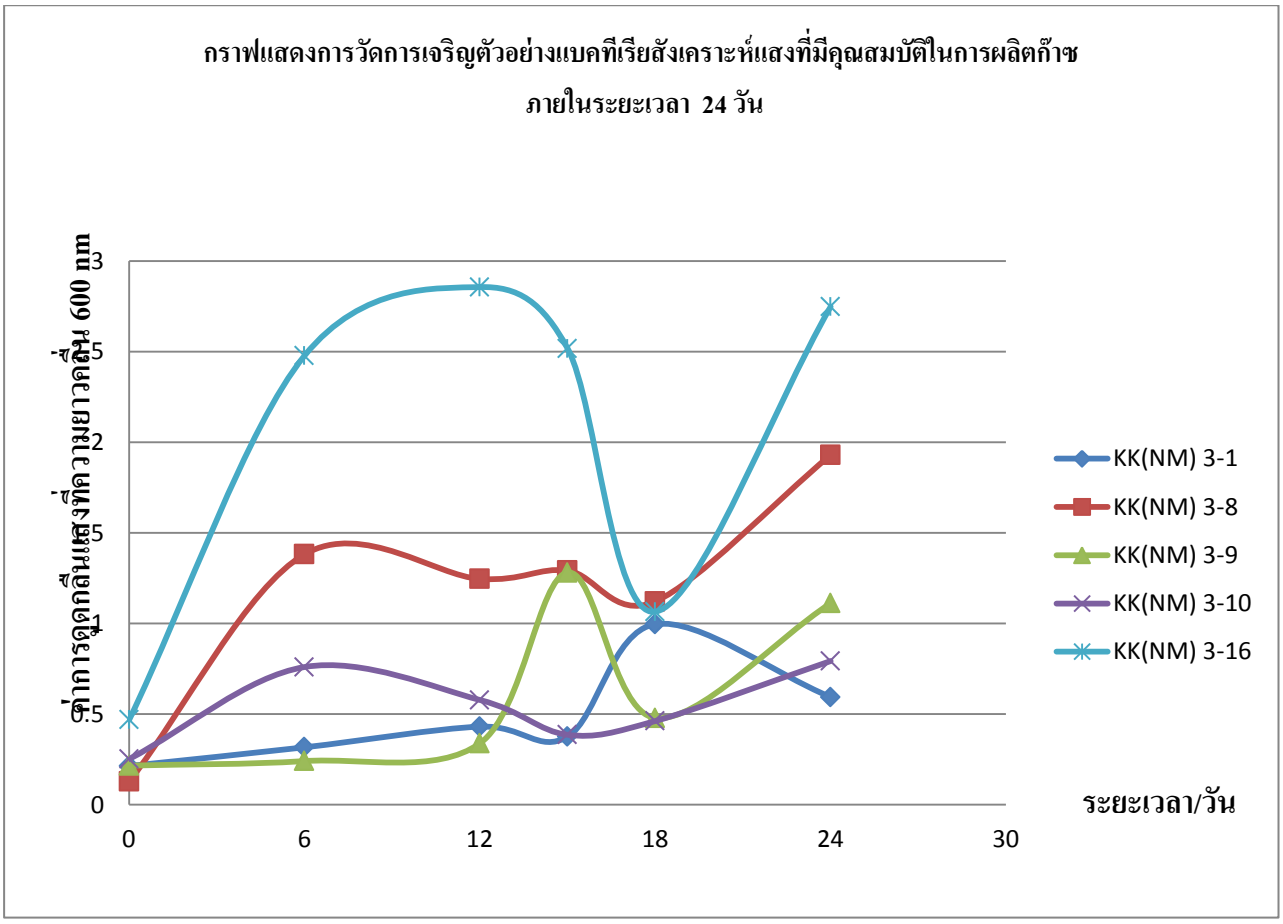
3. กลุ่มที่เจริญอยู่ในช่วง Log phase ที่ 0 – 6 วัน ซึ่งเจริญได้อย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่หลังวันที่ 6 เป็นต้นไป และกลุ่มที่เจริญอยู่ในช่วง Log phase ที่ 12 – 24 วัน ซึ่งเจริญไปอย่างช้าๆ และยังคงเจริญสูงอยู่ในวันที่ 24

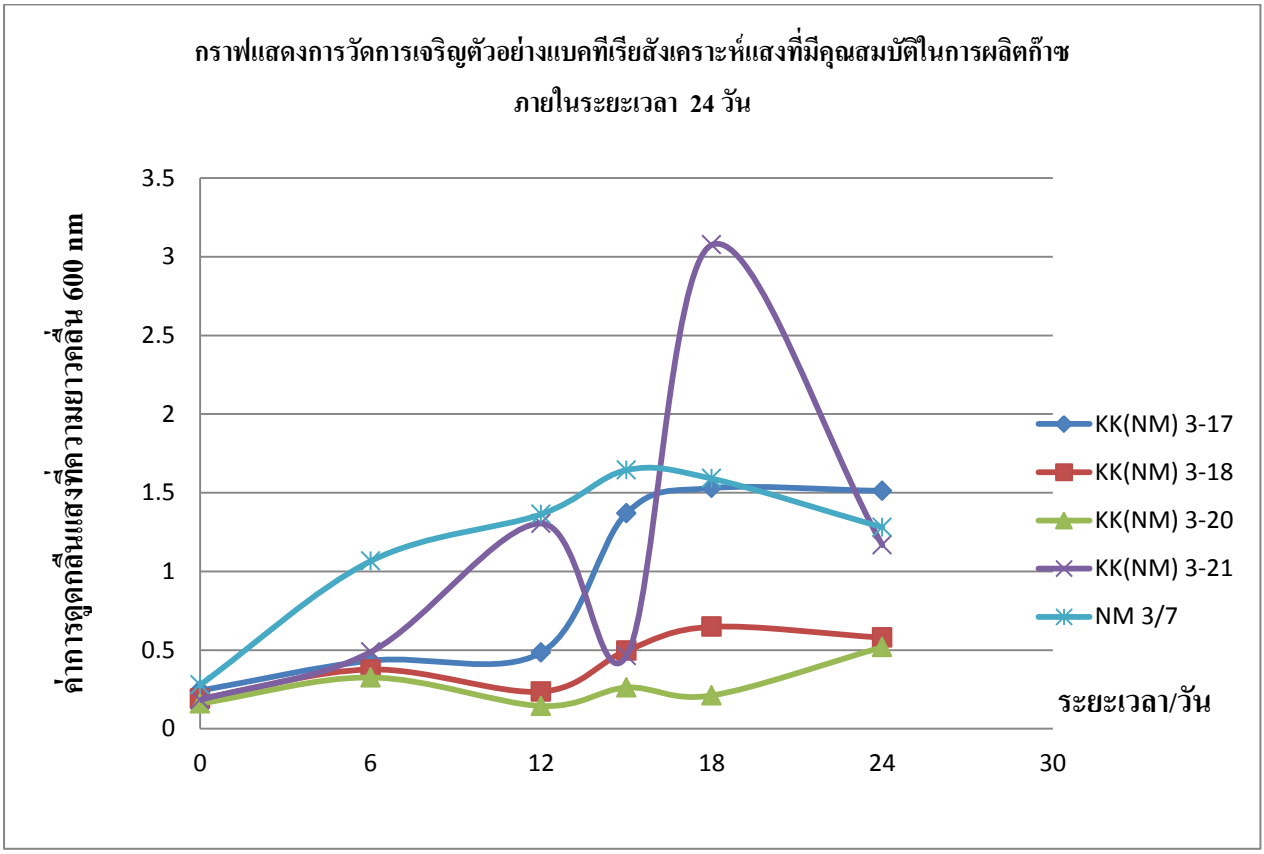
กราฟที่ 1 แสดงผลการวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน

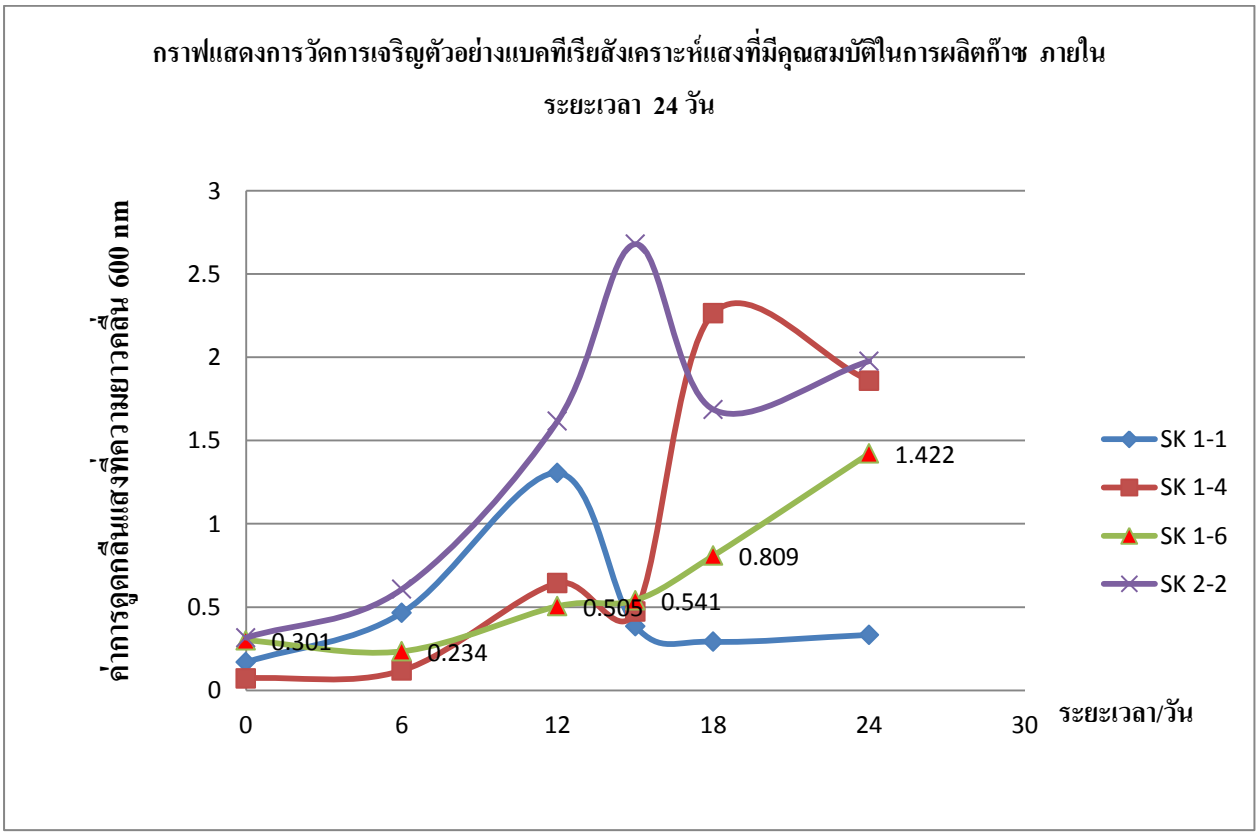


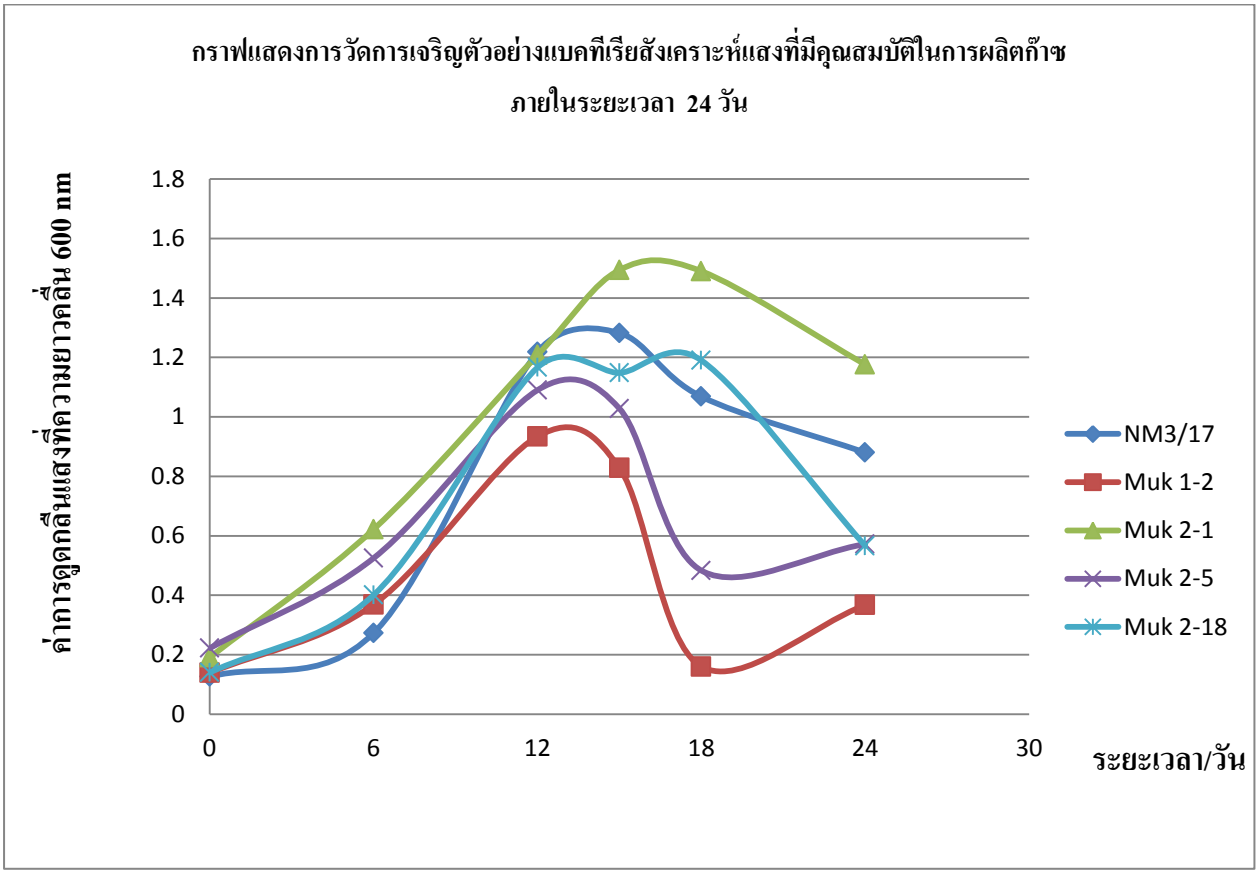


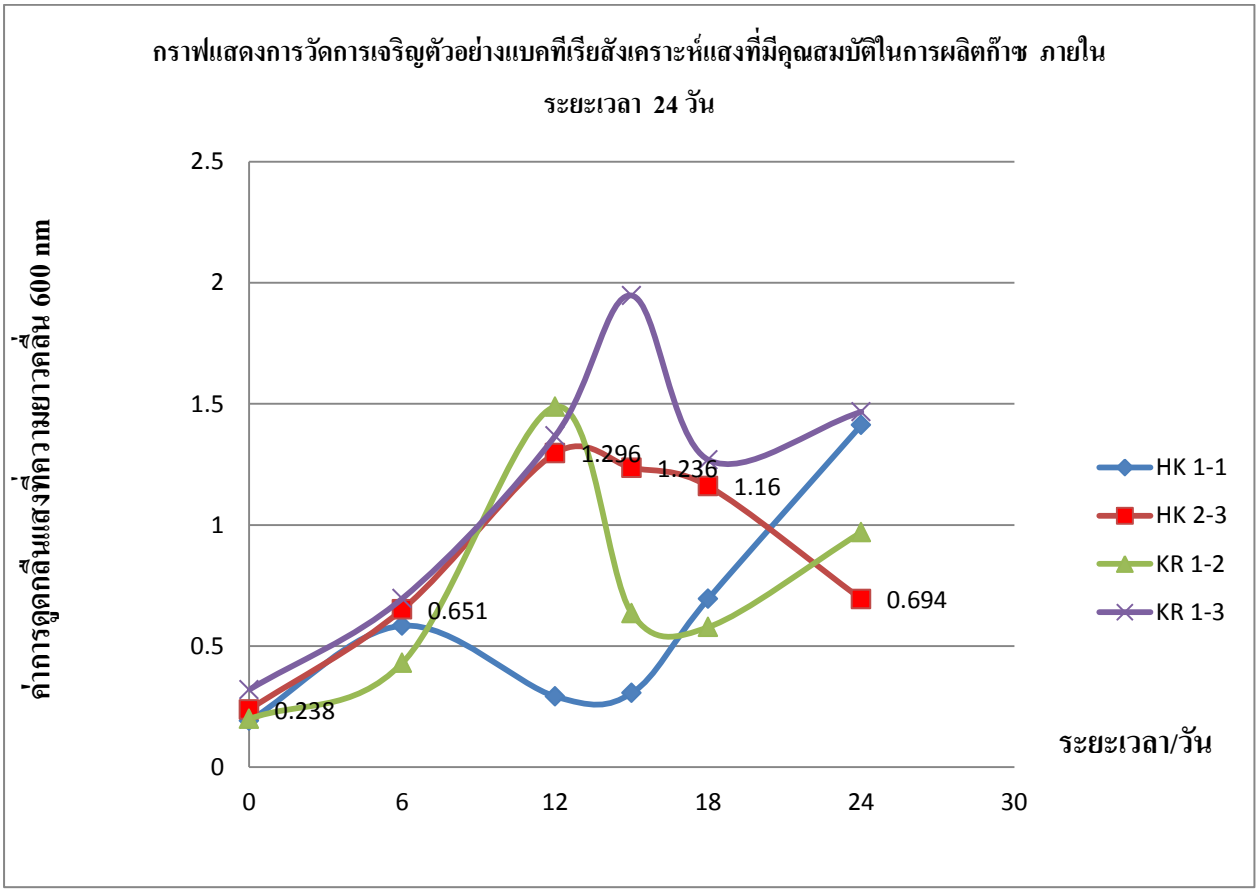

กราฟแสดงการวัดการเจริญตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีคุณสมบัติในการผลิต
ก๊าซ ภายในระยะเวลา 24 วัน
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
ระยะเวลา/วัน
KK(KKU) 2-3
KK(KKU) 4-2
KK(KKU) 4-3
KK(KKU) 4-5.1
KK(KKU) 4-7


กราฟแสดงการวัดการเจริญตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซ
ภายในระยะเวลา 24 วัน
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
ระยะเวลา/วัน
KK(NM) 3-1
KK(NM) 3-8
KK(NM) 3-9
KK(NM) 3-10
KK(NM) 3-16


กราฟแสดงการวัดการเจริญตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซ
ภายในระยะเวลา 24 วัน
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
6
12
18
24
30
ระยะเวลา/วัน
KK(NM) 3-17
KK(NM) 3-18
KK(NM) 3-20
KK(NM) 3-21
NM 3/7


กราฟแสดงการวัดการเจริญตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซ ภายใน
ระยะเวลา 24 วัน
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
6
12
18
24
30
ระยะเวลา/วัน
0.301
0.234
0.505
0.541
0.809
1.422
SK 1-1
SK 1-4
SK 1-6
SK 2-2


กราฟแสดงการวัดการเจริญตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซ
ภายในระยะเวลา 24 วัน
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
6
12
18
24
30
ระยะเวลา/วัน
NM3/17
Muk 1-2
Muk 2-1
Muk 2-5
Muk 2-18


กราฟแสดงการวัดการเจริญตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซ ภายใน
ระยะเวลา 24 วัน
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
6
12
18
24
30
1.296
1.236
1.16
0.694
0.651
0.238
ระยะเวลา/วัน
HK 1-1
HK 2-3
KR 1-2
KR 1-3

5. ผลการวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน

ตารางที่ 6 แสดงการวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ

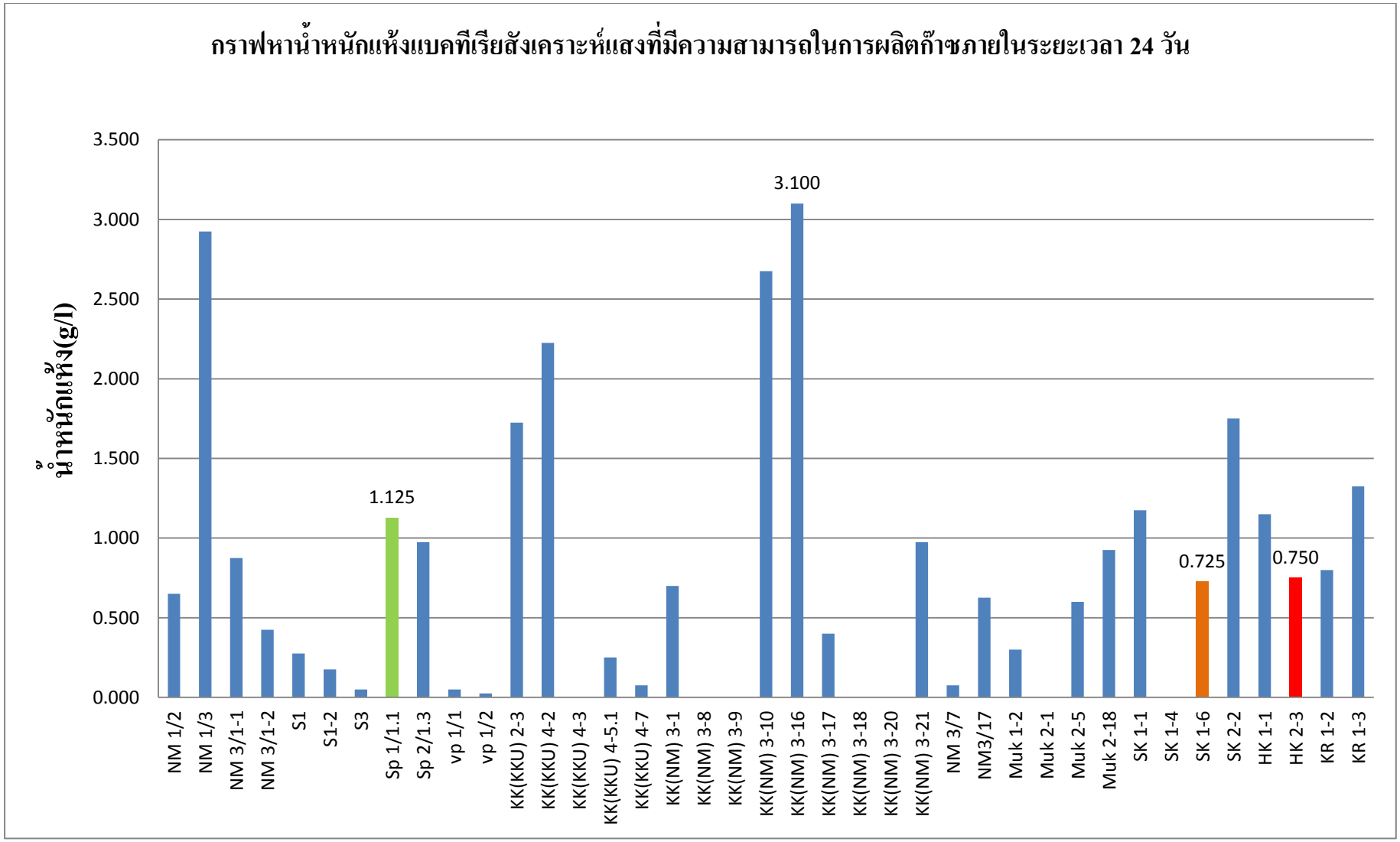
ลำดับ	รายชื่อ (Isolate)	น้ำหนักเซลล์วันที่ 0 (4ml)	น้ำหนักเซลล์วันที่ 24 (4ml)	น้ำหนักเซลล์ (4ml)	น้ำหนักเซลล์ (g/l)
1.	NM 1/2	0.0189	0.0163	0.0026	0.650
2.	NM 1/3	0.0279	0.0162	0.0117	2.925
3.	NM 3/1-1	0.0171	0.0136	0.0035	0.875
4.	NM 3/1-2	0.0272	0.0255	0.0017	0.425
5.	S1	0.0202	0.0191	0.0011	0.275
6.	S1-2	0.0185	0.0178	0.0007	0.175
7.	S3	0.0160	0.0158	0.0002	0.050
8.	Sp 1/1-1	0.0174	0.0129	0.0045	1.125
9.	Sp 2/1-3	0.0224	0.0185	0.0039	0.975
10.	vp 1/1	0.0180	0.0178	0.0002	0.050
11.	vp 1/2	0.0153	0.0152	0.0001	0.025
12.	KK(KKU) 2-3	0.0240	0.0171	0.0069	1.725
13.	KK(KKU) 4-2	0.0270	0.0181	0.0089	2.225
14.	KK(KKU) 4-3	0.0167	0.0188	0.0000	0.000
15.	KK(KKU) 4-5.1	0.0156	0.0146	0.0010	0.250
16.	KK(KKU) 4-7	0.0152	0.0149	0.0003	0.075
17.	KK(NM) 3-1	0.0194	0.0166	0.0028	0.700
18.	KK(NM) 3-8	0.0151	0.0179	0.0000	0.000

19.	KK(NM) 3-9	0.0128	0.0160	0.0000	0.000
20.	KK(NM) 3-10	0.0316	0.0209	0.0107	2.675
21.	KK(NM) 3-16	0.0231	0.0107	0.0124	3.100
22.	KK(NM) 3-17	0.0227	0.0211	0.0016	0.400
23.	KK(NM) 3-18	0.0159	0.0191	0.0000	0.000
24.	KK(NM) 3-20	0.0166	0.0293	0.0000	0.000
25.	KK(NM) 3-21	0.0302	0.0263	0.0039	0.975
26.	NM 3/7	0.0242	0.0239	0.0003	0.075
27.	NM3/17	0.0175	0.0150	0.0025	0.625
28.	Muk 1-2	0.0210	0.0198	0.0012	0.300
29.	Muk 2-1	0.0209	0.0232	0.0000	0.000
30.	Muk 2-5	0.0180	0.0156	0.0024	0.600
31.	Muk 2-18	0.0193	0.0156	0.0037	0.925
32.	SK 1-1	0.0229	0.0182	0.0047	1.175
33.	SK 1-4	0.0171	0.0205	0.0000	0.000
34.	SK 1-6	0.0205	0.0176	0.0029	0.725
35.	SK 2-2	0.0292	0.0222	0.0070	1.750
36.	HK 1-1	0.0166	0.0120	0.0046	1.150
37.	HK 2-3	0.0204	0.0174	0.0030	0.750

38.	KR 1-2	0.0233	0.0201	0.0032	0.800
39.	KR 1-3	0.0216	0.0163	0.0053	1.325

ผลการวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ พบว่า Isolate KK(NM) 3-16 มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด 3.100 g/l รองลงมาคือ NM 1/3 และ KK(NM) 3-10 น้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.925 และ 2.675 เมื่อนำข้อมูลน้ำหนักแห้งของ 3 Isolate เทียบกับการวัดการเจริญโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่ามีความสอดคล้องกันใน 2 Isolate คือ KK(NM) 3-16 และ NM 1/3 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงและเมื่อนำมาหาน้ำหนักแห้งจะมีน้ำหนักของเซลล์ที่สูงมากเช่นกันแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในอัตตราสูง ส่วน Isolate KK(NM) 3-10 มีน้ำหนักแห้งที่สูงแต่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรต่ำ เนื่องจากลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมักจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลองเมื่อนำมาเขย่าแต่ตะกอนจะไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทำให้เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงจะได้ค่าที่น้อยกว่าค่าจริง แต่เมื่อนำมาหาน้ำหนักแห้งจะดูดเอาตะกอนของเชื้อที่อยู่ในสารละลายไปด้วยจะทำให้ได้ค่าของน้ำหนักแห้งที่สูง

กราฟที่ 2 กราฟหาน้ำหนักแห้งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน



6. ผลการวัด pH ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน

ตารางที่ 6 แสดงการวัด pH ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน

ลำดับ	รายชื่อ (Isolate)	pH วันที่ 0	pH วันที่ 24
1.	NM 1/2	6.80	7.35
2.	NM 1/3	6.80	7.73
3.	NM 3/1-1	6.80	7.27
4.	NM 3/1-2	6.80	7.65
5.	S1	6.80	7.61
6.	S1-2	6.80	8.25
7.	S3	6.80	7.27
8.	Sp 1/1-1	6.80	7.34
9.	Sp 2/1-3	6.80	8.35
10.	vp 1/1	6.80	7.53
11.	vp 1/2	6.80	7.72
12.	KK(KKU) 2-3	6.80	8.41
13.	KK(KKU) 4-2	6.80	7.25
14.	KK(KKU) 4-3	6.80	8.08
15.	KK(KKU) 4-5.1	6.80	8.30
16.	KK(KKU) 4-7	6.80	8.05
17.	KK(NM) 3-1	6.80	8.32

18.	KK(NM) 3-8	6.80	8.04
19.	KK(NM) 3-9	6.80	8.09
20.	KK(NM) 3-10	6.80	7.53
21.	KK(NM) 3-16	6.80	8.56
22.	KK(NM) 3-17	6.80	8.11
23.	KK(NM) 3-18	6.80	7.43
24.	KK(NM) 3-20	6.80	7.44
25.	KK(NM) 3-21	6.80	7.30
26.	NM 3/7	6.80	7.57
27.	NM3/17	6.80	7.72
28.	Muk 1-2	6.80	7.41
29.	Muk 2-1	6.80	7.62
30.	Muk 2-5	6.80	7.32
31.	Muk 2-18	6.80	7.54
32.	SK 1-1	6.80	8.02
33.	SK 1-4	6.80	7.42
34.	SK 1-6	6.80	7.41
35.	SK 2-2	6.80	7.77

36.	HK 1-1	6.80	7.86
37.	HK 2-3	6.80	7.40
38.	KR 1-2	6.80	7.73
39.	KR 1-3	6.80	8.35

จากการวัด pH ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซจากวันที่ 0- 24 วัน พบว่า pH ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซในวันที่ 0 ไม่แตกต่างจากวันที่ 24 มากนัก จึงสรุปได้ว่า pH ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

7. ผลการการสกัด Bateriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ

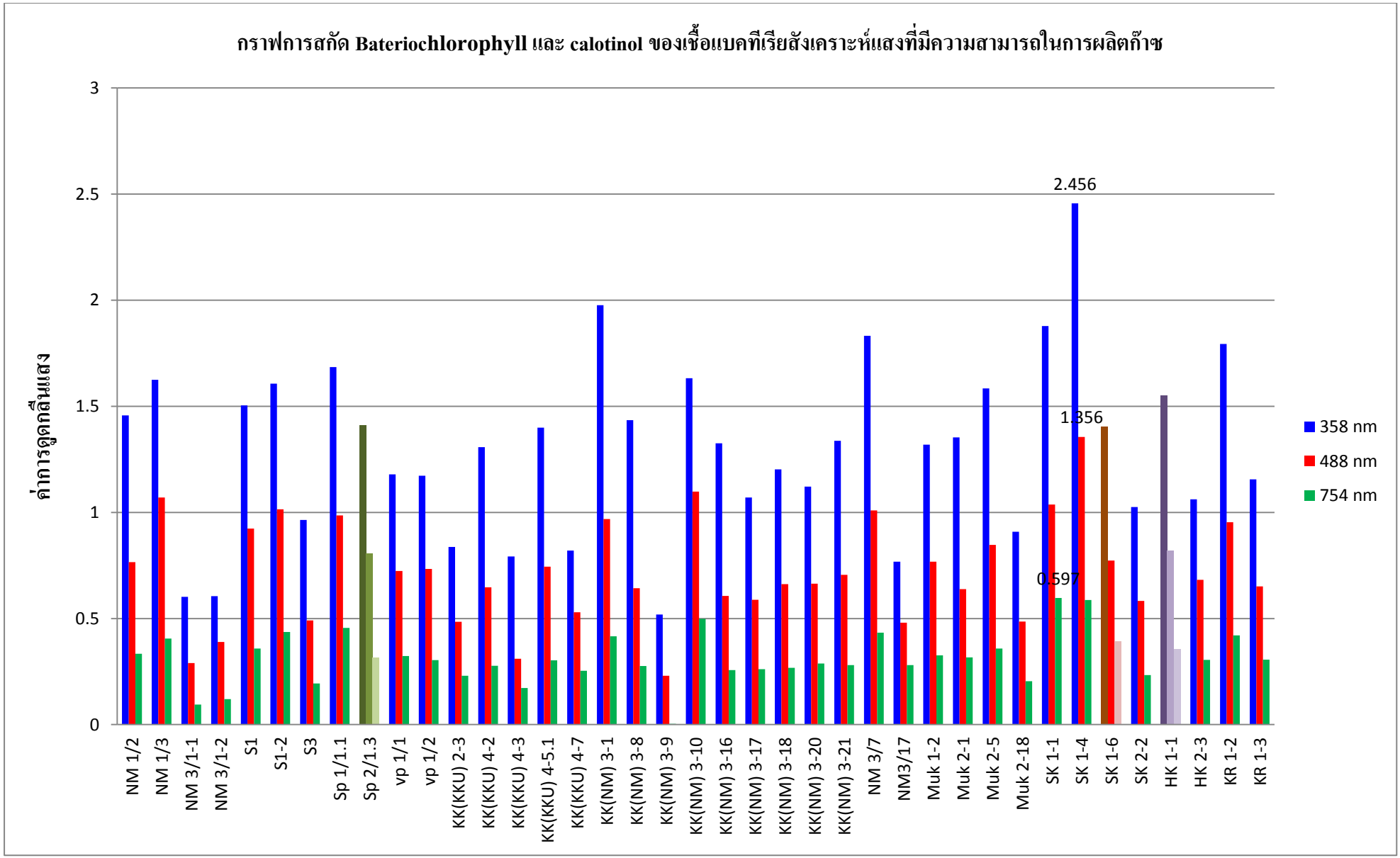
ตารางที่ 7 การสกัด Bateriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ

ลำดับ	รายชื่อตัวอย่าง (Isolast)	ค่าการดูดกลืนแสง		
		358	488	754
1.	NM 1/2	1.457	0.766	0.334
2.	NM 1/3	1.625	1.07	0.406
3.	NM 3/1-1	0.602	0.29	0.094
4.	NM 3/1-2	0.605	0.39	0.12
5.	S1	1.504	0.924	0.359
6.	S1-2	1.607	1.015	0.437
7.	S3	0.964	0.491	0.194
8.	Sp 1/1-1	1.685	0.986	0.456
9.	Sp 2/1-3	1.412	0.805	0.317
10.	vp 1/1	1.179	0.724	0.323
11.	vp 1/2	1.173	0.734	0.304
12.	KK(KKU) 2-3	0.837	0.485	0.23
13.	KK(KKU) 4-2	1.307	0.647	0.277
14.	KK(KKU) 4-3	0.792	0.31	0.173
15.	KK(KKU) 4-5.1	1.399	0.744	0.303
16.	KK(KKU) 4-7	0.82	0.529	0.254
17.	KK(NM) 3-1	1.977	0.969	0.416
18.	KK(NM) 3-8	1.435	0.643	0.276
19.	KK(NM) 3-9	0.519	0.23	0.004
20.	KK(NM) 3-10	1.632	1.098	0.498
21.	KK(NM) 3-16	1.326	0.606	0.257
22.	KK(NM) 3-17	1.07	0.588	0.261
23.	KK(NM) 3-18	1.203	0.662	0.268
24.	KK(NM) 3-20	1.122	0.664	0.288
25.	KK(NM) 3-21	1.337	0.706	0.281
26.	NM 3/7	1.832	1.009	0.433
27.	NM3/17	0.768	0.48	0.281
28.	Muk 1-2	1.319	0.768	0.326
29.	Muk 2-1	1.353	0.638	0.317

30.	Muk 2-5	1.584	0.847	0.359
31.	Muk 2-18	0.909	0.486	0.205
32.	SK 1-1	1.878	1.037	0.597
33.	SK 1-4	2.456	1.356	0.587
34.	SK 1-6	1.406	0.773	0.393
35.	SK 2-2	1.025	0.583	0.233
36.	HK 1-1	1.552	0.821	0.357
37.	HK 2-3	1.062	0.682	0.305
38.	KR 1-2	1.794	0.954	0.42
39.	KR 1-3	1.156	0.651	0.306

จากการสกัด Bacteriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซเมื่อนำมาเทียบกับกราฟวัดการเจริญ พบว่าไม่สอดคล้องกันเนื่องจากในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่ขึ้นกับจำนวนของ bacteriochlorophyll หรือ calotinol ที่สะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งบาง Isolate สามารถสะสม bacteriochlorophyll หรือ calotinol ได้มากแต่มีการเจริญน้อย หรือ Isolate ที่สะสม bacteriochlorophyll หรือ calotinol ได้น้อย แต่กลับมีการเจริญที่สูง

กราฟที่ 3 กราฟการสกัด Bateriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ



บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและไอโซเลทจาก Stock culture ได้จำนวน 65 ตัวอย่าง จากตัวอย่างดินโคลน โดยวิธี enrichment ใน Winogradsky column และในหลอดอาหารเหลว G5/Ormerod ในสภาพวะแสงที่ไม่มีออกซิเจนที่ความเข้มแสง 10000 lux สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ทั้งหมด 50 Isolate

เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในหลอดดักก๊าซและในอาหาร Semi-solid agar พบว่า 50 Isolate มี 39 Isolate ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ และ 11 Isolate ไม่สามารถผลิตก๊าซได้

ทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซอย่างละเอียดโดยวิธีการแทนที่น้ำของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 14 Isolate ภายในระยะเวลา 20 วัน พบว่าในการทดสอบในหลอดปริมาตร 8 ml ในครั้งที่ 1 SK 1-6 สามารถผลิตก๊าซได้ 3000 µl, ครั้งที่ 2 Sp 2/1-3 และ HK 2-3 สามารถผลิตก๊าซได้ 4750 µl และ 5600 µl, ครั้งที่ 3 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง11 Isolate สามารถผลิตก๊าซได้แต่ผลิตในปริมาณที่น้อยถึงน้อยมาก, Isolate KK(KKU) 4-7 และ SK 1-6 สามารถผลิตก๊าซได้ 50 µl

เมื่อขยายขนาดเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เป็น 15 ml 11 Isolate สามารถผลิตก๊าซได้แต่ผลิตในปริมาณที่น้อยถึงน้อยมาก, Isolate HK 2-3 สามารถผลิตก๊าซได้ 1000 µl, Isolate S1 และ vp 1/2 ไม่สามารถผลิตก๊าซได้

ขยายขนาดเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพิ่มเป็น 100 ml ครั้งที่ 1-14 Isolate ไม่สามารถผลิตก๊าซได้เมื่อทดลองในครั้งที่ 2 จึงคัดเลือก Isolate ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซได้สูงที่สุด 3 Isolate จากการทดลองในการทดลองในหลอดปริมาตร 8 ml และ15 ml ได้แก่ Sp 2/1-3, SK 1-6 และ HK 2-3 พบว่า HK 2-3 สามารถผลิตก๊าซได้ 2000 µl ส่วน Isolate Sp 2/1-3 และ SK 1-6 สามารถผลิตก๊าซได้น้อย

ขยายขนาดเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพิ่มเป็น 250 ml เลือก Isolate HK 2-3 มาทำการทดสอบการผลิตก๊าซเนื่องจากในการทดลองเลี้ยงในขวด 100 ml สามารถผลิตก๊าซได้สูงที่สุดจากทั้งหมด 3 Isolate พบว่า HK 2-3 สามารถผลิตก๊าซได้ 4000 µl

จากการทดลองการวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซภายในระยะเวลา 24 วัน โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งพบว่าวันที่12 มีการเจริญสูงสุด 9 Isolate, วันที่15 มีการเจริญสูงสุด 11 Isolate, วันที่18 มีการเจริญสูงสุด 6 Isolate, วันที่24 มีการเจริญสูงสุด 13 Isolate

ผลการวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ พบว่า Isolate KK(NM) 3-16 มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด 3.100 g/l รองลงมาคือ NM 1/3 และ KK(NM) 3-10 น้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.925 และ 2.675 แต่มีบาง Isolate ที่มีน้ำหนักแห้งในวันที่ 24 ต่ำกว่าวันที่ 0 เนื่องจากลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมักจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลองเมื่อนำมาเขย่าแต่ตะกอนจะไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทำให้เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงจะได้ค่าที่น้อยกว่าค่าจริง แต่เมื่อนำมาหาน้ำหนักแห้งจะดูดเอาตะกอนของเชื้อที่อยู่ในสารละลายไปด้วยจะทำให้ได้ค่าของน้ำหนักแห้งที่สูง เมื่อวัด pH ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซจากวันที่ 0- 24 วัน พบว่า pH ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซในวันที่ 0 ไม่แตกต่างจากวันที่ 24 มากนัก จึงสรุปได้ว่า pH ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เมื่อการสกัด Bacteriochlorophyll และ calotinol ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซเมื่อนำมาเทียบกับกราฟวัดการเจริญ พบว่าไม่สอดคล้องกันเนื่องจากในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่ขึ้นกับจำนวนของ bacteriochlorophyll หรือ calotinol ที่สะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งบาง Isolate สามารถสะสม bacteriochlorophyll หรือ calotinol ได้มากแต่มีการเจริญน้อย หรือ Isolate ที่สะสม bacteriochlorophyll หรือ calotinol ได้น้อยแต่กลับมีการเจริญที่สูง การวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงค่อนข้างยาก เนื่องจากลักษณะของเชื้อกลุ่มนี้มักจะตกตะกอนเซลล์อยู่ที่ก้นหลอด และเซลล์มักจำตัวกันเป็นกลุ่ม

จากการทดลองการทดสอบการผลิตก๊าซอย่างละเอียดสรุปได้ว่า ไอโซเลทที่ผลิตก๊าซได้สูงที่สุดคือ HK 2-3 เมื่อขยายขนาดเลี้ยงเป็นปริมาตร 250 มิลลิลิตร พบว่าไอโซเลท HK 2-3 สามารถผลิตได้ 4000 µl เมื่อวัดการเจริญด้วยวิธีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.694 นาโนเมตร หาน้ำหนักแห้งได้เท่ากับ 0.750 กรัมต่อลิตร pH เท่ากับ 7.40 แต่ความสามารถในการผลิตก๊าซในละแต่ครั้งในการทดลองยังให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันเนื่องจากเชื้อแบคที่เรียสังเคราะห์แสงแต่ละไอโซเลทยังไม่เสถียรทำให้การผลิตก๊าซยังไม่คงที่และสภาพวะที่ใช้เลี้ยงยังไม่เหมาะสมได้แก่ อุณหภูมิที่ไม่คงที่, ความเข้มของแสงซึ่งในแต่ละจุดไม่ถึง 10000 luk, อาหารที่ใช้เลี้ยงอาจจะยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญ , สภาวะที่ใช้เลี้ยงยังไม่ไร้ออกซิเจน 100 %

บรรณานุกรม

กระทรวงพลังงาน. 2549. (20 พฤษภาคม). **รู้เฟื่องเรื่องพลังงาน**. (Online). Available URL: http//www.energy.go.th/th/knowledseDetail.asp?Id=36

จารุวรรณ หวะสุวรรณ . 2532. **การกำจัดและการใช□ประโยชน□จากน้ำาทิ้งโรงงานแป□งมัน สำปะหลังโดยใช□แบคทีเรียสังเคราะห□แสงร□วมกับheterotrophic bacteria**.วิทยานิพนธ□ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร□.

ธวัชชัย ศุภดิษฐ์. 2548. **สิ่งแวดล้อม นิเวศวิทยา และการจัดการ.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : บ้านพิมพ์การพิมพ์.วิกิพิเดีย. 2549. (30 พฤษภาคม).

วิกิพิเดีย. 2549. (30 พฤษภาคม). **เชื้อเพลิงชีวภาพ**. (Online). Available URL: http//th.wikipedia.org/wiki

เอ็นเนอจี พลัส. 2547. **ไฮโดรเจน เชื้อเพลิงแห่งอนาคต**. นวัตกรรมและเทคโนโลยี. 2 (เมษายน – มิถุนายน) : 24 – 27

ละอองดาว แสงหล้า, วิระศักดิ์ เทพจันทร์, ธวัชชัย ศุภดิษฐ์, 2550. **ไฮโดรเจน : เชื้อเพลิงแห่งอนาคตที่ไม่มีวันสูญสิ้น**. วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม 3,1, 47-60

เลอลักษณ์ จิตรดอน , มงคล งามเจริญวงษ์, วิลาวัลย์ ชาญณรงค์ และคณะ. (31 ตุลาคม 2551). **ไฮโดรเจน: พลังงานสะอาดจากแป้งและน้ำทิ้ง.**(Online). สำนักบริการคอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ http://www.ku.ac.th/e-magazine/oct51/agri/agri3.htm.

อภิลักษณ์ สลักคำ, วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2548**. การผลิตไฮโดรเจนจากวิธีทางชีวภาพ**. ปีที่13. 1 (มกราคม-มีนาคม)

Akkerman, I., M. Janssen, J. Rocha and H.R. Wijffels, 2002. **Photobiological hydrogen production: Photochemical efficiency and bioreactor design**. Int. J. Hydrogen Energy, 27: 1195-1208.

Barbosa, W. M., W. C. Otoni, M. Carnelossi, E. Silva, A. A. Azevedo, and G. Vieira. 2001. **Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursors and by inhibitors**. Int. J. Hort. Sci. 7:47–51.

Buranakarl, L., H. Yoneyama and H. Takahashi. 1984. **Grow of pulple non-sulfir photosynthetic bacterium at 45^{0} C**. ICME Ann. Reports 7:392.

Burankarl, L., Ito, K., **Izaki and Takahashi. H**. 1998 Enzyme Microb. Technol. 10;173-179.

Hillmer, P. and Gest, H. 1977. **hydrogen metabolism in the photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas capsulate : H2 production by growing cultures**. J.Bacteriology. 129:724-731.

Hongoh, Y., yuzawa, H., Ohkuma, M., and Kudo, T.2003.**FEMS Microbiol**. Lett. 211:299-304.

Hydrogen production by microorganism. (online) (cited 25 April 2004). Available from : http://www.newenergy.org.cn/english/hydrogen/science/production.htm.

Imhoff, J. F. (1992). **The family *Ectothiorhodospiraceae***. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd edn, pp. 3222–3229. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.

Imhoff, J. F. & Trüper, H. G. (1992). **The genus *Rhodospirillum* and related genera**. In *the Prokaryotes*, 2nd edn, pp. 2141–2155. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Kim, J., Ito, K. and Takahadhi, H. 1980. **The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in Rhodopseudomonas palustris**. Agric.Biol.Chem. 44: 827-833.

Kim,. J., Ito, K. and Takahadhi, H. 1982. **Production of molecular hydrogen by Rhodopseudomonassp**. J.Ferment.Technol. 46: 937-941.

Kim, J.S., K.Ito, H. Yamauchi and H. TakaHashi. 1983. **Selection of a photosynthetic bacterium suitable hydrogen in outdoor cultures among strains isolate in Seoul, Taegu, sendai and Bangkok areas**. Agric.Biol.Chem. 46(6):1469-1474

Koku H, et al. 2002., **Aspects of the metabolism of hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides**, International Journal of Hydrogen Energy 27:1315-1329

KoKu, H. Eroglu I, Gunduz U, Yucel M, and TurKer L, 2003. **Kinetic of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroi* O.U. 001**. Int J. Hydrogen Energy 28:381-388

KoKu H. Eroglu I, Gunduz U, Yucel M, and TurKer L, 2003. **Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodopseudomonas sphaeroide***. Int J. Hydrogen Energy 28:381-388

Lee CM, Chen PC, Wang CC, and Tung YC (2002), **photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen Fermentation reactor effluent**. Int J. Hydrogen Energy 27:1309-1313.

Levett, P. N. 1990. **Anaaerobic Bacteria a Functional Biology**. St Edmunds bury Press L td. Philadelphia.116 p.

Mahaklan, P., C. Chobvijuk, M. Ngmjarearnwong, S. TraKulanalermsai, C. Bucke, J. Svasti, W. KanlayaKritd and L. Chitradon. 2005. **Molecular hydrogen production by a thermotolerant *Rubrivivax gelatinosus* using raw cassava starch as an eiectron donor.** *ScienceAsia*:415-424.

Mahakhan, P., Svasti,J., Bucke,C.,Kanlayakrit, W and Chitradon,L.2003. ***Rubrivivax gelatinosus* A photosyntic bacterium, that can dugest cassava starch**. The 29th Congress o*n Science* and Technology of Thailand, 20-22 October 2003, the Golden Jubilee Congress Hall, Khon Kaen University, Khon Kaen Thailand. (poster presentation)

Masayasu., Tatsuki., Jun., **Hydrogen production by combining two types of photosynthetic bacteria with different characteristics**. International Journal of Hydrogen Energy 27 (2002) 1303 – 1308 2002.Ormerod,J.G.K.S. Ormerod and H.Gest. 1961. Arch. Biochem. Biophy. 94;449-463

Maeda K., Okamoto Y. 1998., **Unusual Conformational Change of Optically Active Poly(3-((*S*)-*sec*-butoxycarbonyl)phenyl isocyanate**)., *Macromolecules*, 31, 5164-5166

Matthew R., Melnicki, Ela Eroglub, Anastasios Melisa,b, **Changes in hydrogen production and polymer accumulation upon sulfur-deprivation in purple photosynthetic bacteria**. international journal of hy drogen energy 34 (2009) 6157–6170.

Pfenning, N. and H.G.Truper. 1989. **Anoxygenic phototrophic bacteria**, pp. 1635-1682.

Product and delivery : **Hydrogen production technologies**. (online) (cited 25 April 2004). Available from : http://www.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/hydrogen/production.html.

Research and development on biological hydrogen production. (online) (cited 25 April 2004).Available from : http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0g.htm#5.6%20future%20prospects.

Sasikala, K., Romana, C. and Roa, P. 1992. **Photoproduction of hydrogen from the wastewater of distillery by Rhodobacter sphaeroides O.U. 001**. Int.J.Hydrogen Energy. 17: 23-27.

Sasikala, K., Romana, C., Roa, P. and Kovacst, K.1993. Anoxygenic phototrophic bacteria :physiology and advance in hydrogen production technology. In advances in applied microbiology. California :Academic Press.

Segers, L. And W.P. Verstamate. 1983. **Conversion of orgabic acids to hydrogen by *Rhodospirillaceae* grow with glutamate or dinitrogen as nitrogen source**. Biotech. Bioeng.25:2843-2853.

Sigh, S., Srivastava, S. and Pandey, K. 1994. **Hydrogen production by *Rhodopseudomonas sp*. At the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey**, Int.J.hydrogen Energy. 19:437-440.

Staley,J. T., M. P. Bryant, N. Pfening and J. G. Holf. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Tohru, K. and Yasuo, I. 1989. **Biomass Handbook.** New York: Gordon and Breach Science Publishers.

Watanabe T., Fan J. 1998**. *Atherosclerosis and inflammation mononulear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis***. *Int J Cardiol*.; 66: 45-53.

Watanabe, T., J. S. Kim. K. Ito, L. Burannakarl, T. Kampee and H. Takahashi. 1979. **hydrogen by photosynthetic bacterium isolated from Thailand**. Microbail Utilization of Renewable Resources 1:181-185

Xiaomin., Xueqing., Honghui., Liejin., **A comparison of hydrogen production among three photosynthetic bacterial strains**. International journal of hydrogen energy xxx (2010) 1–6

Yoneyama, H.T. lwata, S. Okuda, J.S. Kim, L. Buranakarl, T. Kanpee and H. TaKahashi. 1981.**Isolation of thermostable nature photosynthetic bacterium**. ICME Ann. Reports 5:325.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Minimal medium of Ormerod (Ormerod และคณะ, 1961) ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เติมวิตามิน 4 ชนิด คือ ไธอามีน, ไบโอติน, กรดนิโคตินิค และพาราอะมิโนแบนซอิค ซึ่งมีองค์ประกอบดั้งนี้

K_2HPO_4	0.9	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.6	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	75.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	11.8	มิลลิกรัมต่อลิตร
EDTA.2Na	20.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
p-aminobenzoic acid	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Thiamine HCl	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Nicotinic acid	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Biotin	15.0	ไมโครกรัมต่อลิตร
Trace element		
Trace element ที่ใช้คือ		
H_3BO_3	280.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4.4H_2O$	210.0	มิลลิกรัม
$Na_2MoO_2.2H_2O$	75.0	มิลลิกรัม
$ZnSo_4.7HO$	24.0	มิลลิกรัม
$Cu(NO_3).3H_2O$	4.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิตร

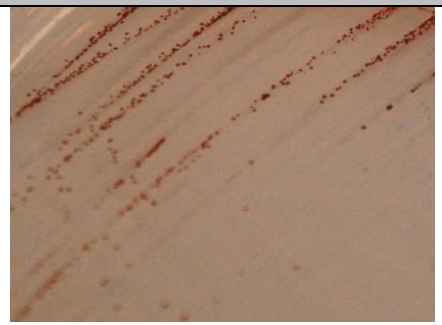
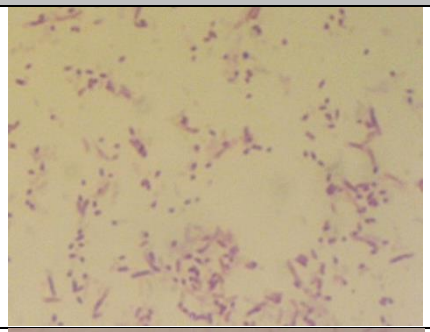
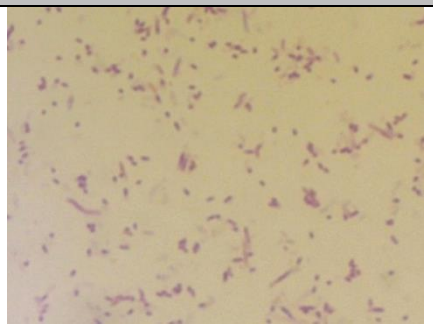
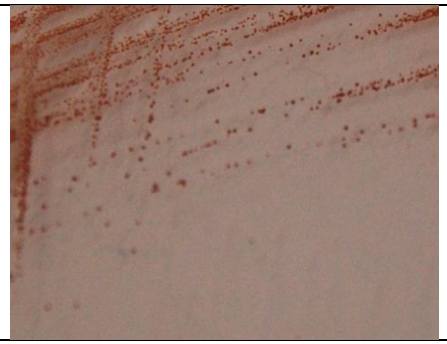
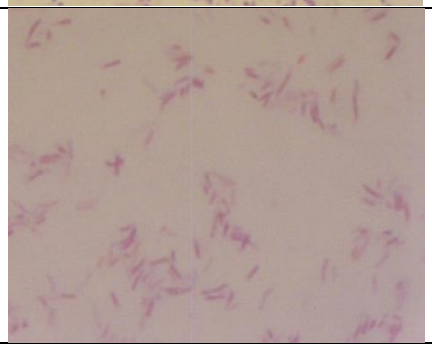
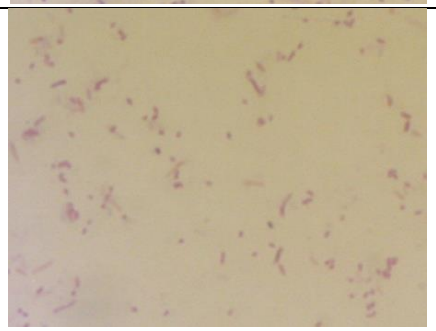
ส่วนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามจุดประสงค์ของการทดลอง พีเอช 6.8

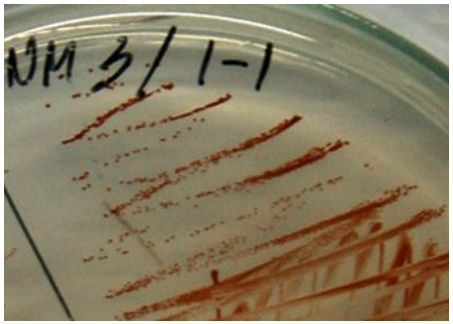
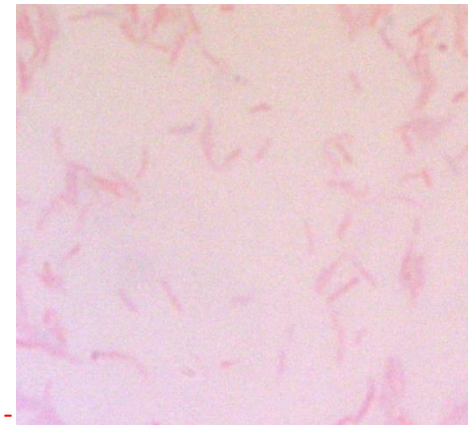
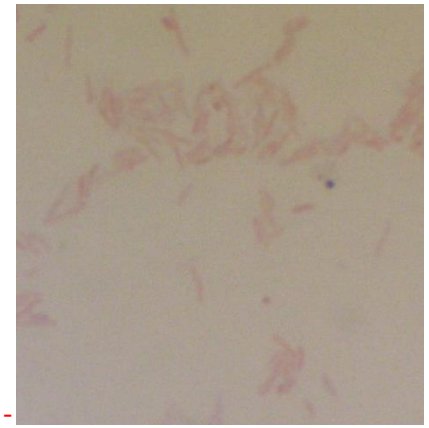
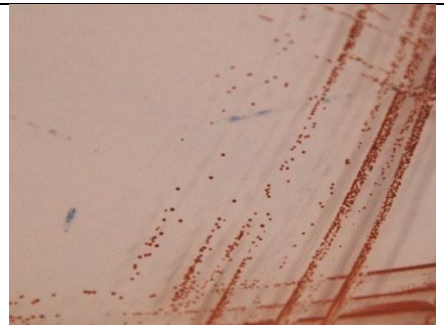
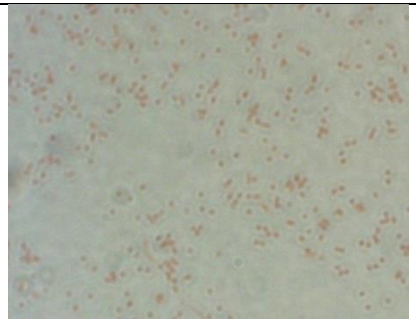
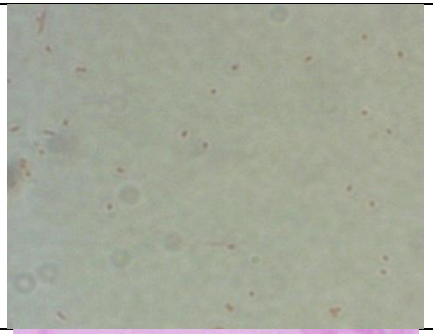
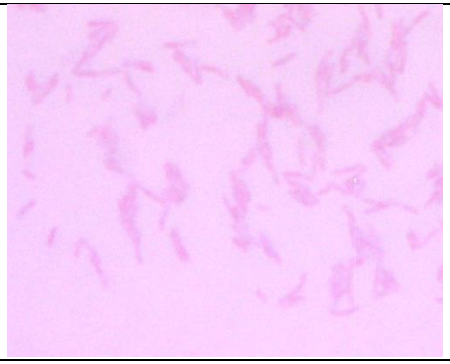
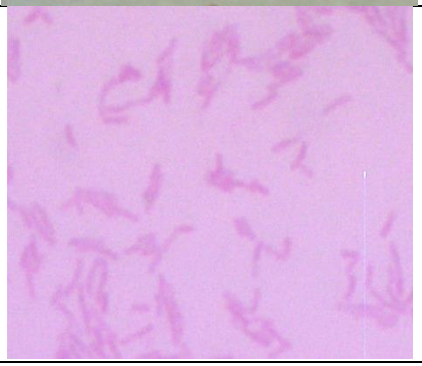
Glutamic acid	0.8	กรัมต่อลิตร
Malic acid	0.7	กรัมต่อลิตร

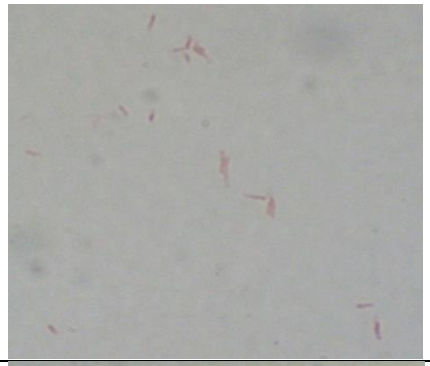
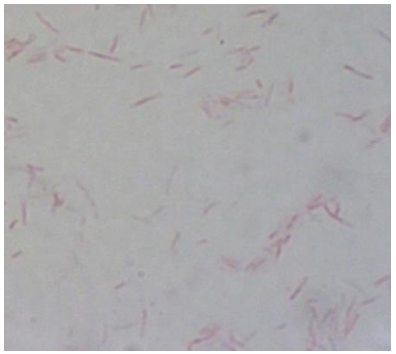
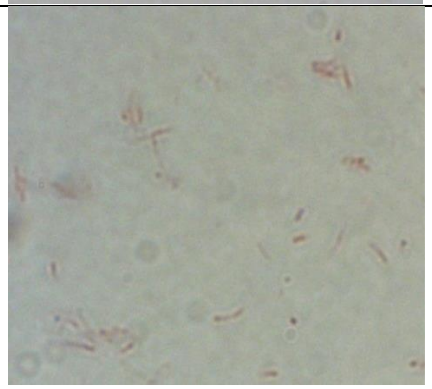
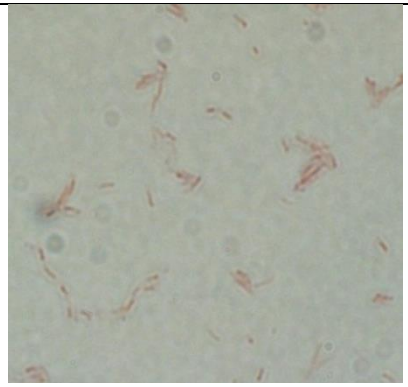
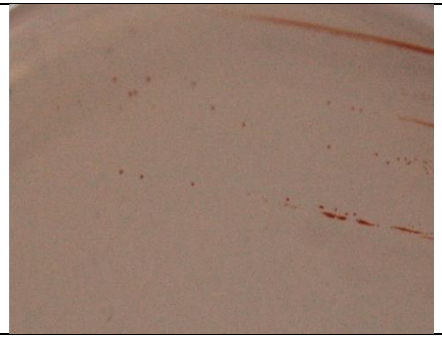
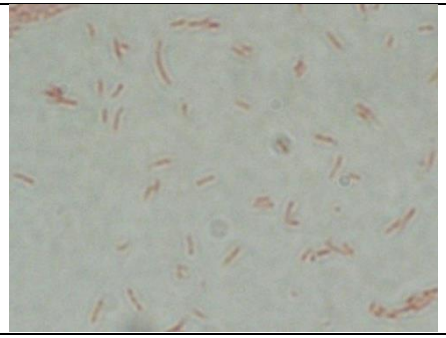
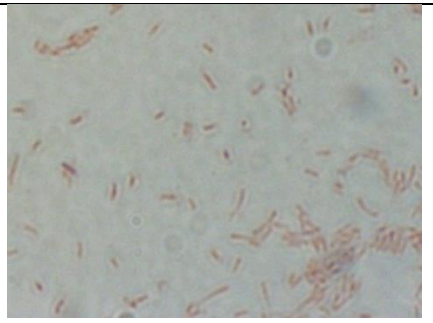
2. G-5 (Kohlmiller และ Gest,1951) มีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

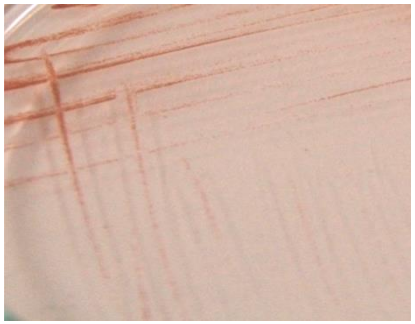
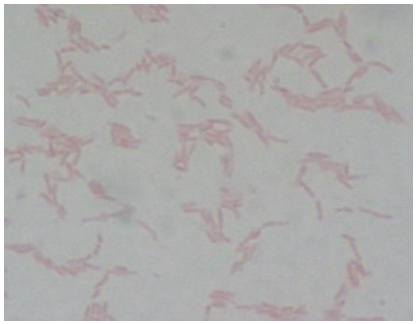
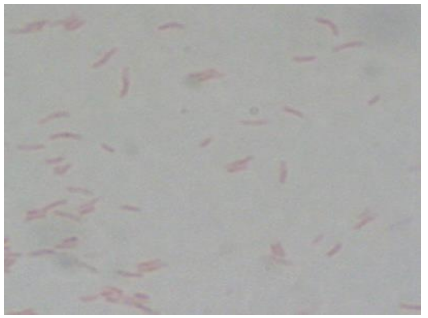
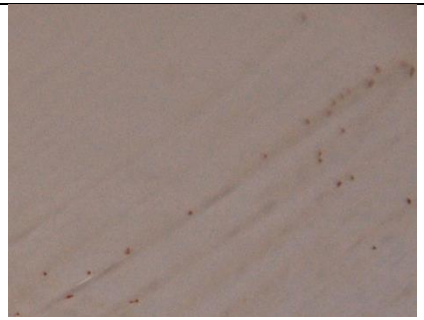
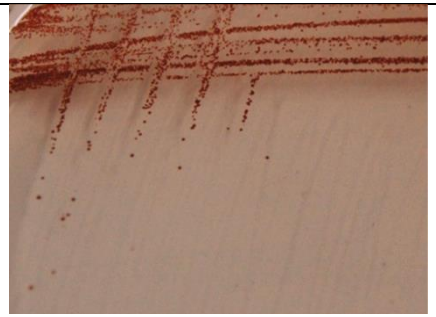
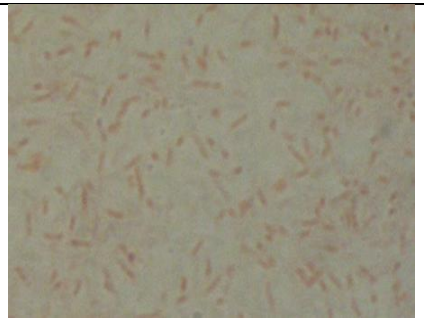
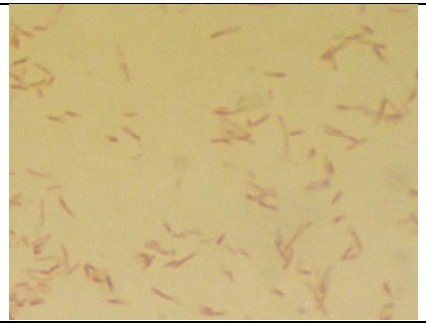
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Sodium L-glutamate	4.0	กรัมต่อลิตร
Sodium DL-malate	3.5	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร
Potassium dihydrogen phosphate	0.12	กรัมต่อลิตร
Dipotassium hydrogen phosphate	0.18	กรัมต่อลิตร

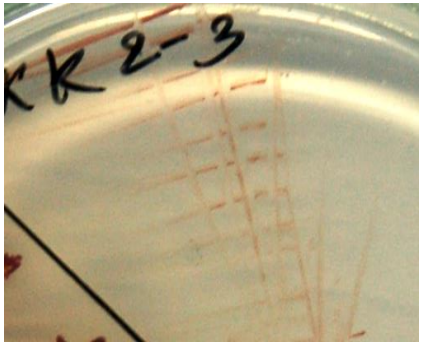
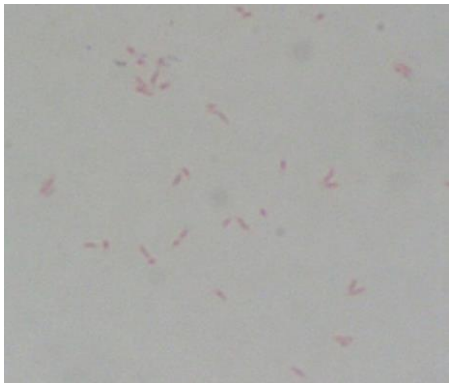
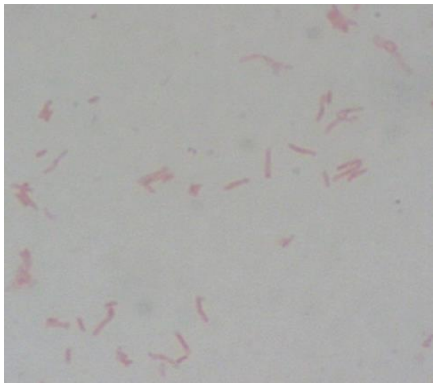
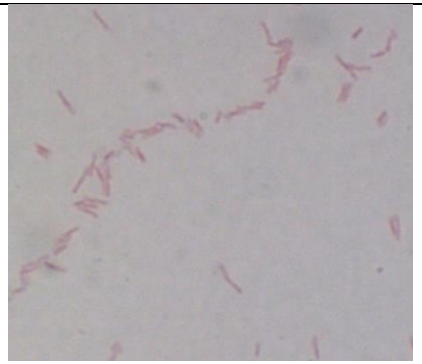
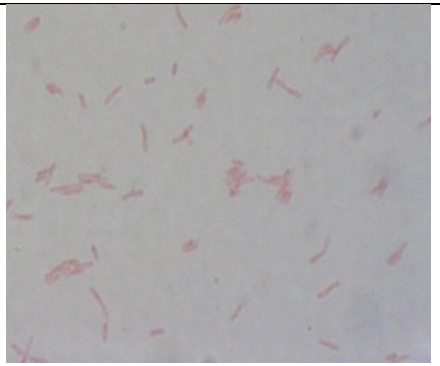
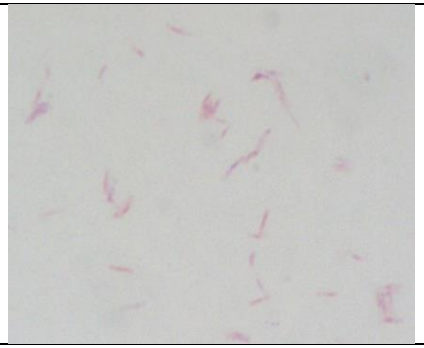
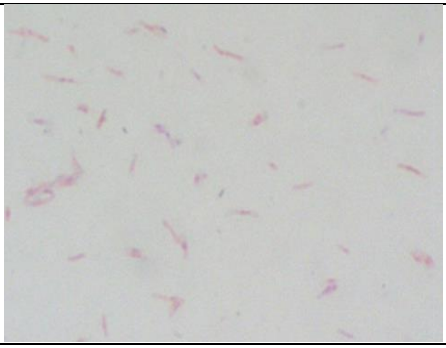
รูปภาพที่ 13 ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในอาหาร Ormerod's, ลักษณะโคโลนีและรูปร่างทางสันฐานวิทยา

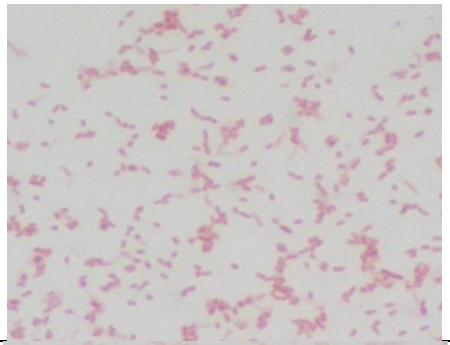
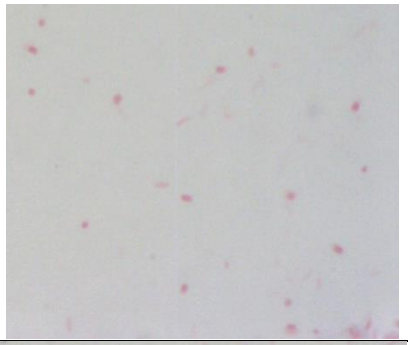
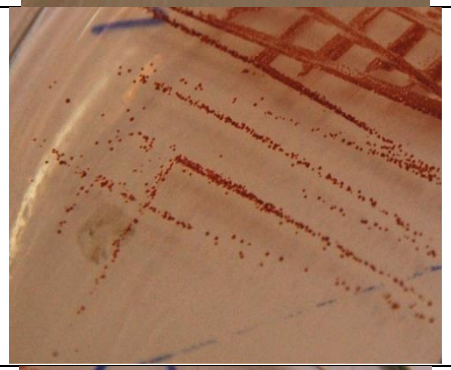
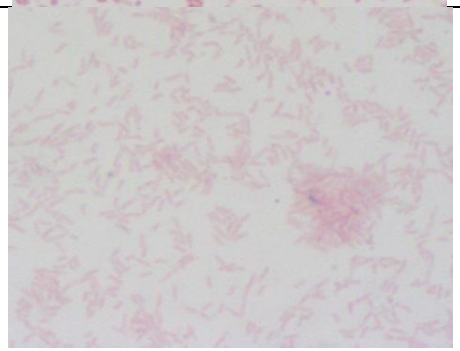
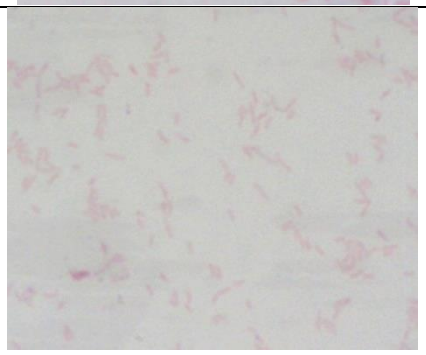
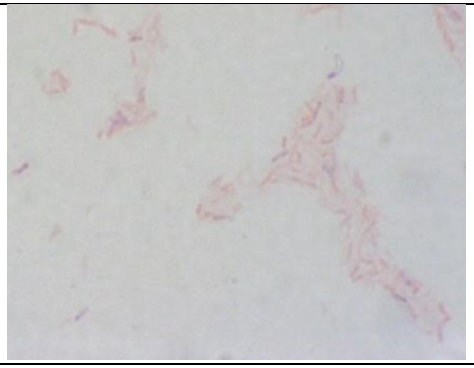
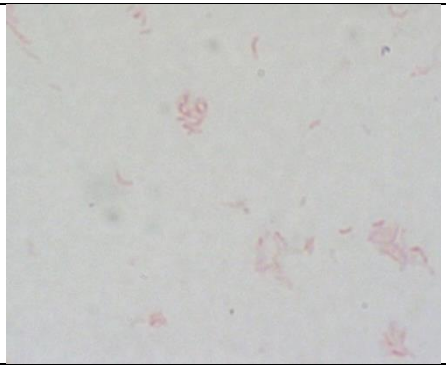
รายชื่อตัวอย่าง	รูปภาพ			
(Isolate)	หลอด	โคโลนี	รูปร่างทางสันฐานวิทยา	
NM 1/2				
NM 1/3				

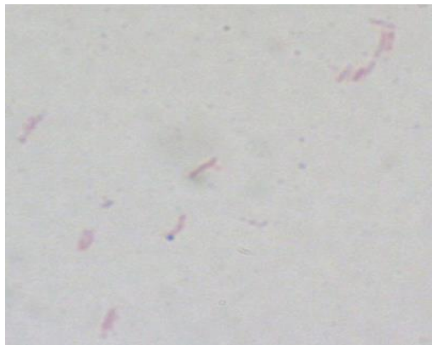
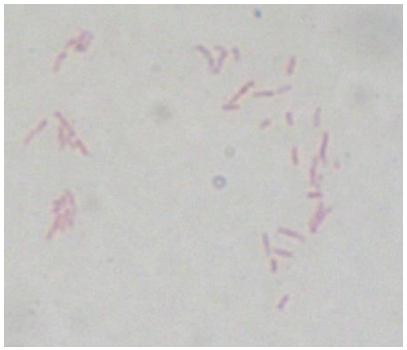
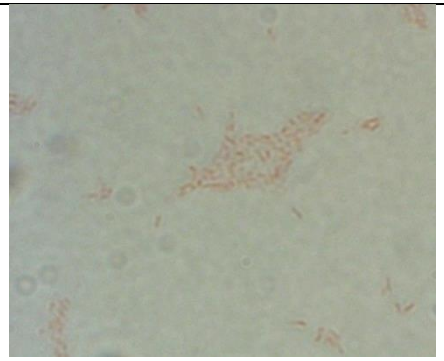
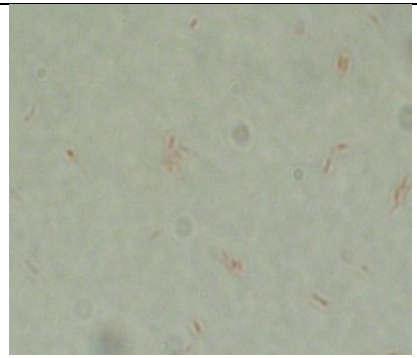
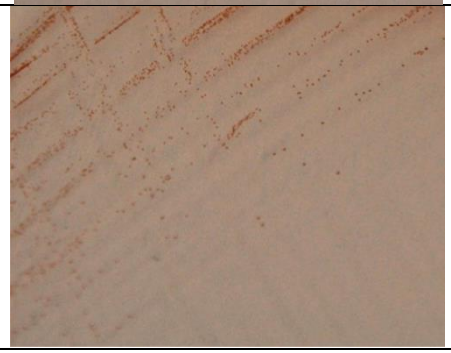
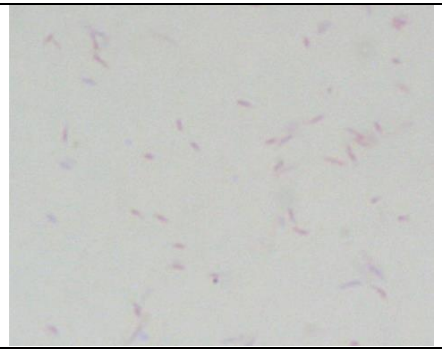
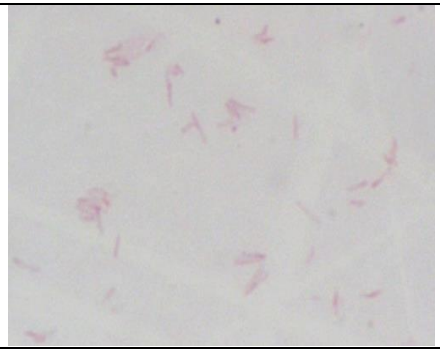
NM 3/1-1				
NM 3/1-2				
S1				

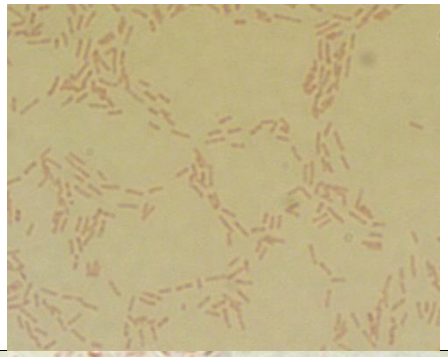
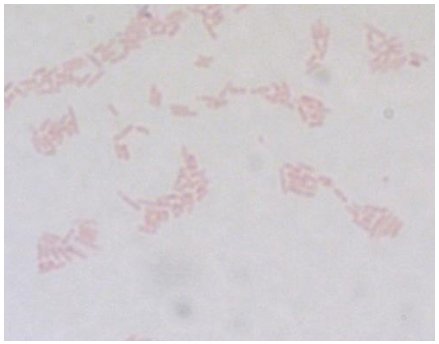
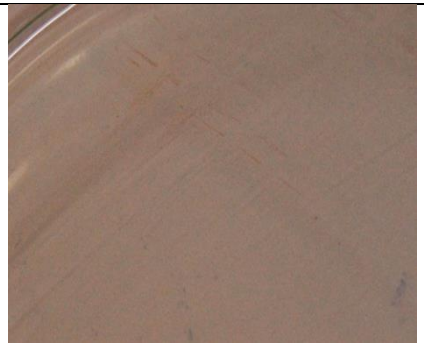
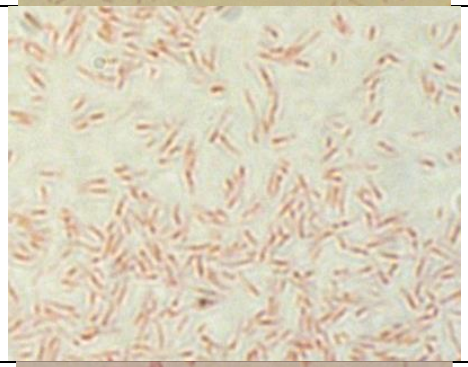
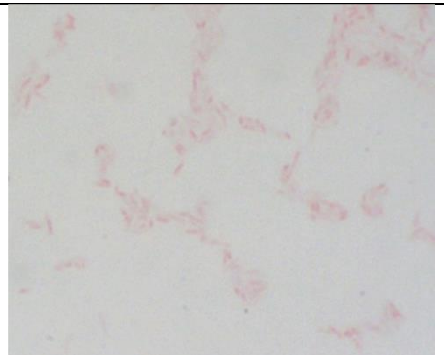
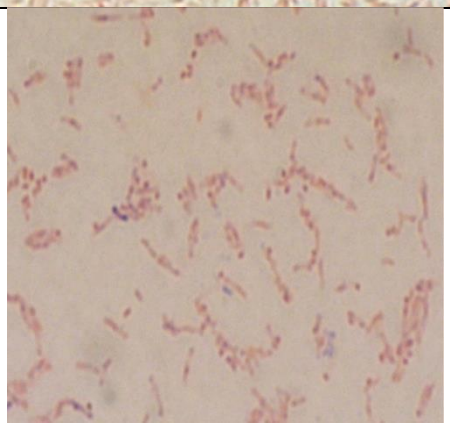
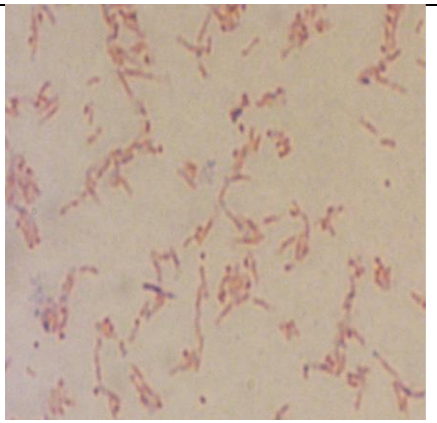
S1-2				
S3				
Sp 1/1-1				

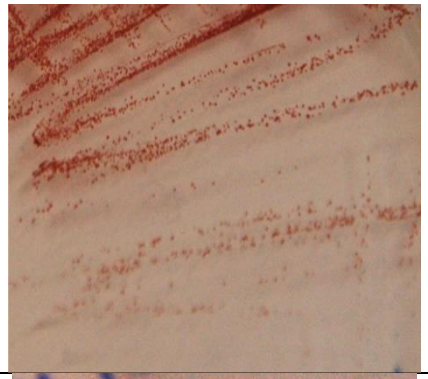
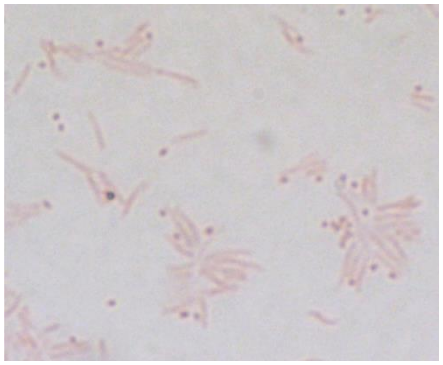
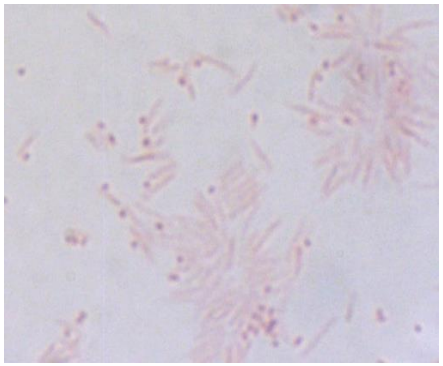
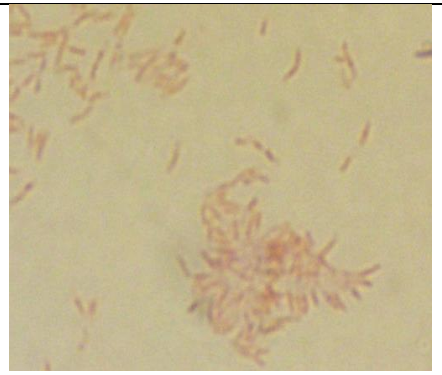
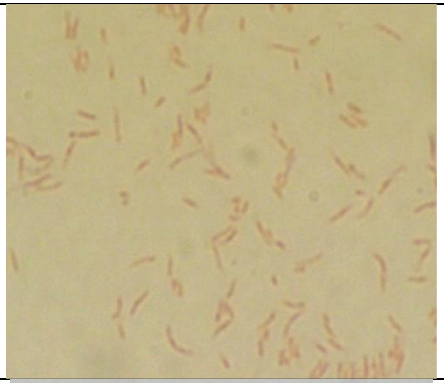
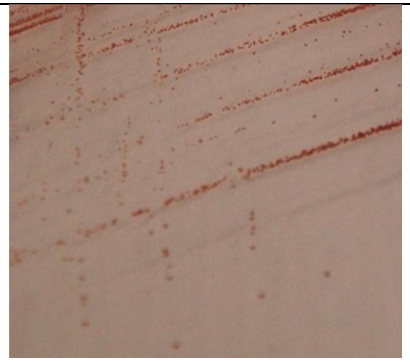
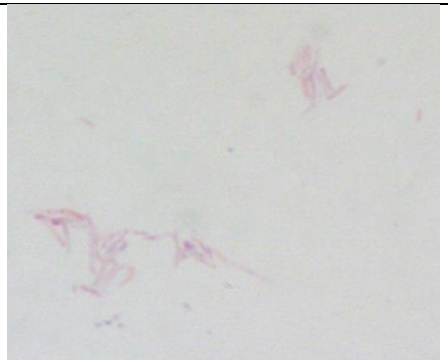
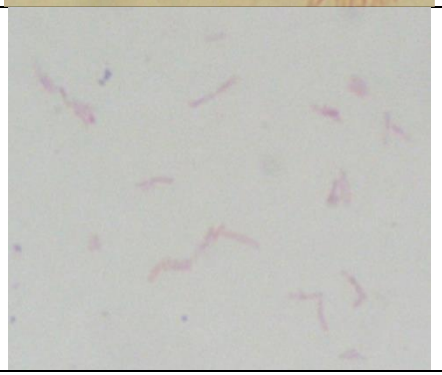
Sp 2/1-3				
vp 1/1			-	-
vp 1/2				

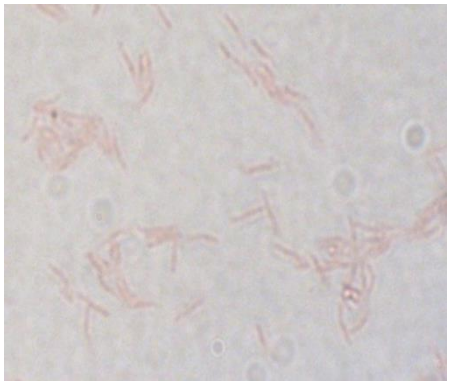
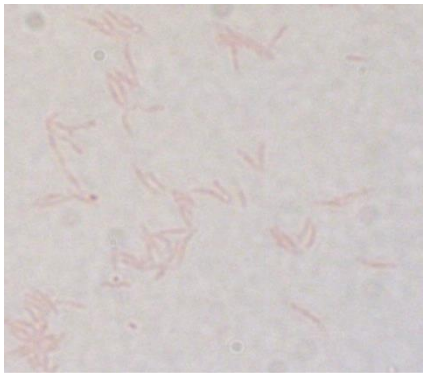
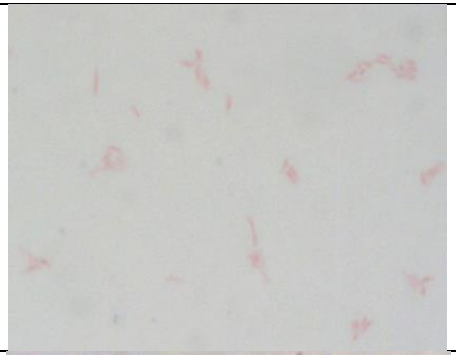
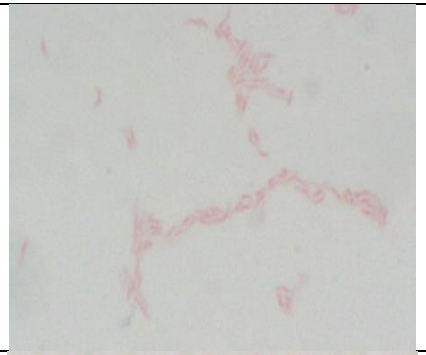
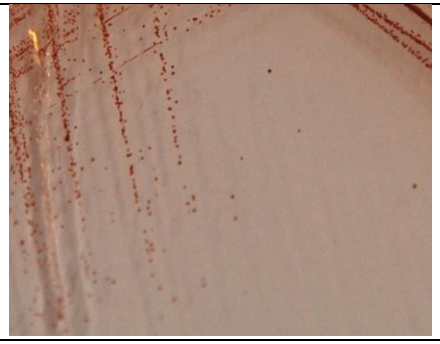
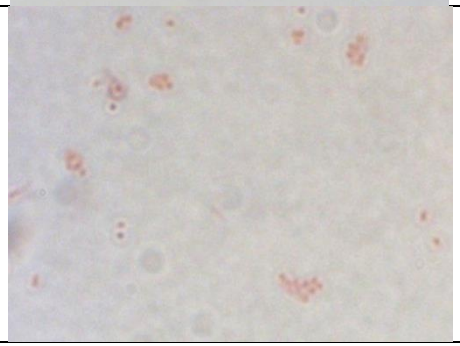
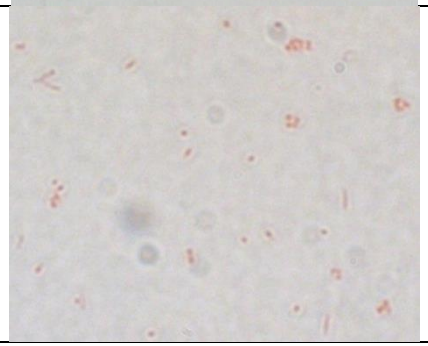
KK(KKU) 2-3				
KK(KKU) 4-2				
KK(KKU) 4-3				

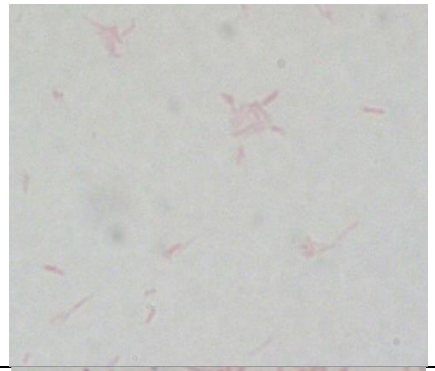
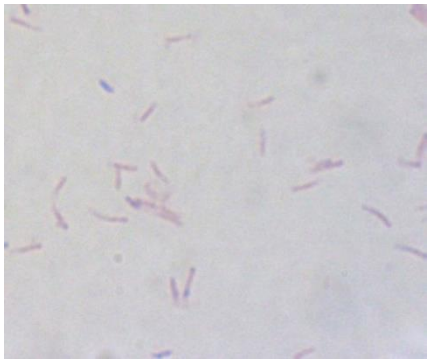
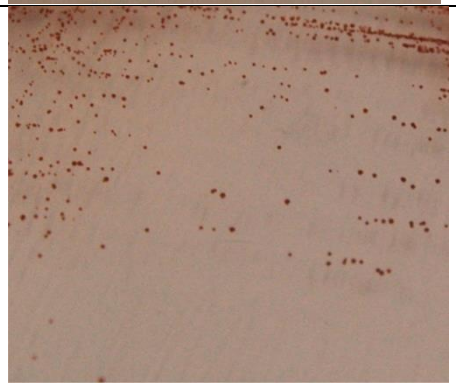
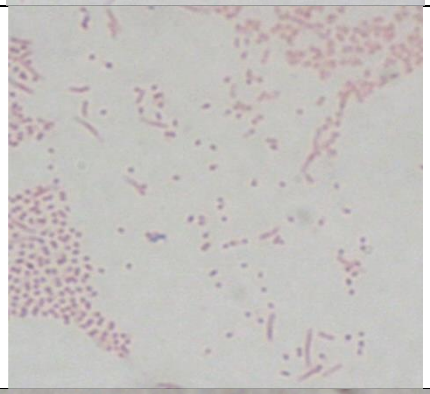
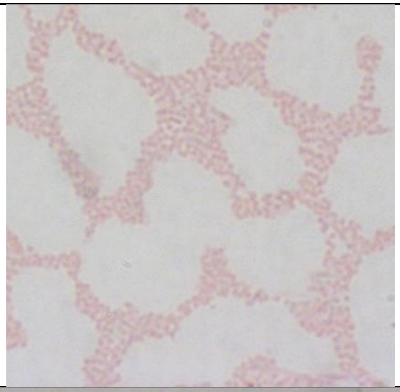
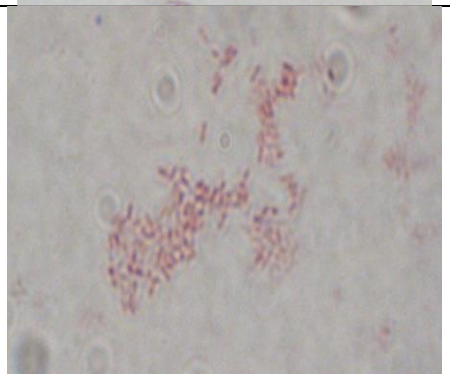
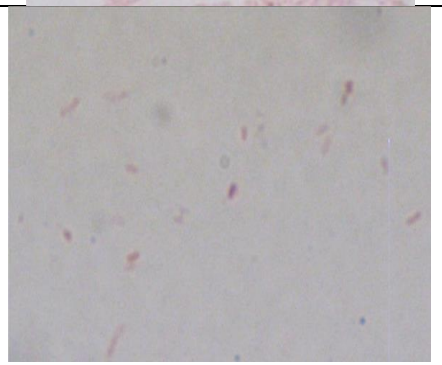
KK(KKU) 4-5.1				
KK(KKU) 4-7				
KK(NM) 3-1				

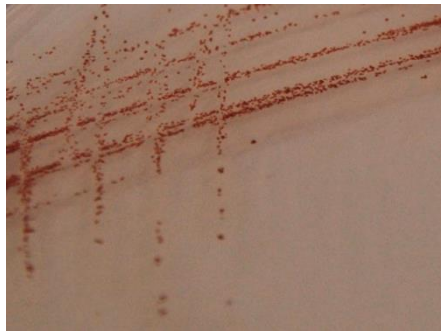
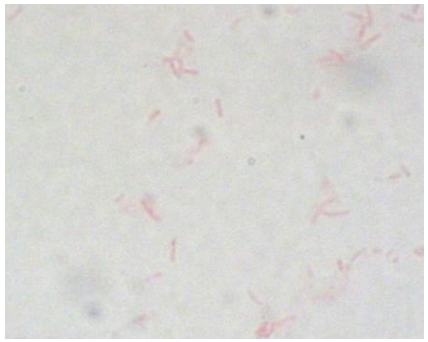
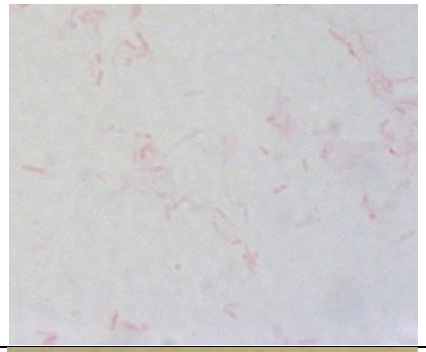
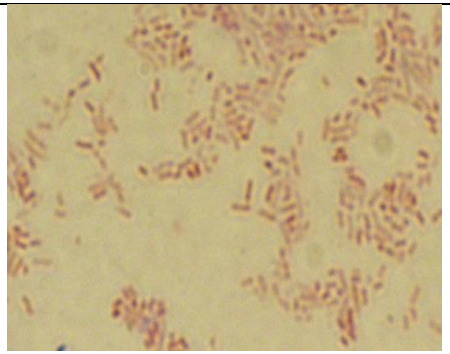
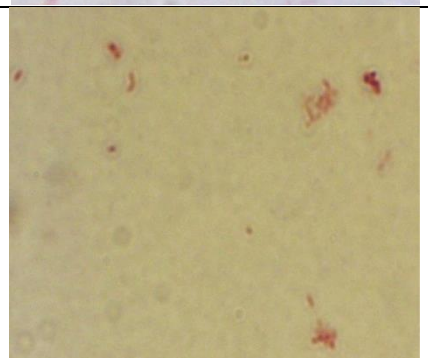
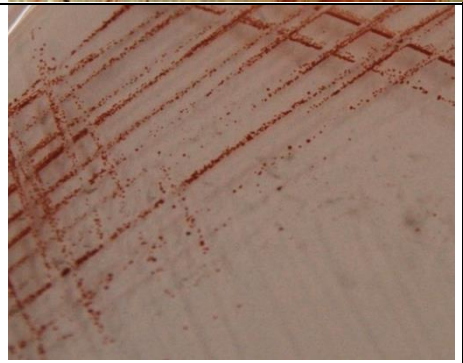
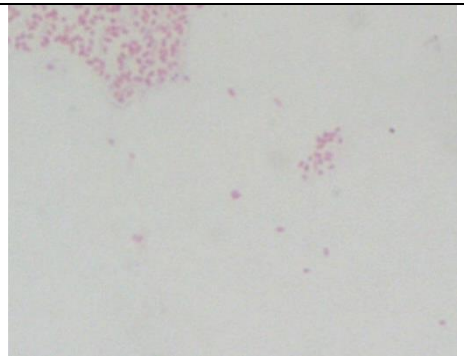
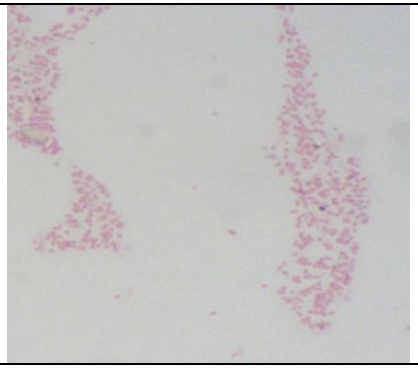
KK(NM) 3-8				
KK(NM) 3-9				
KK(NM) 3-10				

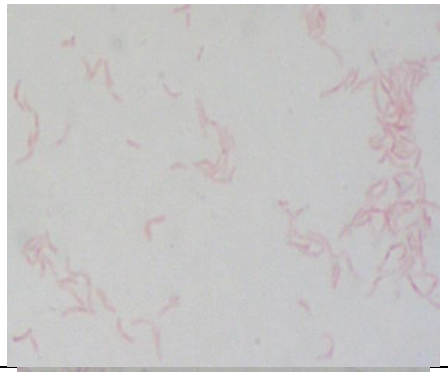
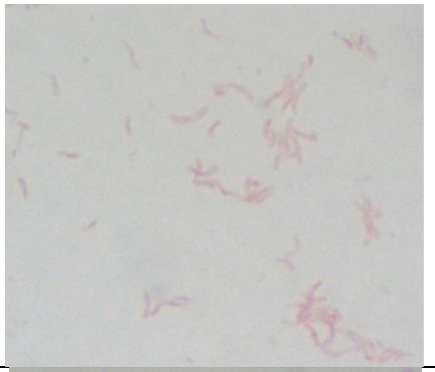
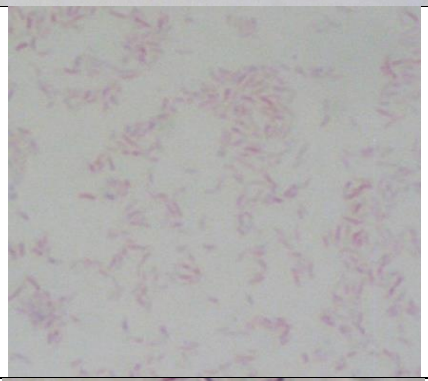
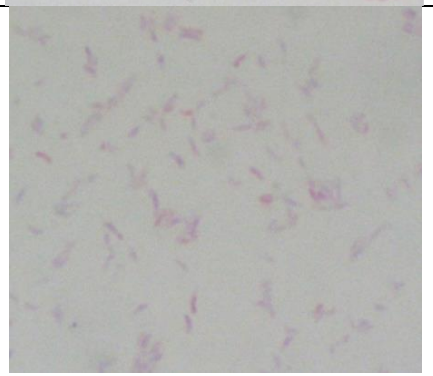
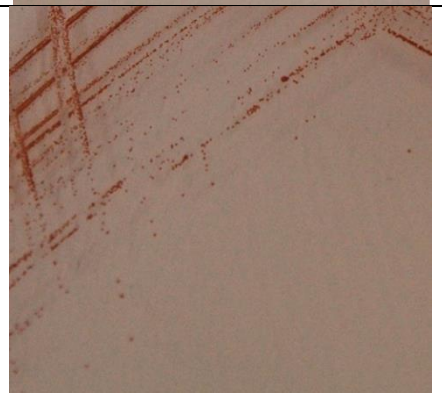
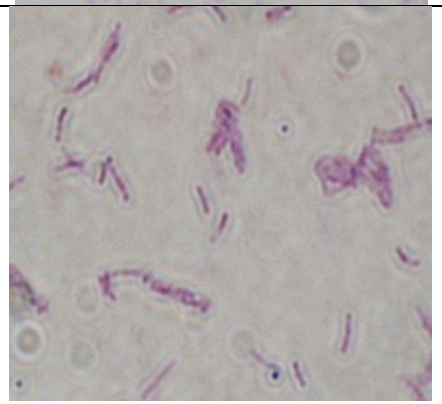
KK(NM) 3-16				
KK(NM) 3-17				
KK(NM) 3-18				

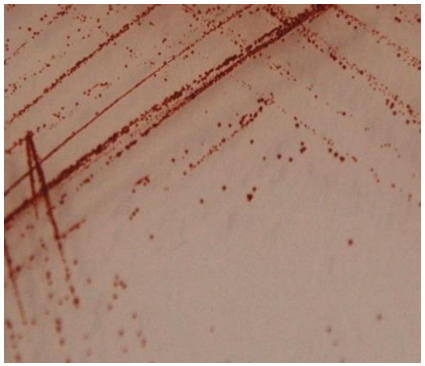
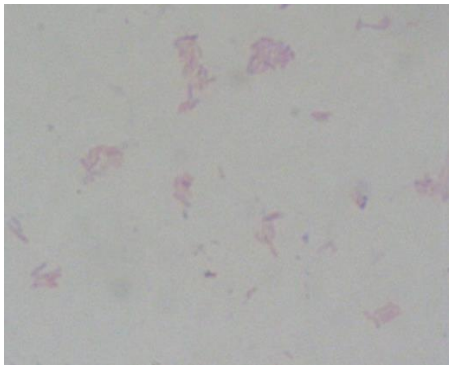
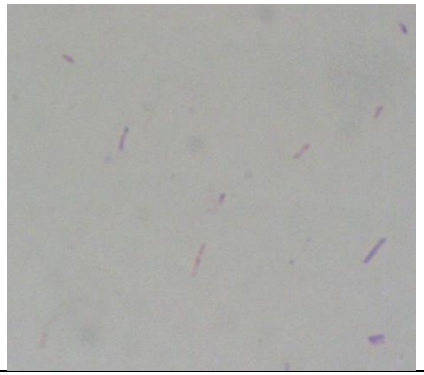
KK(NM) 3-20				
KK(NM) 3-21				
NM 3/7				

NM3/17				
Muk 1-2				
Muk 2-1				

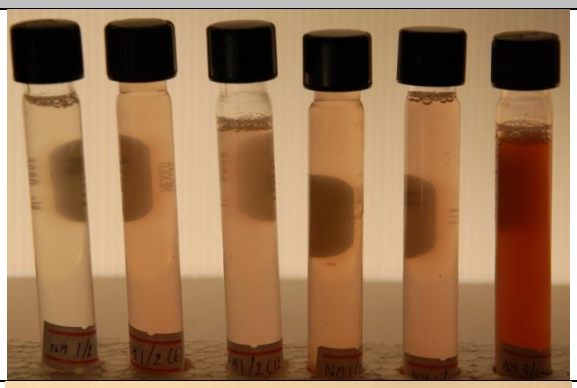
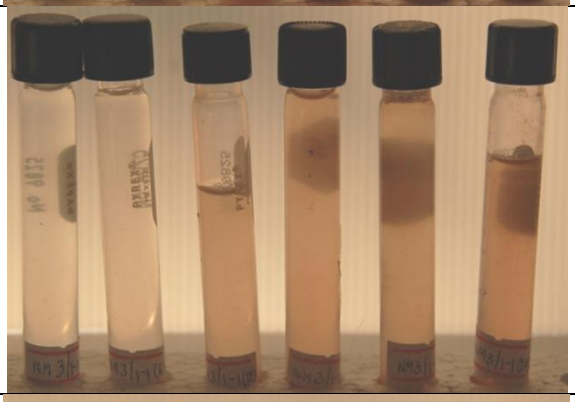
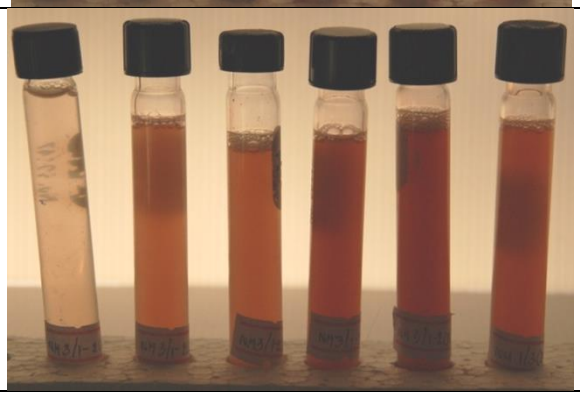
Muk 2-5				
Muk 2-18				
SK 1-1				

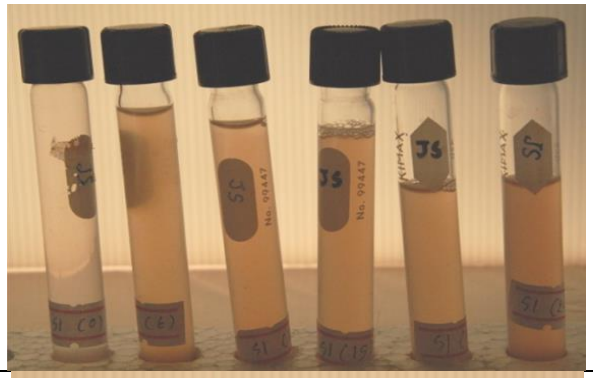
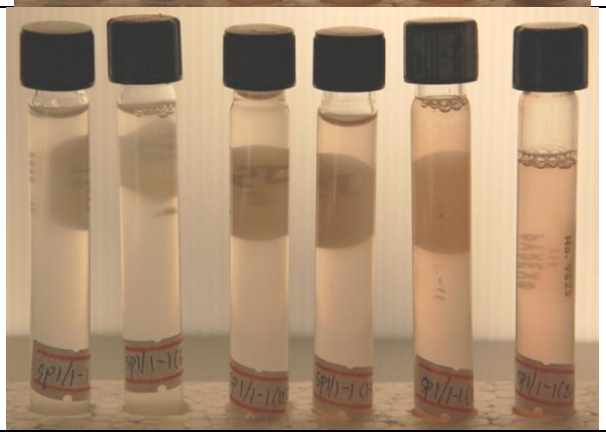
SK 1-4				
SK 1-6				
SK 2-2				

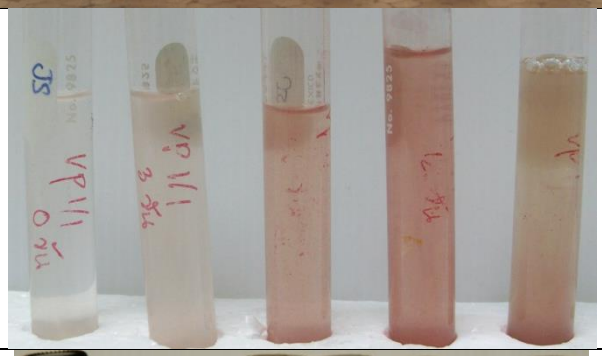
HK 1-1				
HK 2-3				
KR 1-2				

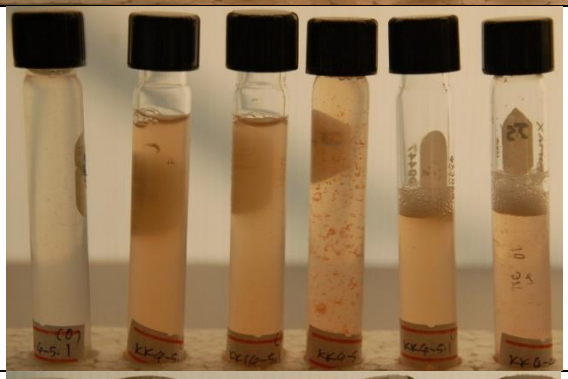
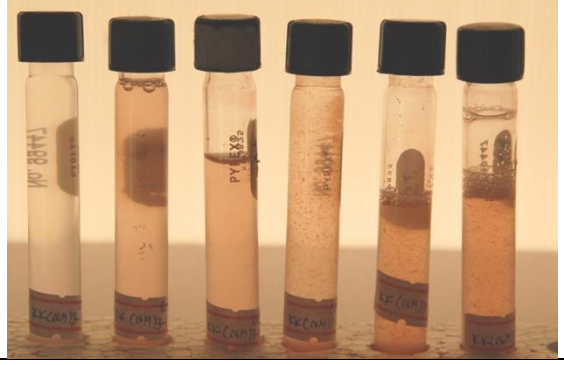
KR 1-3				

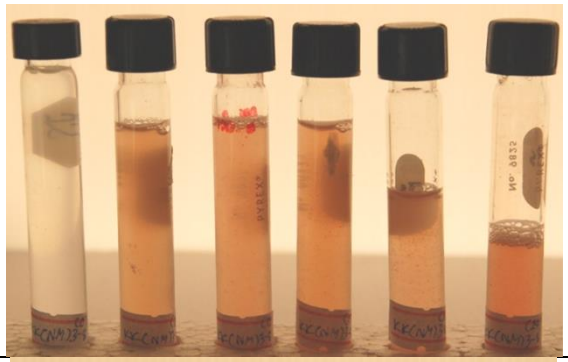
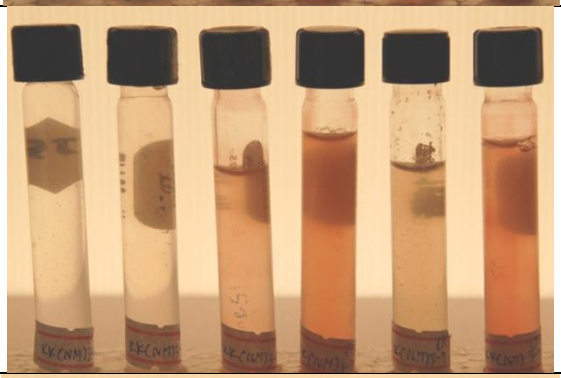
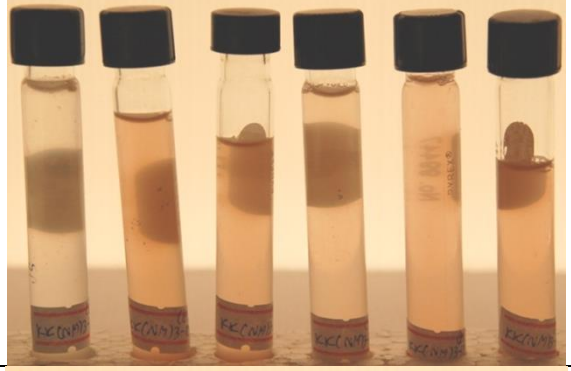
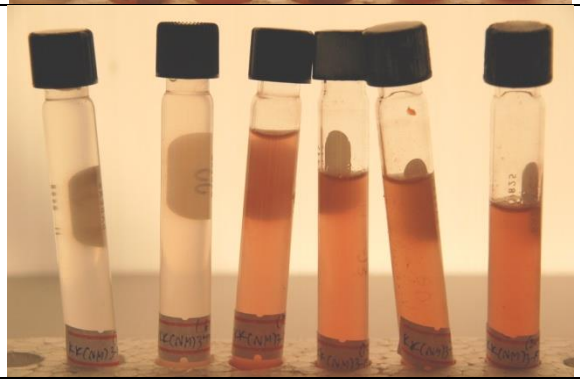
รูปภาพที่ 14 แสดงภาพวัดการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายในระยะเวลา 24 วัน

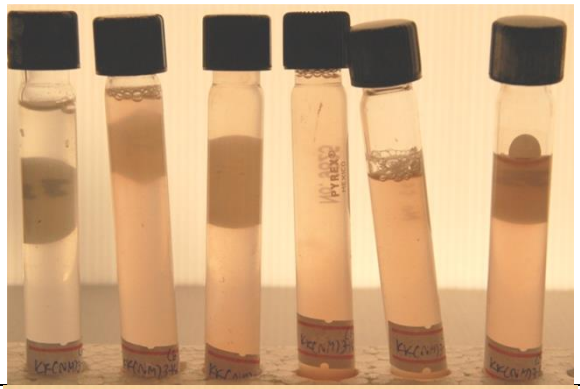
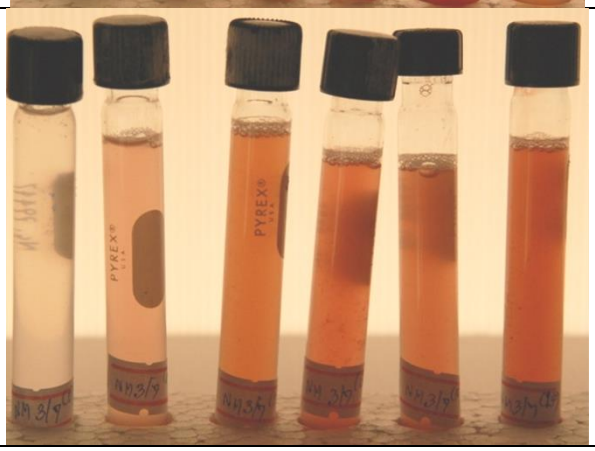
ลำดับ	รายชื่อตัวอย่าง (Isolast)	ภาพวัดการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงภายใน 24
1.	NM 1/2	
2.	NM 1/3	
3.	NM 3/1-1	
4.	NM 3/1-2	

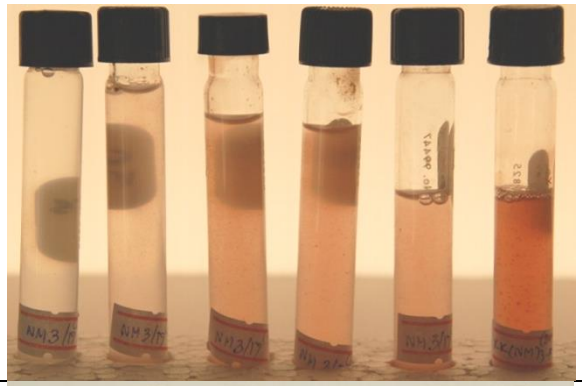
5.	S1		
6.	S1-2		
7.	S3		
8.	Sp 1/1-1		

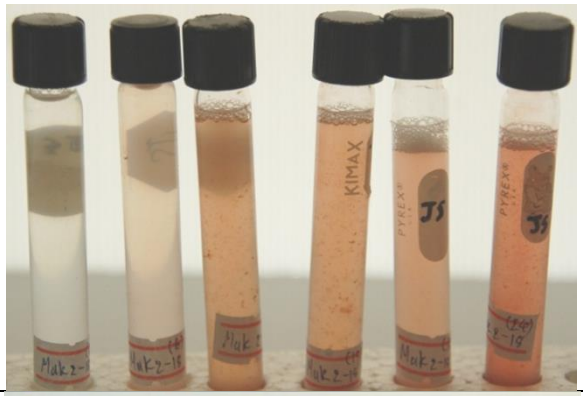
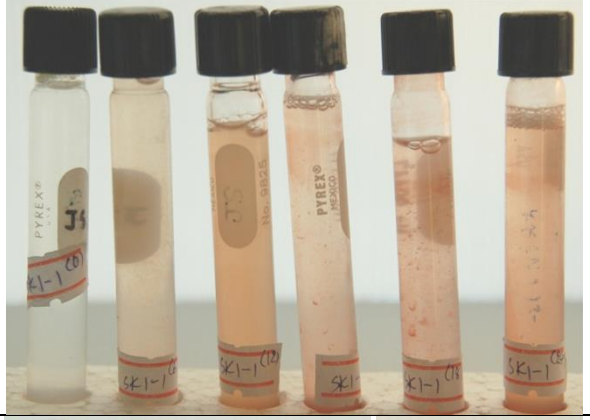
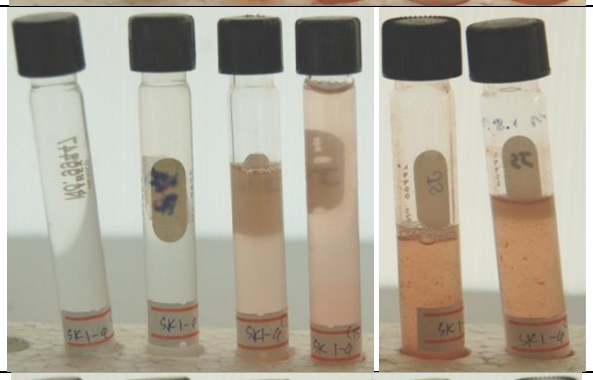
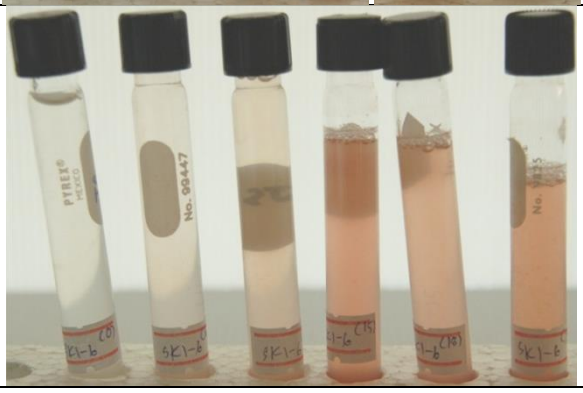
9.	Sp 2/1-3	
10.	vp 1/1	
11.	vp 1/2	
12.	KK(KKU) 2-3	

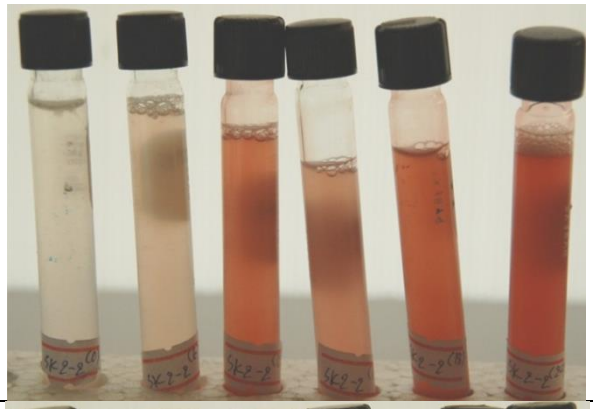
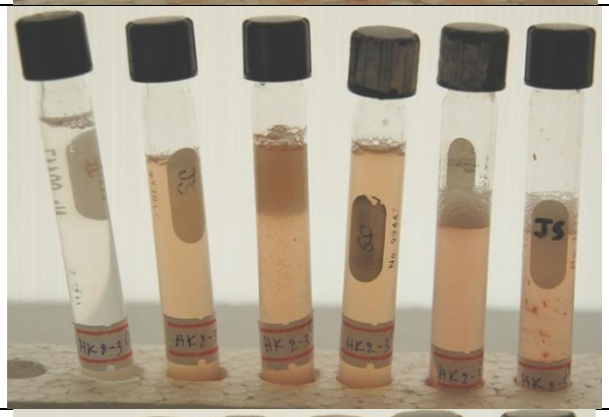
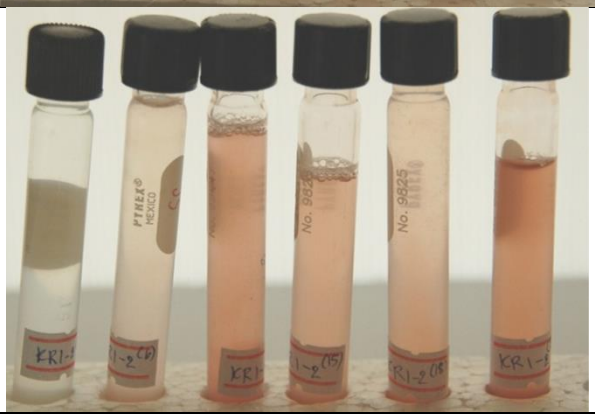
13.	KK(KKU) 4-2	
14.	KK(KKU) 4-3	
15.	KK(KKU) 4-5.1	
16.	KK(KKU) 4-7	
17.	KK(NM) 3-1	

18.	KK(NM) 3-8		
19.	KK(NM) 3-9		
20.	KK(NM) 3-10		
21.	KK(NM) 3-16		
22.	KK(NM) 3-17		

23.	KK(NM) 3-18		
24.	KK(NM) 3-20		
25.	KK(NM) 3-21		
26.	NM 3/7		

27.	NM3/17		
28.	Muk 1-2		
29.	Muk 2-1		
30.	Muk 2-5		

31.	Muk 2-18		
32.	SK 1-1		
33.	SK 1-4		
34.	SK 1-6		

35.	SK 2-2		
36.	HK 1-1		
37.	HK 2-3		
38.	KR 1-2		

39.	KR 1-3