

Research Article

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนจาก คลองแสนแสบ

Isolation and cultivation of H₂-producing cyanobacteria from Sansab canal

วิชญบุญ พนิจกิจจาพร^{1*}, ภัคพงศ์ พจนารณ¹ และสัญญา กุดัน²

Wichayaboon Phinitkitjaporn^{1*}, Pakpong Pochanart¹ and Sanya Kudan²

¹ คณะบริหารการพัฒนาสิ่งแวดล้อม สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์ เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร 10240

¹ Graduate School of Environmental Development Administration, National Institute of Development Administration, Bangkok District, Bangkok 10240, Thailand

² ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร 10240

² Department of Biotechnology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok District, Bangkok 10240, Thailand

*E-mail: Wichayaboon.kmitl@gmail.com

Received: 04/01/2019; Revised: 22/08/2019; Accepted: 10/09/2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง *Arthronema africanum* strain BKP-Sansab ซึ่งคัดเลือจาก
คลองแสนแสบ กรุงเทพมหานคร ฯ เพื่อศึกษาการผลิตไฮโดรเจน ผลการทดลองพบว่า *A. africanum* strain BKP-
Sansab มีความต้องการปัจจัยในการผลิตไฮโดรเจนที่หลากหลาย โดยเซลล์สามารถปรับตัวได้ในอาหาร BG-11₀₁
(Blue - Green Medium สูตรดัดแปลง) ประกอบด้วยเหล็ก 46 ไมโครโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต 0.8 กรัม และค่า pH
7.5 ภายใต้สภาวะที่มีแสงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์แล้วนำไปแยกที่ความเร็ว
รอบ 160 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง และความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าระดับการผลิต
ไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้นถึง 55.42 $\mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$ เมื่อปรับเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหาร
BG-11₀₁ เทียบกับอาหาร BG-11₀ (Blue - Green Medium สูตรปราศจากไนโตรเจน) ที่มีระดับการผลิตไฮโดรเจน
สะสมอยู่ที่ 42.09 $\mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$ นอกจากนี้ เซลล์ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอาหารสูตร BG-11 (Blue -
Green Medium สูตรปกติ)

คำสำคัญ: *Arthronema africanum*, การผลิตไฮโดรเจน, ไชยาโนแบคทีเรีย, คลองแสนแสบ

Abstract

This research focused on the isolation of *Arthronema africanum* strain BKP-Sansab. Samples were collected from the Sansab canal in Bangkok, Thailand to study the hydrogen production. Results showed that *A. africanum* strain BKP-Sansab required various enhancing factors for hydrogen production. The cells were able to adapt in BG-11₀₁ (modified Blue - Green Medium) containing 46 μM iron, 0.8 gram sodium carbonate and pH 7.5 under continuous light for one week. After that, cells were harvested and cultivated by agitating at 160 rpm at room temperature under a light condition of 2,500 Lux for 24 hours. It was found that the accumulation level of hydrogen production increased to 55.42 $\mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$ after 24 hours incubation under light condition in BG-11₀₁ comparing to BG-11₀ (Blue - Green Medium without nitrogen source) which the accumulation level of hydrogen production was 42.09 $\mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$. Besides, cells were incapable of producing hydrogen in BG-11 (normal Blue - Green Medium).

Keywords: *Arthronema africanum*, hydrogen production, cyanobacteria, Sansab canal

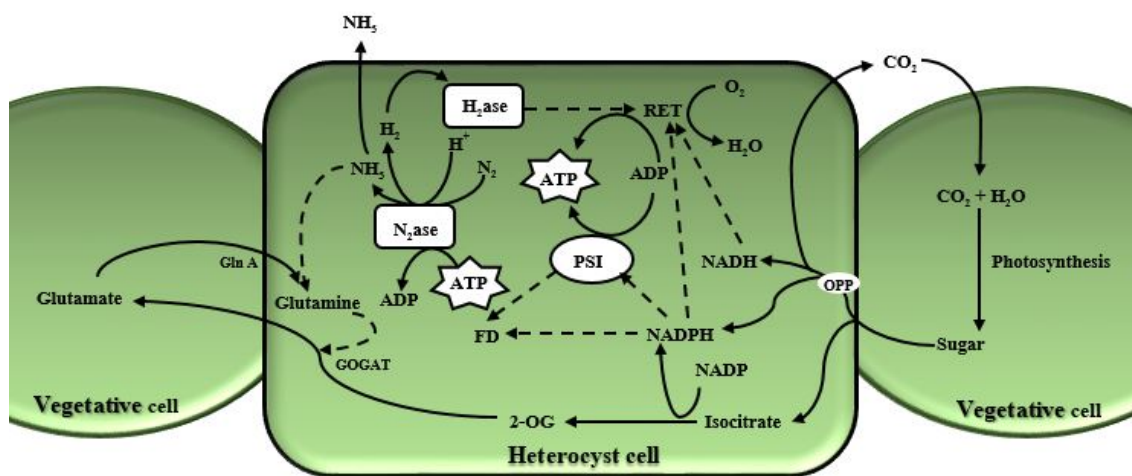
บทนำ

แก๊สไฮโดรเจนเป็นหนึ่งในแหล่งพลังงานทางเลือกที่มีศักยภาพและคุณภาพที่สามารถใช้ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลได้ดี ถือได้ว่าเป็นเชื้อเพลิงอนาคต (Elam et al., 2003) ซึ่งสามารถผลิตได้จากน้ำหรือการย่อยสลายชีวมวล เมื่อเกิดการเผาไหม้กับแก๊สออกซิเจน จะมีเพียงไอน้ำเป็นผลพลอยได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเพลิงชนิดอื่นที่ก่อให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์หลังจากการเผาไหม้ในปริมาณมาก เมื่อสะสมอยู่ในชั้นบรรยากาศเป็นระยะเวลานานจะเป็นต้นเหตุที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจก ส่งผลกระทบโดยตรงและก่อให้เกิดปัญหาโลกร้อนตามมา

ในปัจจุบันงานวิจัยหลายแขนงพบว่าจุลสาหร่าย (microalgae) มีความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ อาทิ สาหร่ายสีเขียว ได้แก่ *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ ไชยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ ไชยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว (unicellular cyanobacteria) เช่น *Microcystis* sp., *Gloeocapsa* sp., และ *Synechococcus* sp. ไชยาโนแบคทีเรียเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) เช่น *Tolypothrix* sp., *Spirulina* sp., และ *Oscillatoria* sp. (Kamglomjai, 2009) นอกจากนี้ ไชยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนในอากาศได้ (nitrogen-fixing cyanobacteria) เช่น *Nostoc* sp., และ *Anabaena* sp. (Nakthong, 2013) สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีเอนไซม์ที่สำคัญในการเร่งกระบวนการผลิต

แก๊สไฮโดรเจนคือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (N_2ase) และเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการผลิตหรือการนำไฮโดรเจนกลับไปใช้ในเซลล์คือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (H_2ase)

เอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในโครงสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ของไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายซึ่งเจริญในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน (nitrogen deficiency) ภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์นี้ ไซยาโนแบคทีเรียจะตรึงไนโตรเจนจากอากาศแล้วเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียกับไฮโดรเจนโดยใช้พลังงานจาก ATP (Lindberg, 2003) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานในสภาวะที่มีออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงทำงานเฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งส่งผลให้กระบวนการตรึงไนโตรเจนจะทำงานในขณะที่ไม่มีแสงเท่านั้น ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดจึงได้พัฒนากลไกที่ป้องกันการทำงานของเอนไซม์จากการยับยั้งของออกซิเจน โดยการสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ขึ้นมาแยกจากเซลล์ปกติ ภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์นี้จะไม่มีระบบแสงสอง (PSII) มีแต่ระบบแสงหนึ่ง (PSI) และมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ แล้วส่งสารประกอบไนโตรเจนไปสู่เซลล์ข้างเคียง (รูปที่ 1) ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะอยู่ภายในเซลล์ร่างกาย (vegetative cell) (Lindberg, 2003; Hallenbeck, 2012)



รูปที่ 1. กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย (ดัดแปลงจาก Lindberg, 2003)

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่อาศัยได้ดีและที่สำคัญสามารถนำพลังงานแสงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้โดยตรงผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งเป็นการช่วยลดปริมาณแก๊สเรือนกระจกและเพิ่มออกซิเจนได้ (Kamglomjai, 2009) นอกจากนี้

ไซยาโนแบคทีเรียยังถูกจัดเป็นผู้ผลิตปฐมภูมิ (primary producer) อีกด้วย (Hamilton et al., 2016) ซึ่งคุณสมบัติเชิงบวกหลายด้านของไซยาโนแบคทีเรียนี้ จึงนิยมนำมาใช้เป็นต้นแบบในงานวิจัยทางชีวเคมี พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพ (Al-Haj et al., 2016)

อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (ตารางที่ 1) และภาวะสิ่งแวดล้อม (environmental condition) ได้แก่ แสง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส (pH) ภาวะเค็ม (salinity) การมีสารอาหาร (nutrient availability) และแก๊สในบรรยากาศ (gaseous atmosphere) (Dutta et al., 2005) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในกรุงเทพมหานคร ๑ เขต ตะวันออก เพื่อศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ตารางที่ 1. อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดและสายพันธุ์ต่าง ๆ

ไซยาโนแบคทีเรีย	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด
<i>Anabaena cylindrica</i> B-629	0.103 $\mu\text{mol/mg dry wt/h}$
<i>Anabaena cylindrica</i> IAMM-1	2.1 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX LB 2558	3.2 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	2.6 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Anabaena variabilis</i> AVM13	68 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Anabaena variabilis</i> IAMM-58	4.2 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	167.6 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Calothrix scopulorum</i> 1410/5	0.128 $\mu\text{mol/mg dry wt/h}$
<i>Calothrix membranacea</i> B-379	0.108 $\mu\text{mol/mg dry wt/h}$
<i>Cyanothece</i> 7822	0.92 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	1.38 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Nostoc muscorum</i> IAMM-14	0.60 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Oscillatoria brevis</i> B-1567	0.168 $\mu\text{mol/mg dry wt/h}$
<i>Oscillatoria</i> sp. Miami BG7	0.250 $\mu\text{mol/mg dry wt/h}$
<i>Oscillatoria limosa</i>	0.83 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$
<i>Synechocystis</i> PCC 6308	0.13 $\mu\text{mol/mg chl a/h}$

ที่มา: คัดแปลงจาก Dutta et al. (2005)

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อ

การคัดแยกเชื้อจะเริ่มจากการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากแหล่งดินและแหล่งน้ำธรรมชาติ ในกรุงเทพมหานคร ตะวันออก ได้แก่ เขตบางกะปิ สะพานสูง บึงกุ่ม คันนาขาว ลาดกระบัง มีนบุรี หนองจอก คลองสามวา และประเวศ นำตัวอย่างน้ำและดินมาใส่ในอาหารเหลว BG-11 (Blue - Green Medium สูตรปกติ) ที่ประกอบด้วย NaNO_3 10.0 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11.0 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg/L, citric acid 1.0 mg/L, Na_2EDTA 1.0 mg/L, K_2HPO_4 1.0 mg/L, Na_2CO_3 1.0 mg/L, trace metal mix 1.0 mg/L และแอมพิซิลลิน (ampicillin) 0.2 g/L แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ในที่มีแสง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางและ spread ลงบนอาหารเพาะเชื้อ BG-11 บ่มในที่ที่มีแสงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ เมื่อเชื้อขึ้นเป็นโคโลนีให้ใช้ลูปเขี่ยเชื้อลงบนอาหาร BG-11 ใหม่ ทำซ้ำจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ สำหรับเชื้อที่มีขนาดเล็กยากต่อการแยกให้บริสุทธิ์ ให้ใช้วิธี unicellular ด้วยปิเปตต์รูเล็ก (capillary pipette) ดูดเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ไปใส่ในอาหารเหลว BG-11 บ่มเป็นเวลา 1 เดือน ขั้นตอนนี้ใช้แอมพิซิลลิน 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิตร เพื่อกำจัดแบคทีเรียแกรมบวก และใช้ไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) 100 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิตร เพื่อกำจัดเชื้อรา ยีสต์ และโพรโตซัวที่ไม่ต้องการ (Hossain et al., 2016)

2. วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (starter)

หลังจากได้เชื้อบริสุทธิ์ การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ เริ่มจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียบนจานอาหารแข็ง BG-11 เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จากนั้น จึงนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงต่อในฟลasks ขนาด 250 มิลลิตรที่มีอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิตร นำเซลล์ไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และให้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3. วิธีการวัดการเติบโต

เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์หัวเชื้อมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Hettich Universall 320R, ประเทศเยอรมนี) ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้อุณหภูมิห้อง ภายใต้อุณหภูมิห้อง 2,500 ลักซ์ ศึกษาการเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของไซยาโนแบคทีเรียด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu UV-1601, ประเทศญี่ปุ่น) ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์หัวเชื้อ มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิตร โดยให้

ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เก็บสารละลายเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิมเมทานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร และ 665 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล 95% เป็นสารละลายเปรียบเทียบ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Mackinney (1941) (อ้างอิงตาม Mokashi et al., 2016) ดังสมการที่ (1) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = [(2.55 \times 10^{-3})(E_{650}) + (0.4 \times 10^{-3})(E_{665})] \text{ mg/ml} \quad (1)$$

โดย E650 และ E665 คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 และ 665 นาโนเมตร ตามลำดับ

5. วิธีการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์หัวเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรสำหรับไซยาโนแบคทีเรีย ประมาณ 0.1 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำไซยาโนแบคทีเรียมาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งในอาหารเพาะเลี้ยงและกระจายเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 และ BG-11₀ (Blue - Green Medium สูตรปราศจากไนโตรเจน) จากนั้นนำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำเซลล์ใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์ตัวอย่าง (GC-vials) ขนาด 10 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดจุกยางและฟลอปูนิเนียม นำไปใส่อากาศโดยการฟองอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืดและสว่าง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบกัน นำแก๊สบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (head space) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatograph) (Shimadzu GC-15A, ประเทศญี่ปุ่น) เทียบกับแก๊สไฮโดรเจนมาตรฐาน 4% ในแก๊สอาร์กอนเป็นแก๊สมาตรฐาน ซึ่งมีสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แก๊สแสดงไว้ในตารางที่ 2 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีมาคำนวณปริมาณไฮโดรเจนเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสมการที่ 2

$$n = (PV/RT) \times 1,000,000 \quad (2)$$

โดยที่ n คือ จำนวนโมลของไฮโดรเจน, P คือ ความดันบรรยากาศ 1 atm, V คือ ปริมาตรแก๊สไฮโดรเจน (L), R คือ ค่าคงที่ 0.082 atm L/mol K, T คือ อุณหภูมิในหน่วยเคลวิน และ 1,000,000 คือ ค่าที่ใช้เปลี่ยนหน่วย mol ให้เป็น μmol

ตารางที่ 2. สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊สด้วยเครื่อง GC-TCD

พารามิเตอร์	สภาพที่ใช้ในการเดินระบบ
Carrier Gas	- Argon flow rate 30 ml/ min (99.999% purify)
Column	- Pack column 1.5 m x 1.0 mm - Molecular sieve 5A mesh 80/ 100
Selector	- Thermal conductivity detector (TCD)
Temperature Program	- Injection temperature: 100°C - Oven temperature: 40°C - Detector temperature: 200°C

6. วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจัดจำแนกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย

ส่งตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์และจัดจำแนกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายด้วยเทคนิค molecular genetic และ polyphasic approach ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในอาหารที่ทำการทดสอบ กระจายตะกอนเซลล์ลงในอาหาร BG-11 ที่มีสภาวะแตกต่างกัน เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ดังนี้ แปรผันระยะเวลาเพาะเลี้ยง (3, 5, 7 และ 14 วัน) แปรผันผลของเหล็กไอออน (Fe^{3+}) (ความเข้มข้น 0, 23, 46, 92 และ 184 ไมโครโมลาร์) แปรผันผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยให้มีความเข้มข้นโซเดียมคาร์บอเนตเท่ากับ 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.60 และ 3.20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตเท่ากับ 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.60 และ 3.20 กรัมต่อลิตร และแปรผันค่า pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว เก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์ตัวอย่างขนาด

10 มิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกยางและฟาลูมิเนียม นำไปใส่อากาศโดยการพ่นอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มทั้งในที่มืดและที่สว่างเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบกัน นำแก๊สบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทียบกับแก๊สไฮโดรเจนมาตรฐาน 4% ในแก๊สอาร์กอน เป็นแก๊สมาตรฐาน นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ มาคำนวณปริมาณไฮโดรเจนเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์

8. ศึกษาระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

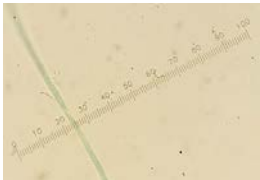
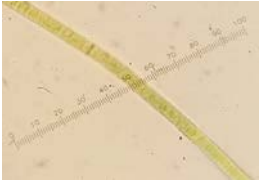
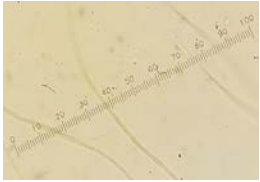
เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในฟลาสกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในอาหารที่ทำการทดสอบ กระจายตะกอนเซลล์ลงในอาหาร BG-11₀₁ (Blue - Green Medium สูตรดัดแปลงจากอาหาร BG-11₀) ที่มีค่า pH 7.5 ความเข้มข้นของเหล็กไอออน (Fe^{3+}) 46.0 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนต 0.8 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว เก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์ตัวอย่างขนาด 10 มิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกยางและฟาลูมิเนียม นำไปใส่อากาศโดยการพ่นอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มทั้งในที่มืดและที่สว่างเป็นเวลา 2, 4, 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบกัน นำแก๊สบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทียบกับแก๊สไฮโดรเจนมาตรฐาน 4% ในแก๊สอาร์กอนเป็นแก๊สมาตรฐาน นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ มาคำนวณปริมาณไฮโดรเจนเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

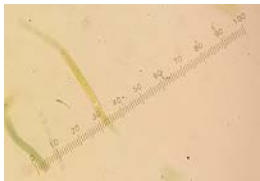
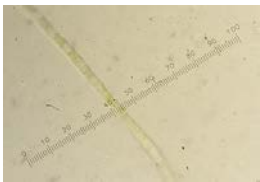
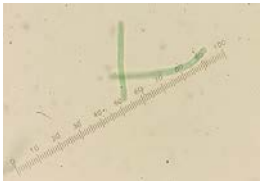
จากการเก็บตัวอย่างน้ำและส้อมจากแหล่งดินและแหล่งน้ำธรรมชาติจากกรุงเทพมหานคร เขตตะวันออกทั้ง 9 เขต ได้แก่ เขตบางกะปิ สะพานสูง บึงกุ่ม คันนายาว ลาดกระบัง มีนบุรี หนองจอก คลองสามวาและประเวศ พบว่าสามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 48 ไอโซเลท

เมื่อนำจุลสาหร่ายที่แยกได้ มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท และได้นำไปจัดจำแนกชนิดของจุลสาหร่ายเบื้องต้นโดยใช้ไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) ปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ในการจำแนก เนื่องจากไซโคลเฮกซิมิดจะส่งผลในการยับยั้งเซลล์ยูคาริโอตทุกชนิด (Nagle et al., 2010) ดังนั้นเมื่อใส่ไซโคลเฮกซิมิดลงไปจะสามารถกำจัดสาหร่ายสีเขียวออกไปได้ จึงพบว่ามีไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์เพียง 9 ไอโซเลท ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ จำนวน 9 ไอโซเลท
ภาพถ่ายกำลังขยาย 1,000 เท่า

ชื่อ	รูปถ่าย	ลักษณะ	สถานที่	ละติจูด-ลองจิจูด
KAN-02		เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 2 μm	คันนายาว (น้ำ)	13°49'57" N 100°40'39" E
NHJ-02		เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 2 μm	หนองจอก (น้ำ)	13°50'04" N 100°50'14" E
KSW-02		เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 8 μm	คลองสามวา (น้ำ)	13°51'35" N 100°42'02" E
PRW-01		เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 2 μm	ประเวศ (น้ำ)	13°41'14" N 100°39'35" E
MBR-02	-	เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 5 μm	มีนบุรี (น้ำ)	13°48'47" N 100°45'54" E
LKB-KMITL		เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 6 μm	ลาดกระบัง (น้ำ)	13°43'51" N 100°47'04" E

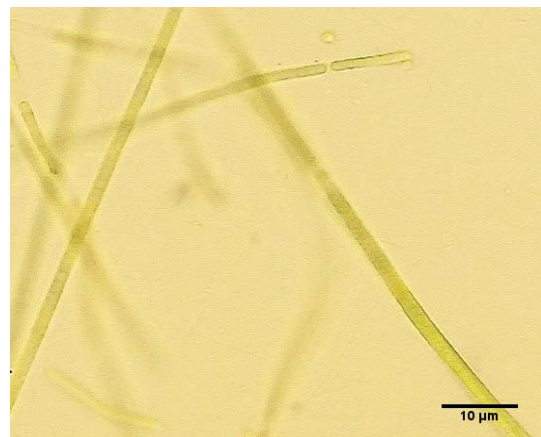
ตารางที่ 3. แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ จำนวน 9 ไอโซเลท
ภาพถ่ายกำลังขยาย 1000x (ต่อ)

ชื่อ	รูปถ่าย	ลักษณะ	สถานที่	ละติจูด-ลองจิจูด
LKB-02		เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 4 μm	ลาดกระบัง (น้ำ)	13°43'39" N 100°46'44" E
LKB-03		เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 5 μm	ลาดกระบัง (ดิน)	13°43'49" N 100°46'34" E
BKP-Sansap		เซลล์เป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 5 μm	บางกะปิ (น้ำ)	13°45'35" N 100°36'49" E

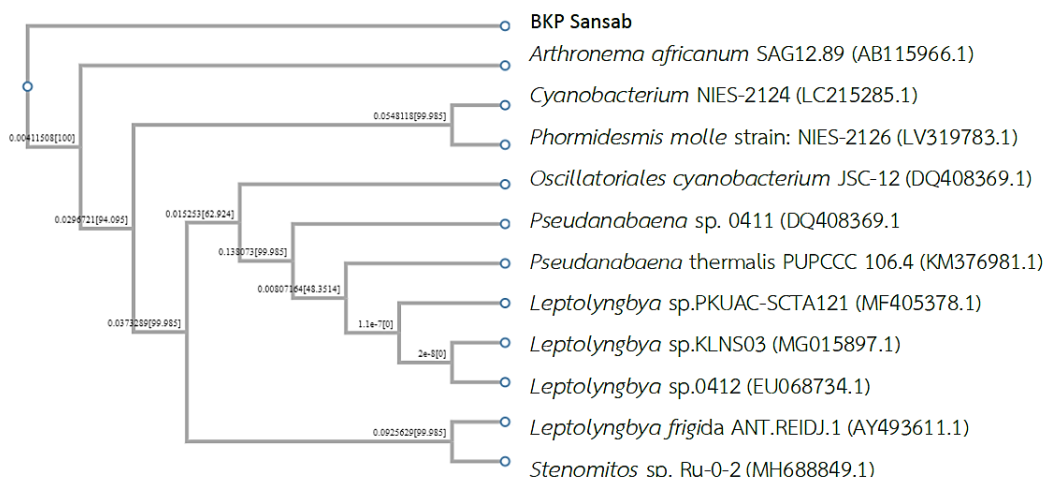
เมื่อนำไซยาโนแบคทีเรียมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนพบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนจะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจิเนส และไฮโดรจิเนส จึงส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน และในสภาวะที่เซลล์ขาดไนโตรเจน จะมีการสะสมไกลโคเจนเพิ่มขึ้น โดยสายพันธุ์ BKP-Sansab เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด คือ $33.99 \pm 0.93 \mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$ ดังตารางที่ 4 ภายหลังจากนำมาศึกษาวิเคราะห์ลักษณะทางชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค molecular genetic และ polyphasic approach แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการจำแนกและการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ด้วยโปรแกรม MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, Pennsylvania State University) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ-method) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 500 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ BKP-Sansab มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Arthronema africanum* accession number AB115966.1 อยู่ 94% (รูปที่ 2 และ 3) ดังนั้นจึงถูกคัดเลือกมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

ตารางที่ 4. อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต

No	Isolated name	Hydrogen production rate ($\mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$)			
		BG11		BG-11 ₀	
		สว่าง	มืด	สว่าง	มืด
1	KAN-02	-	-	-	0.63±0.09
2	NHJ-02	-	-	-	6.49±1.13
3	KSW-02	-	-	-	2.60±0.41
4	PRW-01	-	1.73±0.03	-	13.97±4.96
5	MBR-02	-	-	-	1.49±0.38
6	LKB-KMITL	-	-	-	2.14±0.15
7	LKB-02	-	-	-	2.52±0.87
8	LKB-03	-	-	-	0.78±0.03
9	BKP-Sansab	-	-	33.99±0.93	-



รูปที่ 2. *Arthronema africanum* strain BKP-Sansab ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่กำลังขยาย 100x (ซ้าย) และ 1000x (ขวา)

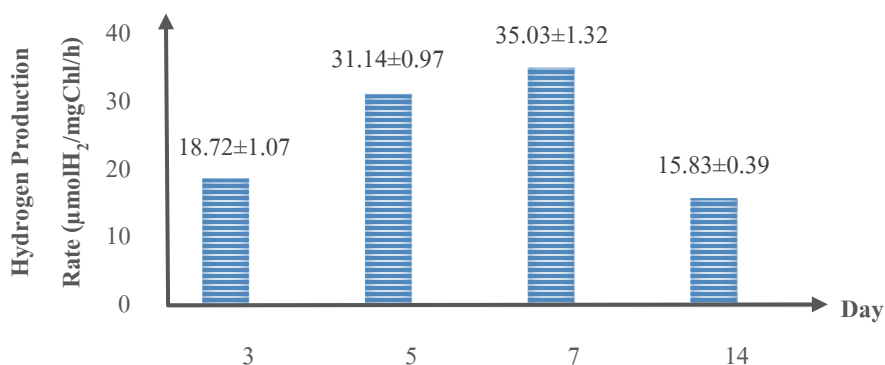


รูปที่ 3. แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA6

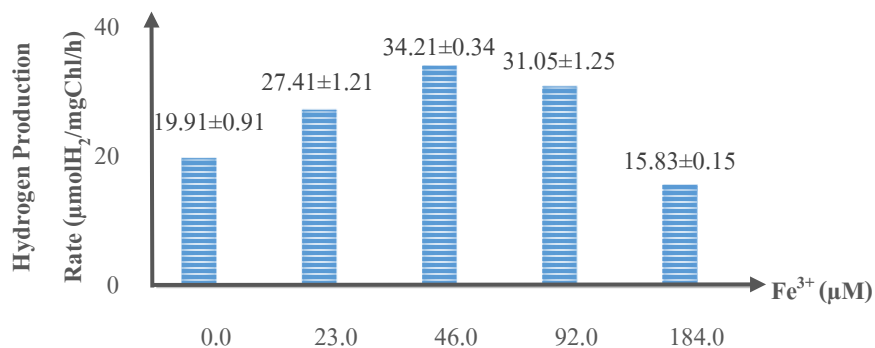
ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน พบว่า *Arthronema africanum* strain BKP-Sansab สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อบ่มในที่มืดและเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนเท่านั้น ซึ่งโดยทั่วไปไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์จะผลิตไฮโดรเจนผ่านการตรึงไนโตรเจนในอากาศด้วยเอนไซม์ไนโตรจิเนส และจะทำงานในขณะที่ไม่มีแสงเท่านั้น (Hallenbeck, 2012) แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีการพบการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจิเนสในสภาวะที่มีแสงในไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสายชนิดไม่มีเฮเทอโรซิสต์เช่นกัน (Berrendero et al., 2016) สำหรับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนคือ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน สามารถให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ $35.03 \pm 1.32 \mu\text{molH}_2/\text{mgChl}/\text{h}$ (รูปที่ 4) เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีการเติบโตอย่างเต็มที่ ความเข้มข้นของเหล็กที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ 46 ไมโครโมลาร์ สามารถให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ $34.21 \pm 0.34 \mu\text{molH}_2/\text{mgChl}/\text{h}$ (รูปที่ 5) เนื่องจากเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไนโตรจิเนส (Schut & Adams, 2009) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจากโซเดียมคาร์บอเนต 0.8 กรัม ให้ผลผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ $48.76 \pm 0.09 \mu\text{molH}_2/\text{mgChl}/\text{h}$ ซึ่งสูงกว่าการใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ (รูปที่ 6) เนื่องจากมีความเป็นกรดสูงกว่าเมื่อแตกตัวกับน้ำ นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนยังส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจิเนสและเอนไซม์รีเวิร์สซิงเกิลไฮโดรจิเนส จึงทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Khetkorn et al., 2010) อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง ปริมาณไฮโดรเจนจะลดลง เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงขึ้นนี้ส่งผลให้เซลล์จะต้องใช้พลังงานในการขับออกนอกเซลล์ ทำให้ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Baebprasert et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 7.5

(รูปที่ 7) ซึ่งให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ $47.08 \pm 2.82 \mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$ เนื่องจากเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

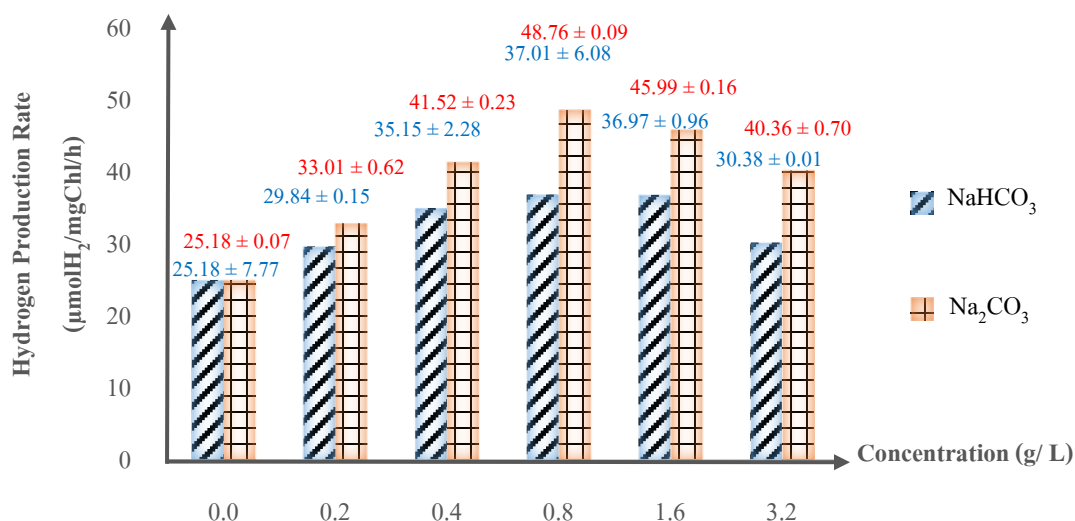
เมื่อนำ *A. africanum* strain BKP-Sansab ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11₀₁ (อาหารสูตรดัดแปลงจากอาหาร BG-11₀ ที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของเหล็ก 46.0 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมคาร์บอเนต 0.8 กรัมต่อลิตร ค่า pH ที่ 7.5 และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน) พบว่าให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเมื่อเทียบกับอาหาร BG-11₀ ในขณะที่อาหารสูตร BG11 ไม่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นเลย โดยอัตราการผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดอยู่ในช่วงระยะเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนอยู่ที่ 55.42 ± 1.17 และ $42.09 \pm 0.76 \mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$ ในอาหารสูตร BG-11₀₁ และสูตร BG-11₀ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นร้อยละ 31.67 ดังนั้นอาหารสูตร BG-11₀₁ จึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. africanum* strain BKP-Sansab ดังรูปที่ 8



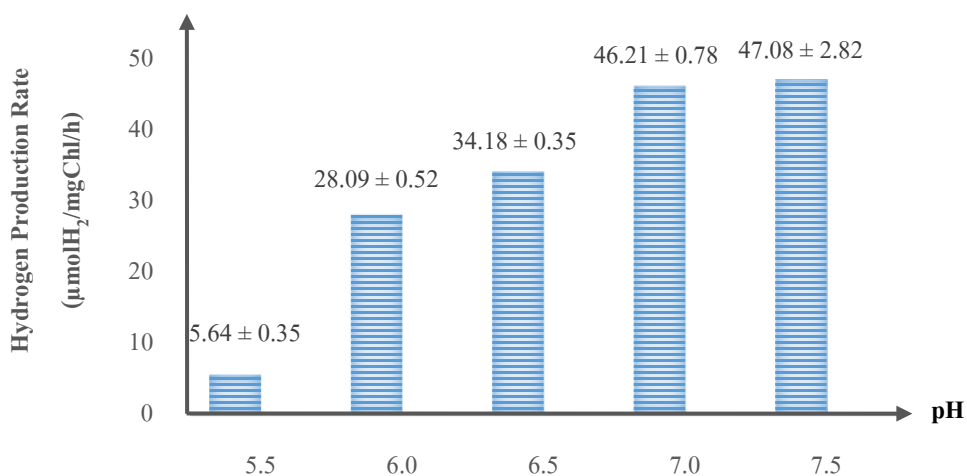
รูปที่ 4. แสดงผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน (วัน)
(ค่าที่อยู่เหนือแท่งกราฟคือค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



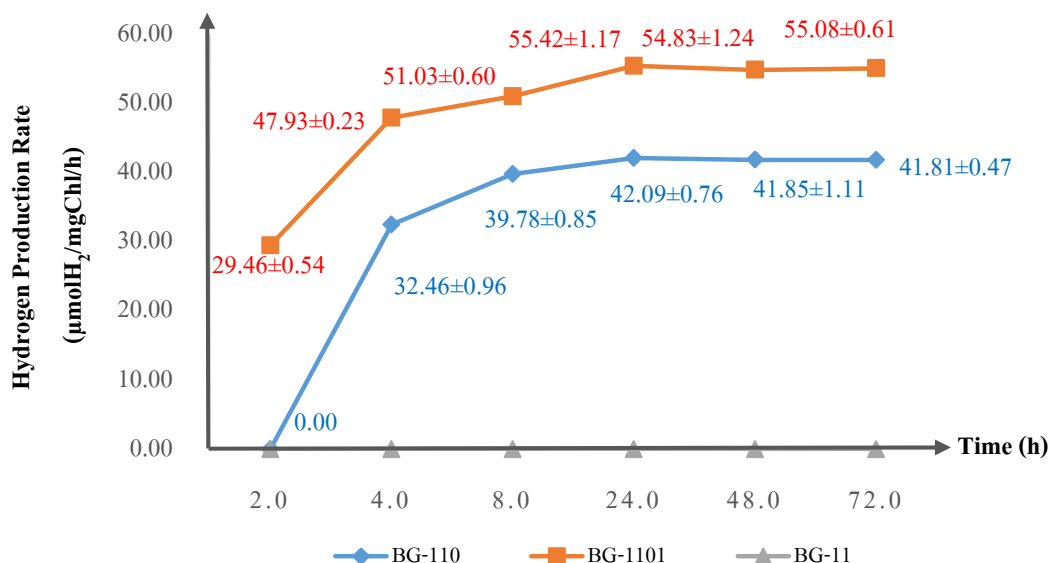
รูปที่ 5. แสดงผลของความเข้มข้นของ Fe^{3+} (ไมโครโมลาร์) ที่เหมาะสำหรับการผลิตไฮโดรเจน
(ค่าที่อยู่เหนือแท่งกราฟคือค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



รูปที่ 6. แสดงผลของความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน (กรัมต่อลิตร)
(ค่าที่อยู่เหนือแท่งกราฟคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



รูปที่ 7. แสดงผลของค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน
(ค่าที่อยู่เหนือแท่งกราฟคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



รูปที่ 8. แสดงผลของช่วงเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน (ชั่วโมง)
(ค่าที่อยู่เหนือแท่งกราฟคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สรุปผลการทดลอง

Arthonema africanum strain BKP-Sansab ซึ่งคัดเลือกจากคลองแสนแสบ กรุงเทพมหานคร ฯ สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่มีแสงสว่างเท่านั้น โดยให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ $55.42 \pm 1.17 \mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11₀₁ (Blue - Green Medium สูตรดัดแปลงจากอาหาร BG-11₀) ซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนมากกว่า เมื่อเทียบกับอาหารสูตร BG-11₀ (Blue - Green Medium สูตรปราศจากไนโตรเจน) ที่ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ $42.09 \pm 0.76 \mu\text{molH}_2/\text{mgChl/h}$ ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นร้อยละ 31.67 ในขณะที่อาหารสูตร BG-11 (Blue - Green Medium สูตรปกติ) ไม่พบการผลิตไฮโดรเจน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์ (ทุนการศึกษาประเภทที่ 1) และสำนักงานโยธาและแผนพลังงานสำหรับทุนส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน แผนพลังงานทดแทน เป็นจำนวนเงิน 99,800 บาท ได้รับการสนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์การทํางานจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ประจำ

สำนักวิจัยด้านพลังงานชีวภาพคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความ
อนุเคราะห์ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตแก๊สไฮโดรเจนครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Al-Haj, L., Lui, Y. T., Abed, R. M. M., Gomaa, M. A. & Purton, S. (2016). Cyanobacteria as chassis for industrial biotechnology: progress and prospects. *Life*, 6(4), 42, 17 pp. doi: 10.3390/life6040042
- Baebprasert, W., Lindblad, P. & Incharoensakdi, A. (2010). Response of H₂ production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(13), 6611-6616. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.047>
- Berrendero, E., Valiente, E. F., Perona, E., Gómez, C. L., Loza, V., Muñoz-Martín, M. A. & Mateo, P. (2016). Nitrogen fixation in a non-heterocystous cyanobacterial mat from a mountain river. *Scientific Reports*, 6, Article number 30920, 13 pp. doi: 10.1038/srep30920
- Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S. & Bhattacharya, S. K., (2005). Hydrogen production by cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, 4, 36, 11 pp. doi:10.1186/1475-2859-4-36
- Elam, C. C., Padró, C. E., Sandrock, G., Luzzi, A., Lindblad, P. & Hagen, E. F. (2003). Realizing the hydrogen future: the international energy agency's efforts to advance hydrogen energy technologies. *International Journal of Hydrogen Energy*, 28(6), 601-607.
- Hallenbeck, P. C. (2012). Hydrogen production by cyanobacteria. In P. C. Hallenbeck (Ed.) *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production* pp. 15-28. New York: Springer Science+Business Media.
- Hamilton, T. L., Bryant, D. A. & Macalady, J. L. (2016). The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. *Environmental Microbiology*, 18(2), 325-340. doi: 10.1111/1462-2920.13118
- Hossain, M. F., Ratnayake, R. R. & Wasantha Kumara, K. L. (2016). Isolation purification and culturing of cyanobacteria and microalgae towards biodiesel production: Current status. *American Journal of Biomass and Bioenergy*, 5(3), 111-129. doi: 10.7726/ajbb.2016.1009
- Kamglomjai, N. (2009). *Isolation of microorganism for producing hydrogen gas from food wastewater* (Master thesis) Department of Environmental Science, Faculty of Environment, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

- Khetkorn W., Lindblad, P. & Incharoensakdi, A. (2010). Enhanced biohydrogen production by the N₂ Fixing Cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(23), 12767-12776. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.135>
- Lindberg, P. (2003). Cyanobacterial hydrogen metabolism-uptake hydrogenase and hydrogen production by nitrogenase in filamentous cyanobacteria (Ph.D. thesis) Department of Physiological Botany, Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Mokashi, K., Shettyb, V., Annie, S., & Georgec, G. (2016, June). Sodium Bicarbonate as Inorganic Carbon Source for Higher Biomass and Lipid Production Integrated Carbon Capture in *Chlorella vulgaris*. *Achievement in the life Sciences*, 10(1), 111-117.
- Mokashi, K., Shetty, V., George, S. A. & Sibi, G. (2016) Sodium bicarbonate as inorganic carbon source for higher biomass and lipid production integrated carbon capture in *Chlorella vulgaris*. *Achievement in the life Sciences*, 10(1), 111-117. doi: 10.1016/j.als.2016.05.011.
- Nagel, V., Mhalsekar, N. & Tagtap, T. (2010, June). Isolation optimization and characterization of selected cyanophycean members. *Indian Journal of Marine Sciences*, 39(2), 212-218.
- Nakthong, K. (2013). *Optimization and production of phycocyanin from cyanobacterium Oscillatoria sp.* (Master thesis) Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok. (in Thai)
- Schut, G. J., & Adams, M. W. (2009). The iron-hydrogenase of thermotogamaritima utilizes ferredoxin and NADH synergistically: A new perspective on anaerobic hydrogen production. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4451-4457.