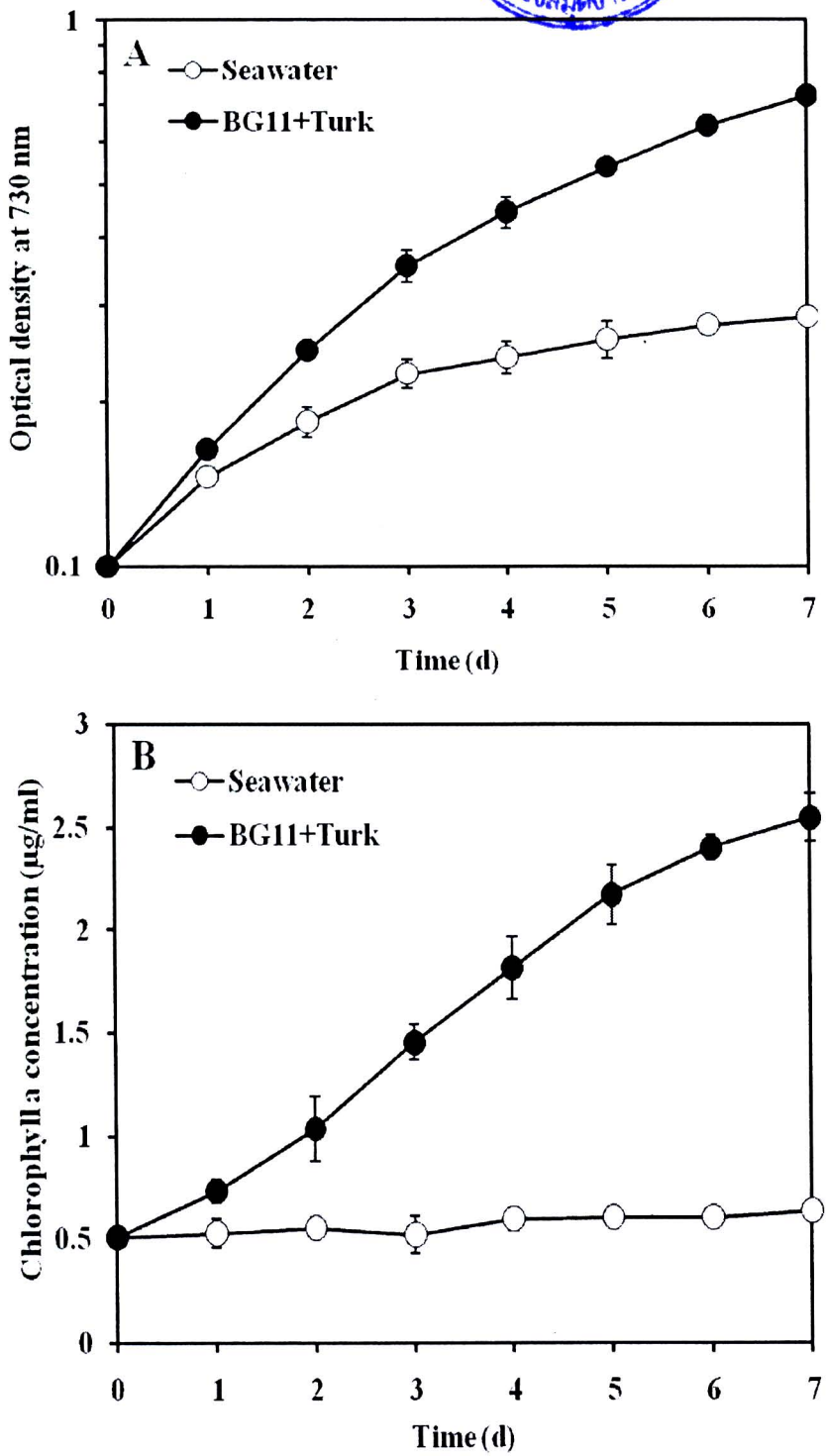
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เปรียบเทียบกับน้ำทะเล

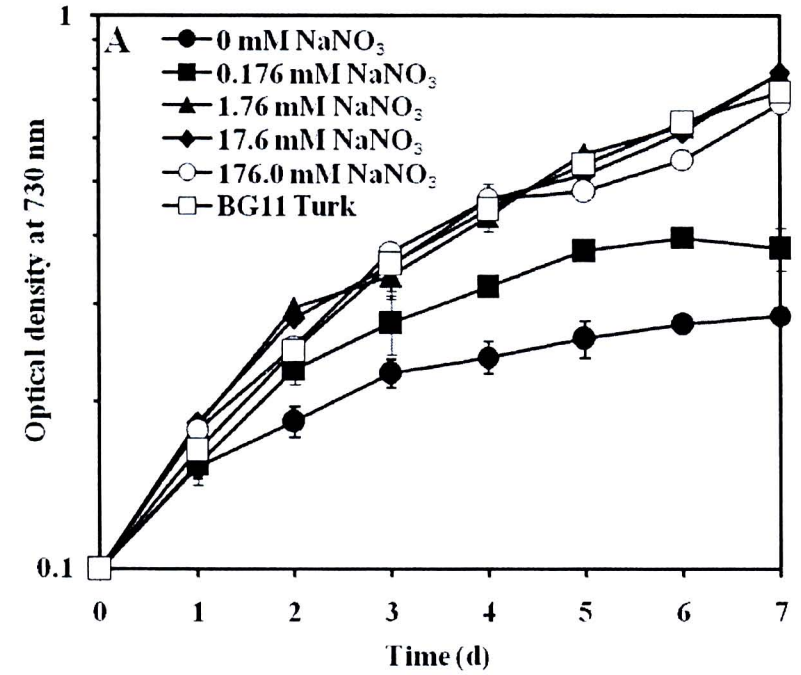
จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution และในน้ำทะเล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที โดยให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรและวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.1A) ซึ่งการเจริญของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution มากกว่าที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลประมาณ 2.5 เท่า ณ วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ จากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สูงขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น (รูปที่ 4.1B) ซึ่งรูปแบบของการเพิ่มขึ้นจะสอดคล้องกับรูปแบบของค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 4.1A) ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลจะมีสีเหลืองและไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 4.1B) แสดงให้เห็นว่า *A. halophytica* ไม่สามารถเจริญในน้ำทะเลได้ จำเป็นต้องทำการเติมธาตุอาหารที่ทำให้ *A. halophytica* เจริญเติบโตได้ดี การทดลองถัดไป จึงทำการแปรผันปริมาณโซเดียมไนเตรทซึ่งจัดเป็นธาตุอาหารหลักที่สาหร่ายและพืชต้องการในการเจริญเติบโต

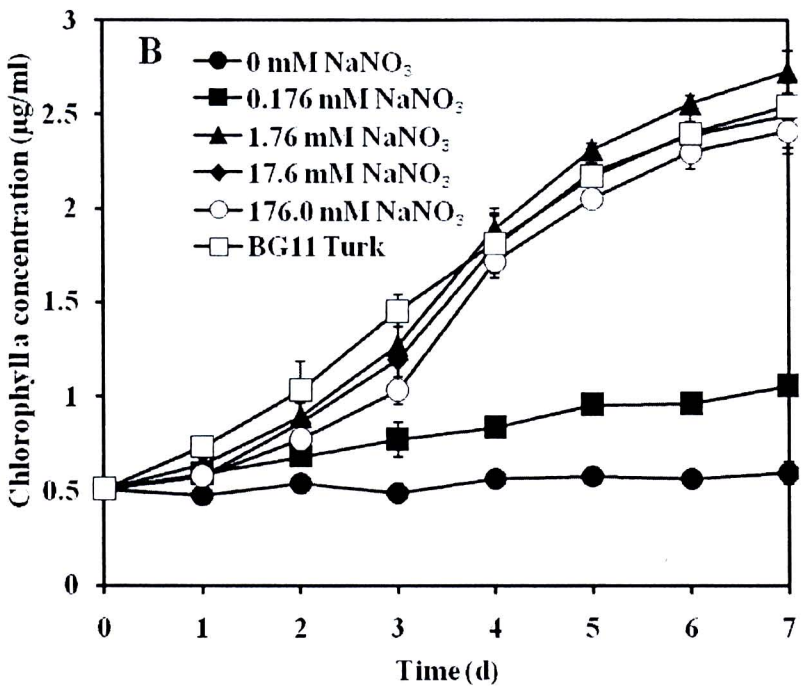


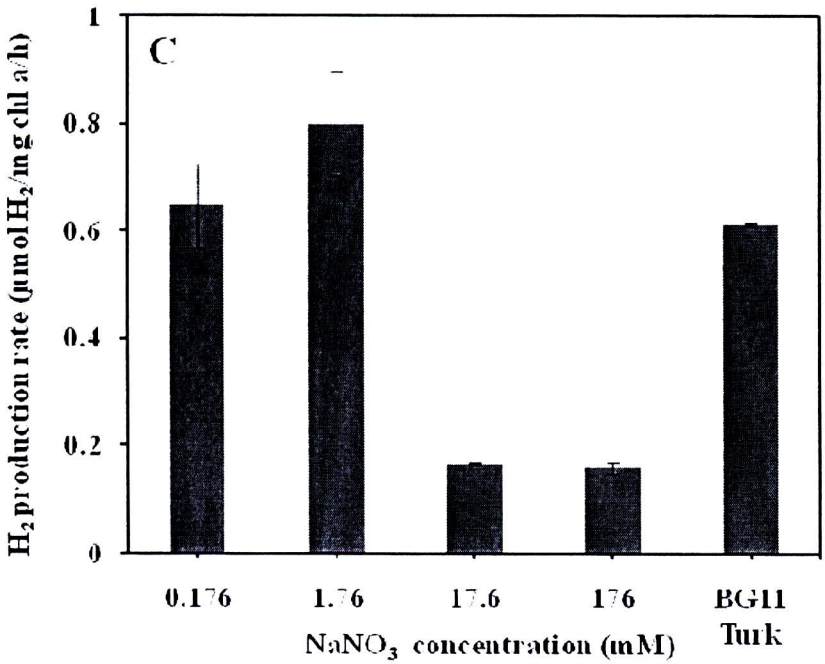
รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโต (A) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลและในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

4.2 ผลของไนเตรทต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทของ 0, 0.176, 1.76, 17.6 และ 176 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วันและนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในวันที่ 7 ไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า *A. halophytica* มีการเจริญเติบโตและมีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทตั้งแต่ 1.76 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป (รูปที่ 4.2A,B) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์กับที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution พบว่ามีการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.2A,B) และยังพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.80 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.6C) โดยผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรท 17.6 และ 176 มิลลิโมลาร์และในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution ถึง 4.7, 5 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการผลิตไฮโดรเจนจะลดลงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเพิ่มมากขึ้น ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรท 0.176 มิลลิโมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำกว่าในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์เพียงเล็กน้อยซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่การเจริญเติบโตต่ำกว่าประมาณ 2 เท่า ดังนั้น ในการทดลองขั้นถัดไปจึงเลือกเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดและแปรผันสภาวะอื่นๆ ต่อไป


A
0 mM NaNO3
0.176 mM NaNO3
1.76 mM NaNO3
17.6 mM NaNO3
176.0 mM NaNO3
BG11 Turk
Optical density at 730 nm
1
0.1
0
1
2
3
4
5
6
7
Time (d)

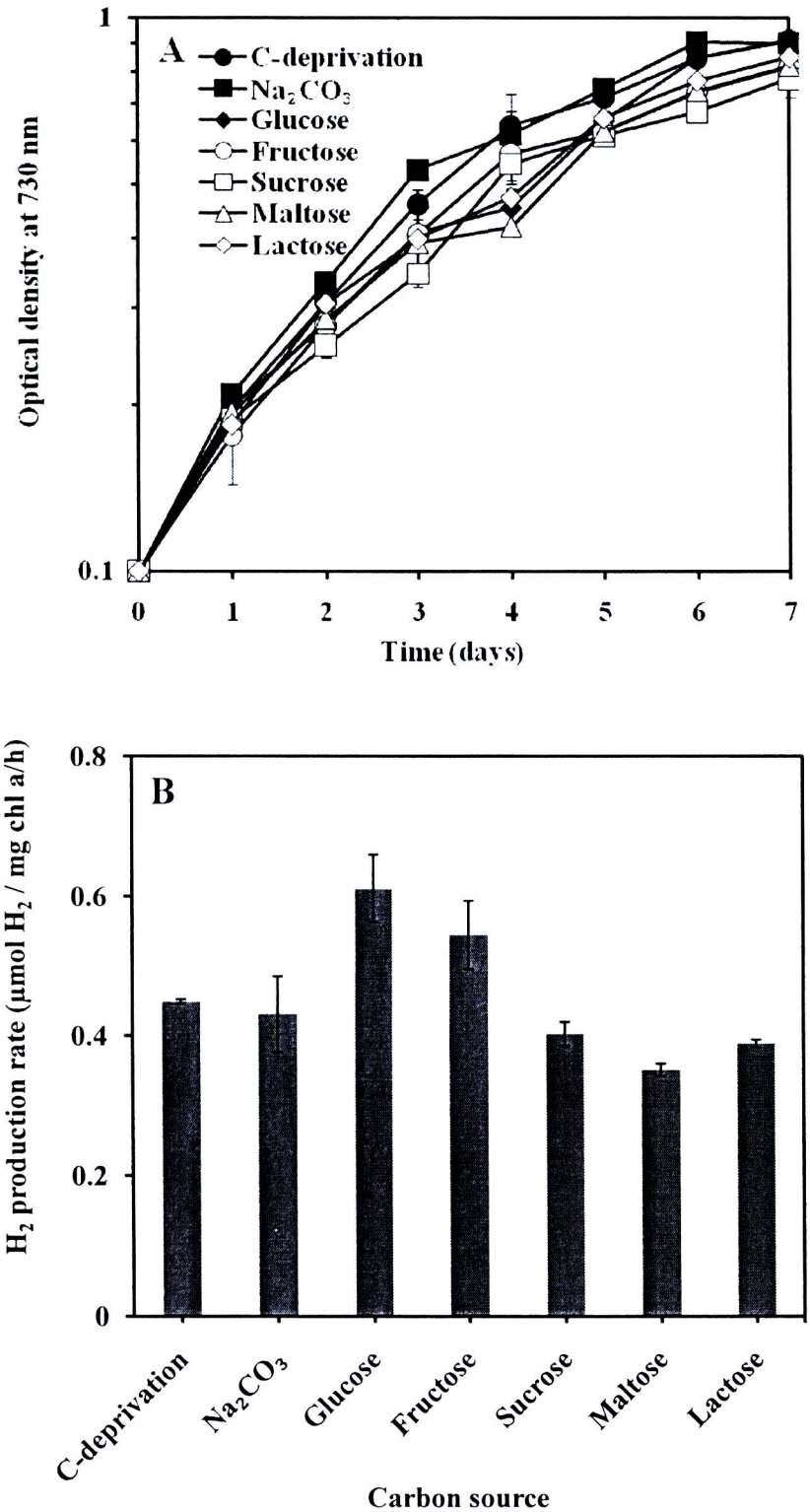

B
0 mM NaNO3
0.176 mM NaNO3
1.76 mM NaNO3
17.6 mM NaNO3
176.0 mM NaNO3
BG11 Turk
Chlorophyll a concentration (µg/ml)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
Time (d)



รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโต (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) และการผลิตไฮโดรเจน (C) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 0.176, 1.76, 17.6 และ 176 มิลลิโมลาร์เปรียบเทียบกับในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ Na_2CO_3, Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose และ Lactose โดยมีน้ำทะเลที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน (C-deprivation) เป็นชุดควบคุม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยแหล่งคาร์บอนดังกล่าวมีจำนวนโมลคาร์บอนเท่ากับ Na_2CO_3 ที่มีในอาหาร BG11 สูตรปกติ คือ 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วันและนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในวันที่ 7 ไปวัดปริมาณไฮโดรเจน พบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.61 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.3B) และสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนประมาณ 1.4 เท่า ซึ่งค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละ 95 นอกจากนี้ ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างของการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่แปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ (รูปที่ 4.3A)

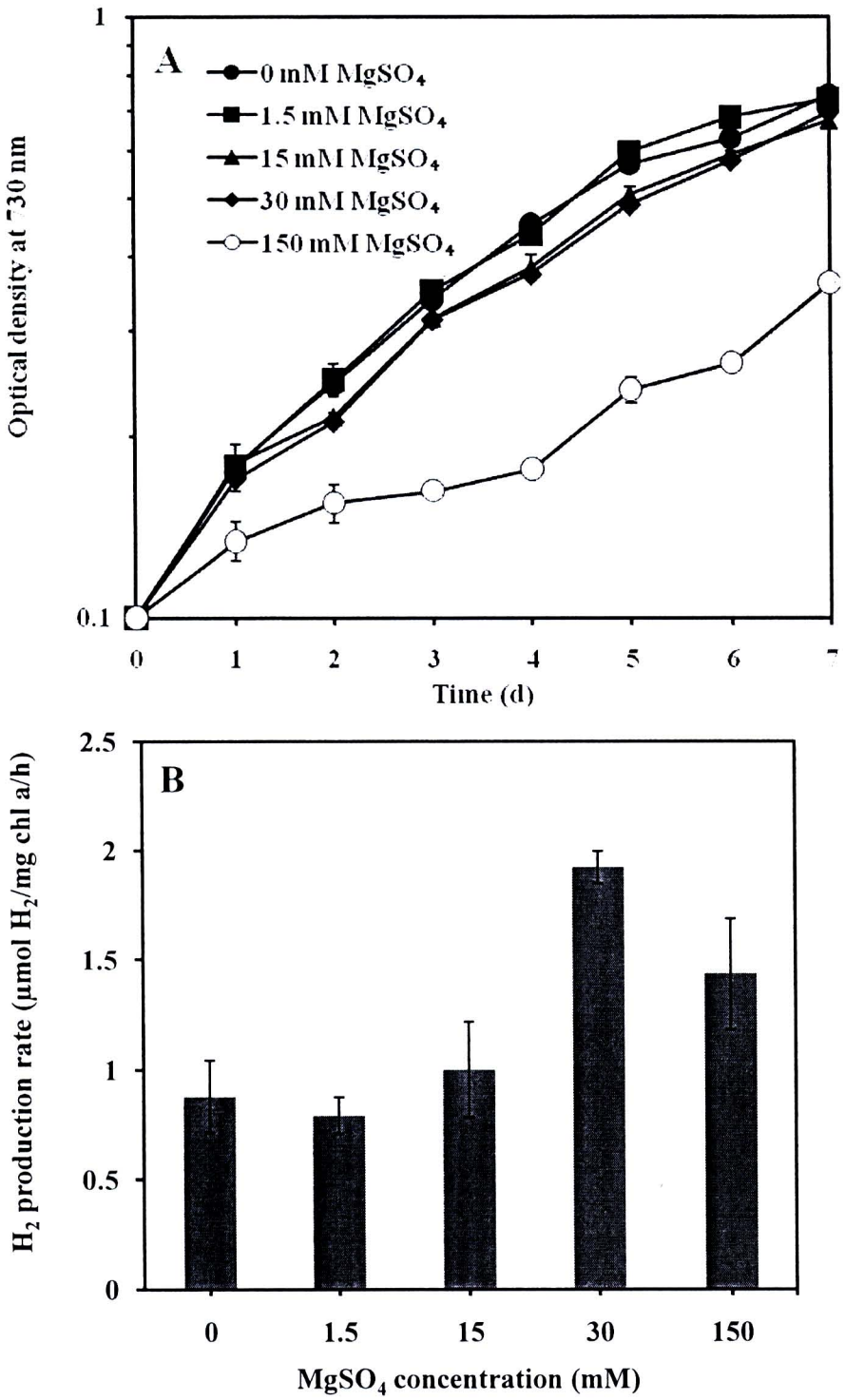


รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ

ดังนั้น จึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ในน้ำทะเล เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนให้ค่าไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ เซลล์ของ *A. halophytica* ยังสามารถเจริญได้ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนอีกด้วย (รูปที่ 4.3A) ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไป จึงไม่ต้องเติมแหล่งคาร์บอนในน้ำทะเล เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตไฮโดรเจนในระดับขยายขนาดการผลิตต่อไป

4.4 ผลของซัลเฟอร์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0, 1.5, 15, 30 และ 150 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำเซลล์ไปวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.92 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูป 4.4B) และมีค่าสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตประมาณ 2.2 เท่า นอกจากนี้ ยังพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตและมีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.5, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์มีการเจริญเติบโตสูงและให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.4A) แต่เซลล์จะมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.4A) โดยเซลล์จะอยู่ในระยะ lag ที่ยาวนานประมาณ 4 วัน ก่อนเข้าสู่ระยะ log



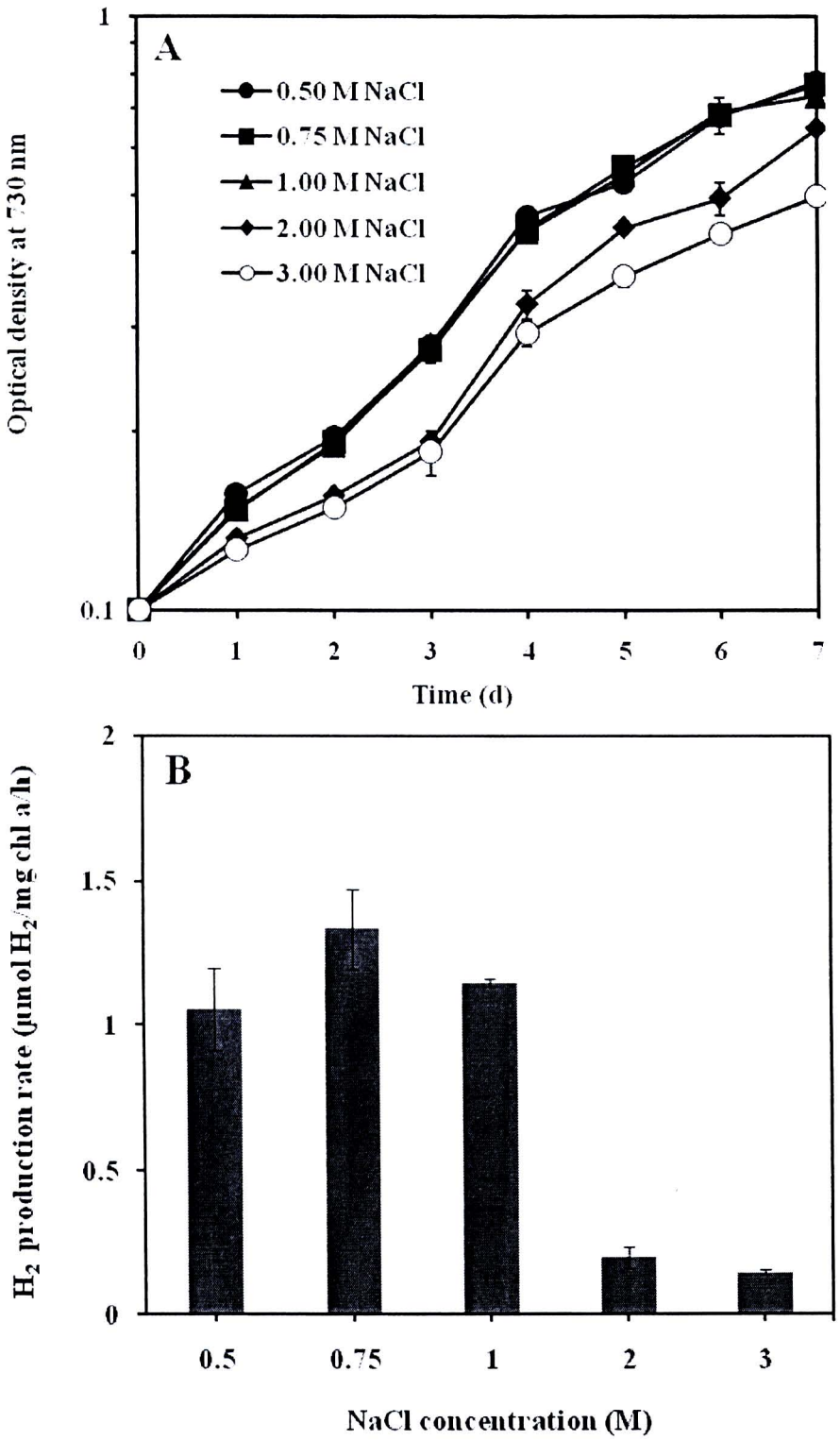
รูปที่ 4.4 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต

4.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

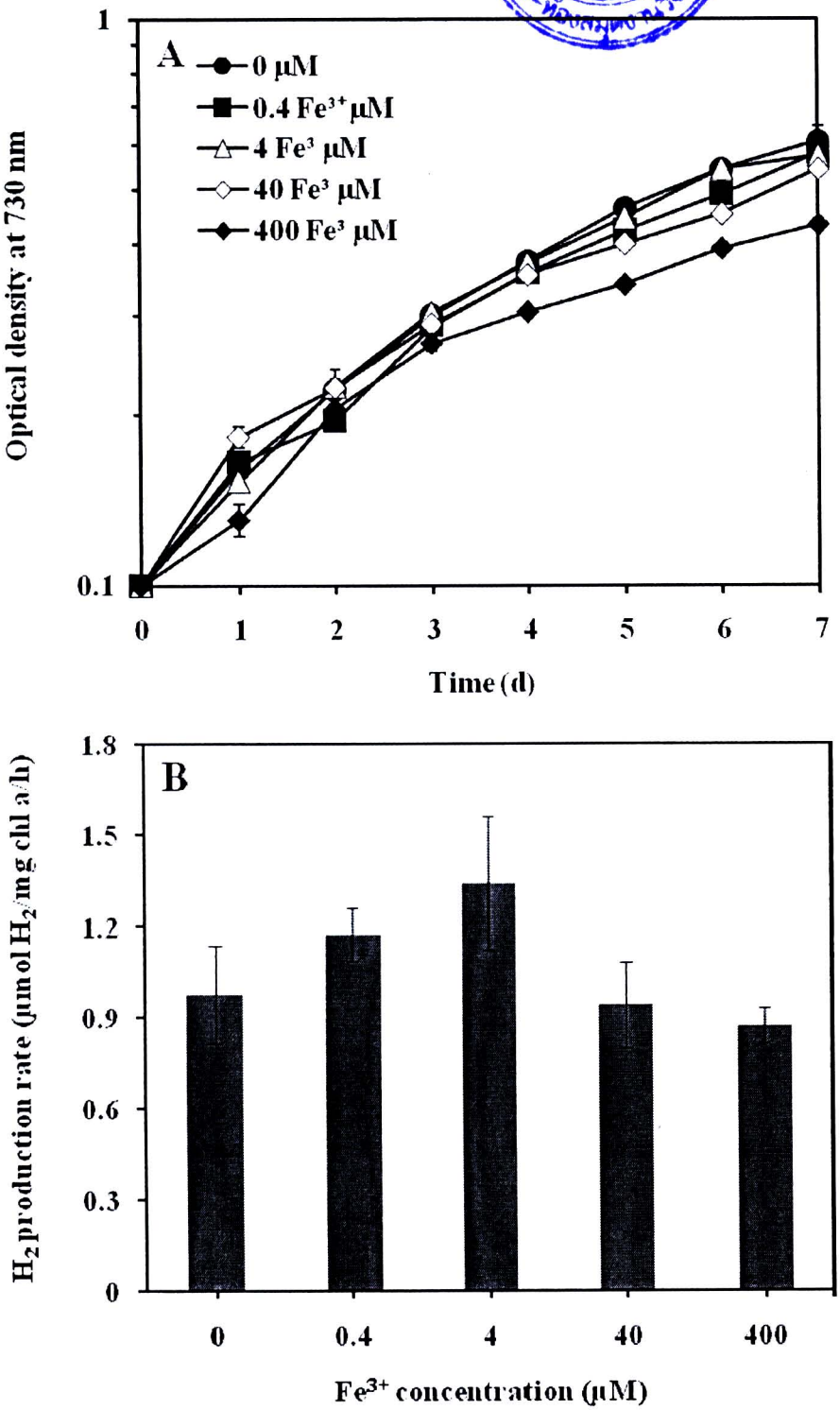
โดยปกติ น้ำทะเลมีโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือประมาณ 0.5 โมลาร์ ในการทดลองนี้ ได้ทำการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 และ 3.0 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำเซลล์ไปวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *A. halophytica* มีการเจริญเติบโตดีเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5-1.0 โมลาร์ (รูปที่ 4.5A) ในขณะที่ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2-3 โมลาร์ เซลล์จะมีการเจริญเติบโตช้ากว่า โดยมีช่วงระยะ lag ประมาณ 3 วัน ก่อนจะสู่ระยะ log นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.33 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.5B) ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปกติ (มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์) และน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 โมลาร์ประมาณ 1.3 และ 9.5 เท่า ตามลำดับ

4.6 ผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออน 0, 0.4, 4, 40 และ 400 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำเซลล์ไปวัดการผลิตไฮโดรเจน พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของเหล็ก 0-40 ไมโครโมลาร์ แต่มีการเจริญเติบโตลดลงเล็กน้อยในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของเหล็ก 400 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.6A) และยังพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของเหล็ก 4 ไมโครโมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.34 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.6B) ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากเหล็กไอออนประมาณ 1.7 เท่า



รูปที่ 4.5 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของโซเดียมคลอไรด์



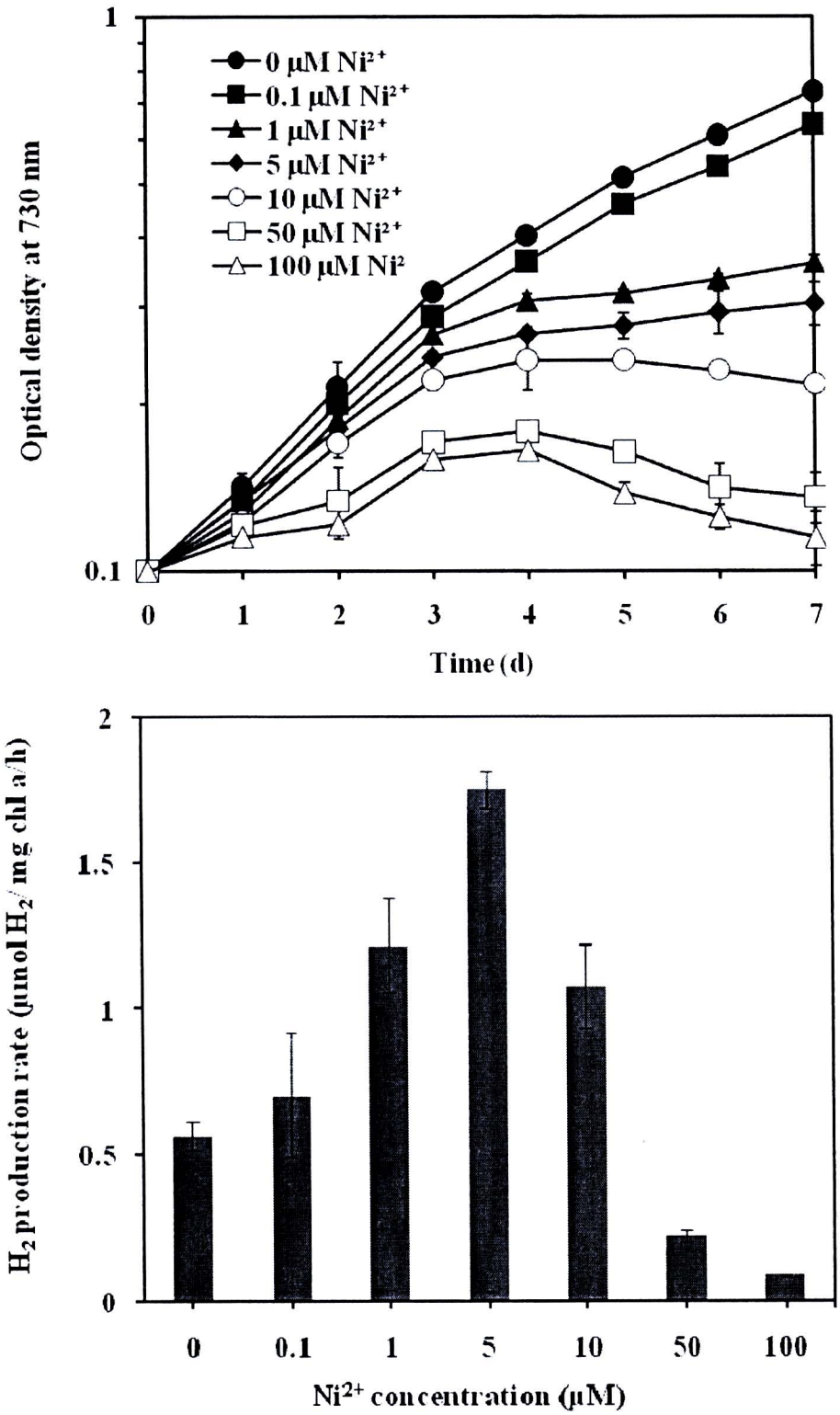
รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของเหล็กไอออน

4.7 ผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

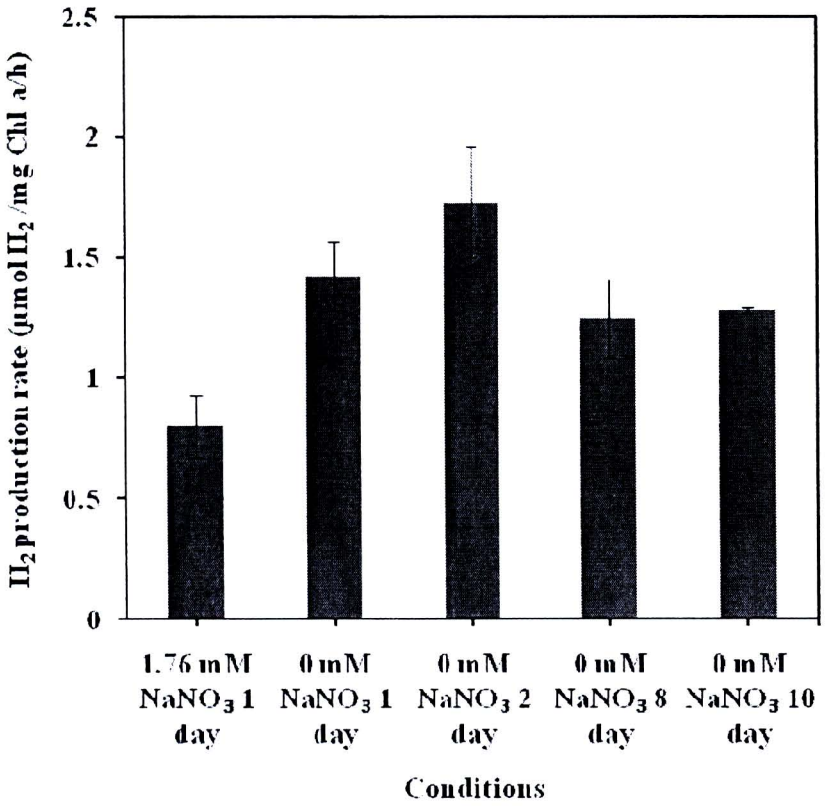
จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของนิกเกิลไอออน 0, 0.1, 1, 5, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำเซลล์ไปวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า เมื่อความเข้มข้นของนิกเกิลในน้ำทะเลสูงขึ้น การเจริญเติบโตของ *A. halophytica* จะลดลง โดยเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยมากอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของนิกเกิลไอออนสูงคือ 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ส่วนใหญ่จะตายภายหลัง 7 วันของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.7A) ซึ่งเป็นผลมาจากความเป็นพิษของนิกเกิลต่อเซลล์ ในการวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *A. halophytica* ผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 1.75 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีนิกเกิลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.7B) และมีค่ามากกว่าการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากนิกเกิลถึง 3.1 เท่า

4.8 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบยั่งยืนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage

การเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในระบบ two-stage กระทำโดย ขั้นแรกทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นั่นคือ เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น ขั้นที่สอง นำสารละลายเซลล์มาเหนี่ยวนำให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยนำเซลล์มาเก็บเกี่ยวโดยการปั่นเหวี่ยง และล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทจำนวน 2 ครั้ง และนำเซลล์ที่ได้มากระจายในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทและบ่มต่อเป็นระยะเวลา 1, 2, 8 และ 10 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน จากการทดลองพบว่า การผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* เพิ่มสูงขึ้น เมื่อบ่มในสภาวะที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทและมีค่าการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 1.72 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในน้ำทะเลปราศจากโซเดียมไนเตรท เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นอัตราการผลิตจะลดลงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืน โดยผลิตได้เป็นเวลาถึง 10 วัน (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของนิกเกิลไอออน



รูปที่ 4.8การผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ภายหลังการเหนี่ยวนำเซลล์ในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท เป็นเวลา 1, 2, 8 และ 10 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เหนี่ยวนำในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน