บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เปรียบเทียบกับน้ำทะเล

โดยทั่วไปแล้ว น้ำทะเลในธรรมชาติประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ ประมาณ 50 ชนิด และมีส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์อีกมากมาย อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเลโดยตรงนั้นส่วนใหญ่ไม่ค่อยได้รับความนิยมมากนัก เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตต่ำ ได้มวลชีวภาพน้อย อย่างไรก็ตาม หากมีการเติมสารอาหารและธาตุอาหารต่างๆ ที่ไซยาโนแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโตลงไปในน้ำทะเล จะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (Harrison, 2004) ในการทดลองนี้ ได้ทำการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลธรรมชาติเทียบกับในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม และศึกษาการเจริญของเซลล์จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลมีการเจริญเติบโตและมีปริมาณคลอโรฟิลล์น้อยกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ (รูปที่ 4.1A,B) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ของ *A. halophytica* ต้องการสารอาหารบางอย่างเพิ่มเติมเพื่อให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและต่อเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ จากรายงานการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทะเลสีเขียว *Platymonas subcordiformis* (Guan *et. al.*, 2004) พบว่าเซลล์สาหร่ายทะเลสีเขียวชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อมีการเติมสารต่างๆ ลงไปน้ำทะเล เช่น $FeCl_3$, $MnCl_2$, H_3BO_3, EDTA, NaH_2PO_4, $NaNO_3$, $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $(NH_4)_4Mo_7O_{24}$, $CuSO_4$, $VitB_{12}$ และ $VitB_1$ นอกจากนี้ ได้มีการทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Oscillatoria* sp. Miami BG 7 ในน้ำทะเลแบบระบบเปิดปริมาณ 10 ลิตร โดยใช้น้ำทะเลที่เสริมด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่สมบูรณ์ พบว่าได้มวลชีวภาพในปริมาณ 180 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อวัน (Guillard *et. al.*, 1962) อย่างไรก็ตาม หากใช้สารเคมีจำนวนมากก็จะทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงได้สนใจศึกษาผลของปริมาณโซเดียมไนเตรท ชนิดของแหล่งคาร์บอน ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ เหล็กและนิกเกิลไอออนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

5.2 การศึกษาผลของปริมาณโซเดียมไนเตรทต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองเติมโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 176 มิลลิโมลาร์ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต จากการทดลองพบว่า เมื่อเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นเพียง 1.76 มิลลิโมลาร์ก็สามารถทำให้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีการเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตจะใกล้เคียงกับที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution สูตรปกติ (รูปที่ 4.2A) นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์มีปริมาณคลอโรฟิลล์ใกล้เคียงกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เช่นกัน (รูปที่ 4.2B) แสดงให้เห็นว่าไนเตรทมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต รวมถึงเป็นธาตุที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารโมเลกุลต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การสร้างคลอโรฟิลล์ รวมถึงเมตาบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Synechococcus* sp. เพื่อการเจริญเติบโต (Glibert *et. al.*, 1986; Paerl 1991; Lindell *et. al.*, 1995; Collier *et. al.*, 1999) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Synechococcus* strain DC-2 ในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจน พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงและมีการสลายไฟโคไซยานินที่อยู่ภายในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (Wyman *et. al.*, 1985) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองนี้คือ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่ปราศจากการเติมโซเดียมไนเตรท เซลล์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (รูปที่ 4.2A, B) จากการวัดอัตราการผลิตไฮโดรเจน พบว่า *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรทจำกัด คือ 1.76 มิลลิโมลาร์ (อาหาร BG11 สูตรปกติมีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 17.6 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.2C) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองในไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Phormidium valderianum* BDU 20041 (Phabaharan and Subramanian 1996) ที่พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เช่น ไนเตรท ไนไตรท์ และแอมโมเนีย มีผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง เช่นเดียวกับในไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จะส่งผลทำให้กิจกรรมของ PSII ลดลง ทำให้มีออกซิเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์ของ PSII น้อย เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึง active และมีกิจกรรมการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังสามารถอธิบายการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนจากการเพิ่มขึ้นของไกลโคเจนภายในเซลล์ โดยไกลโคเจนภายในเซลล์นี้จะกลายเป็นสารตั้งต้นทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่มีแสง (Kumazawa and Mitsui 1981; Mitsui *et. al.*, 1983) ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงเลือกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์

เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สำหรับการทดลองต่อๆ ไป จึงได้ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์

5.3 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

โดยปกติแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียทั่วไปมีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ โดยสามารถลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของภาวะเรือนกระจกได้ การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ดังกล่าวนี้จะเกิดร่วมกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสร้างมวลชีวภาพได้ ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* โดยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ใช้มีโมลคาร์บอนเท่ากัน จากการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.3A) แสดงให้เห็นว่า คาร์บอนไม่ใช่ปัจจัยหรือธาตุอาหารหลักสำหรับการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย และแม้จะไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ในน้ำทะเล เซลล์ของ *A. halophytica* ก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ ซึ่งผลดังกล่าวอาจสืบเนื่องมาจากเซลล์สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศได้เพื่อการเจริญและการสะสมมวลชีวภาพ อย่างไรก็ตาม การผลิตไฮโดรเจนมีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่เติมกลูโคส (รูปที่ 4.3B) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองในรายงานที่ผ่านมาในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว *Microcystis aeruginosa*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 และไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Nostoc muscorum* ที่สามารถใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจนได้ (Rashid *et. al.*, 2009; Baebprasert *et. al.*, 2010; Shah *et. al.*, 2003)

5.4 การศึกษาผลของซัลเฟอร์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการรายงานที่ผ่านมาในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* และในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Gloeocapsa alpicola* และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Antal and Lindblad 2005) พบว่า การผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อบ่มในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า ในสภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์ เซลล์กิจกรรมของ PSII ลดลงซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการลดลงของออกซิเจน ซึ่งโดยปกติ ออกซิเจนไปจะยังยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

แต่ในกรณีที่มีออกซิเจนลดลง ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น (Melis *et. al.*, 2000; Zhang *et. al.*, 2002) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในรายงานที่ผ่านมาไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งพบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และเติมแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยให้ค่าสูงกว่าในน้ำทะเลที่ปราศจากซัลเฟอร์ถึง 2.4 เท่า (รูปที่ 4.4B) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่เซลล์ต้องการซัลเฟอร์ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่จำเป็นต่อกระบวนการหายใจ การสังเคราะห์แสงและเมตาบอลิซึมสำหรับการดำรงชีพของเซลล์ตลอดระยะเวลา 7 วันของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตจะต้องไม่มากเกินไป เนื่องจากจะเกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงมากและนำไปสู่การยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน

5.5 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

การทดลองนี้ เป็นการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่เป็นไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม โดยในปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ ปกติแล้ว น้ำทะเลที่อยู่ในมหาสมุทรมีโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่ายทะเลส่วนใหญ่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเค็มต่ำ คือประมาณ 3 ถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์ แต่บางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถทนต่อความเค็มได้ (Harrison, 2004) มีรายงานพบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 3 โมลาร์หรือ 17.5 เปอร์เซ็นต์ได้ แต่เซลล์จะเจริญเติบได้ดีในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 0.5-1 โมลาร์หรือ 2.93-5.85 เปอร์เซ็นต์ (Takabe *et. al.*, 1988) ในการทดลองครั้งนี้พบว่า *A. halophytica* มีรูปแบบการเจริญที่ปกติเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 0.5-1 โมลาร์ แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 โมลาร์พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้เช่นเดียวกัน แต่มีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด (รูป 4.5A) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในน้ำทะเลธรรมชาติที่มีโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.5 โมลาร์เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ได้มีรายงานพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Nodularia spumigena* มีการเก็บสะสมมวลชีวภาพได้สูงกว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอาหารที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์หรือมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง (30 เปอร์เซ็นต์) (Lehtimäki *et. al.*, 1997) นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียทะเลส่วนใหญ่ไม่

สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ (ปกติมีความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์) และไซยาโนแบคทีเรียประเภทนี้จำเป็นที่จะต้องได้รับไอออนของโซเดียม คลอไรด์ แมกนีเซียม และ แคลเซียมอีกด้วย (Stanier and Cohen-Bazire, 1977) ในการทดลองนี้ การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้น 0.75 โมลาร์หรือ 4.4 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5B) ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Lyngbya* sp. strain 108 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในอาหารที่มีปราศจากโซเดียมคลอไรด์ แต่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (Kuwada and Ohta, 1989) และไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Phormidium valderianum* BDU 20041 ที่มีอยู่ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง (2.5 กรัมต่อลิตร หรือ 2.5 เปอร์เซ็นต์) มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Prabaharan and Subramaina, 1996) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจสืบเนื่องมาจากการใช้พลังงานและรีดักแทนท์เพื่อที่จะทำให้เซลล์ทนต่อความเค็มได้ จากรายงานการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Lyngbya* sp. strain 108 พบว่ามีการเก็บสะสมสารพวกคาร์โบไฮเดรตเพื่อเป็นตัวให้โปรตอนและอิเล็กตรอน เพื่อใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งการเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตดังกล่าว มีผลมาจากความเค็มในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Pringsheim and Wiessner, 1960) ในการทดลองนี้ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.75 โมลาร์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นความเข้มข้นปานกลางที่ไม่มากและน้อยเกินไป เซลล์มีการเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตเพื่อใช้เป็นแหล่งสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไฮโดรเจนได้ดีและไม่ใช้พลังงานกับทำให้เซลล์ทนต่อความเค็มมากเกินไป

5.6 การศึกษาผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

เหล็กมีความสำคัญสำหรับปฏิกิริยารีดอกซ์ที่หลากหลายในไซยาโนแบคทีเรีย โดยเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการหายใจ (Raven, 1999) นอกจากนี้ เหล็กยังเป็นโคแฟคเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์ในโตรจีเนสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย (Dean *et. al.*, 1993; Geider and La Roche, 1994; Lin and Stewart, 1997) ยิ่งไปกว่านั้น เหล็กเป็นโคแฟคเตอร์ในศูนย์กลางบริเวณของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทุกชนิดในไซยาโนแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน (Vignais *et. al.*, 2001) มีรายงานพบว่าการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเหล็กในปริมาณมาก ซึ่งอธิบายได้ว่าเหล็กเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนโตรจีเนสหรือเฟอร์รีดอกซินในการขนส่งอิเล็กตรอน (Jeffries *et. al.*, 1978) ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีเหล็ก

ไอออนความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ และให้ค่ามากกว่าน้ำทะเลที่ปราศจากเหล็กไอออนถึง 1.48 เท่า (รูปที่ 4.6B) แสดงให้เห็นว่าเหล็กมีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการเป็นโคแฟคเตอร์ในการขนส่งอิเล็กตรอนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจน ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีการเติมเหล็กไอออนความเข้มข้นสูงถึง 40 และ 400 ไมโครโมลาร์ การผลิตไฮโดรเจนจะลดลง (รูปที่ 4.6B) อาจเนื่องมากจากไอออนของเหล็กในปริมาณมากดังกล่าวเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์พยายามใช้พลังงานในการผลักดันให้นำเหล็กออกจากเซลล์

5.7 การศึกษาผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

ในการศึกษาผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* พบว่าระดับของนิกเกิลมีความสำคัญต่อการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหารที่มีนิกเกิลไอออนความเข้มข้นสูงถึง 50-100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้และนำไปสู่การตายของเซลล์ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.7A) นอกจากนี้ ยังพบว่า *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีนิกเกิลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์และมีค่าสูงกว่า 2.6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากนิกเกิล (รูปที่ 4.7B) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของนิกเกิลต่อการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่พบว่าความเข้มข้นของนิกเกิลที่เหมาะสมส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 0.5 ถึง 5 ไมโครโมลาร์ (Rai *et. al.*, 1986; Serebryakova *et. al.*, 1999; Axelsson and Lindblad, 2002; Gutekunst *et. al.*, 2006) จากการรายงานของ Carrieri และคณะ (2008) พบว่านิกเกิลในปริมาณที่จำกัดมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira maxima* การอธิบายผลของนิกเกิลต่อการผลิตไฮโดรเจนอาจจะเป็นไปได้ด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ ประการแรกเกี่ยวของกับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากนิกเกิลที่เติมลงไปในอาหารอาจจะเป็นแหล่งของโคแฟคเตอร์ที่อยู่บริเวณศูนย์กลางการเร่งของปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าว และประการที่สอง นิกเกิลที่เติมเข้าไปในอาหารอาจไปมีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hox* ซึ่งเป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ จากการศึกษาการแสดงออกของยีนไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* พบว่าเมื่อมีการเติมนิกเกิลในอาหารส่งผลให้มีการกระตุ้นการถอดรหัสของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ในไซยาโนแบคทีเรีย *N. muscorum* และเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ใน *N. muscorum* และ *Nostoc* sp. strain PCC 73102 (Axelsson and Lindblad, 2002)

5.8 การศึกษาผลการผลิตไฮโดรเจนแบบยั่งยืนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage

จากการทดลองที่ 4.2 ซึ่งพบว่าไนเตรทเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของ *A. halophytica* ดังนั้นการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในระบบ two-stage เพื่อผลิตไฮโดรเจนอย่างยั่งยืน (ผลิตเป็นระยะเวลานานอย่างต่อเนื่อง) มี 2 ขั้นตอน ขั้นแรก เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นั่นคือ เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น ขั้นที่สอง นำสารละลายเซลล์มาเหนี่ยวนำให้อยู่ในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทและสารอื่นๆ เนื่องจากหากสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จะเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการเติมสารต่างๆ และสามารถนำน้ำทะเลมาใช้ได้จริง จากการทดลองพบว่า *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเหนี่ยวนำและสูงสุดในวันที่ 2 โดยผลิตได้ 1.72 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง หลังจากนั้น อัตราการผลิตจะลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 10 จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า *A. halophytica* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืนในน้ำทะเล โดยผลิตได้เป็นเวลาถึงอย่างน้อย 10 วัน (รูปที่ 4.8)