

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



246468



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต  
ไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

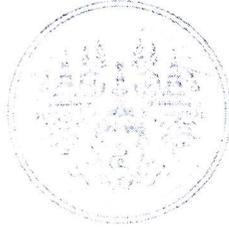
Application of Seawater as a Culture Medium for Growth and Hydrogen  
Production of the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*

ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พุกภัย  
นายสามารถ ต่ายขาว  
ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์  
ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต  
ไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

Application of Seawater as a Culture Medium for Growth and Hydrogen  
Production of the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*



ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พุกฤษ์

นายสามารถ ต่ายขาว

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต

### ไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 250,000 บาท  
ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2553 ถึง 30 กันยายน 2554

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัดและเลขหมายโทรศัพท์

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย และนายสามารถ ต่ายขาว สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน สาขาวิชาเคมีและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ สจล.

### บทคัดย่อ

246468

ไบโอดีไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวชอบเค็ม *Aphanothece halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนด้วยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีข้อได้เปรียบในการเพาะเลี้ยงที่สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและนำมาผลิตไฮโดรเจนจากการทดลองพบว่าการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นอย่างน้อย 1.76 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งไนโตรเจนในน้ำทะเลจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ โดยมีอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution นอกจากนี้การเติมแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งคาร์บอนไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ความเข้มข้นของสารอาหารและแร่ธาตุที่เหมาะสมในการเติมลงไป ในน้ำทะเลเพื่อการผลิตไฮโดรเจน คือ โซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต 30 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 0.75 โมลาร์ เหล็กไอออน 4 ไมโครโมลาร์ และนิกเกิลไอออน 5 ไมโครโมลาร์ สุดท้ายศึกษาการผลิตไฮโดรเจนอย่างยั่งยืนของ *A. halophytica* โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์ ล้างเซลล์ 2 ครั้ง กระจายเซลล์และบ่มในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท พบว่า *A. halophytica* ผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่วันที่ 1 ของการบ่ม และผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในวันที่ 2 และยังพบการผลิตไฮโดรเจน หลังการบ่มเป็นเวลา 10 วัน

คำสำคัญ : ไซยาโนแบคทีเรีย การผลิตไฮโดรเจน น้ำทะเล

**Research Title: Application of Seawater as a Culture Medium for Growth and Hydrogen Production of the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica***  
**Researcher: Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch and Mr.Samart Taikhao (Department of Biology, Faculty of Science, KMITL) Prof.Dr.Aran Incharoensakdi (Department of Biochemistry, Faculty of Science, CU) Asst.Prof.Dr.Suwannee Junyapoon (Department of Chemistry, Faculty of Science, KMITL)**

### ABSTRACT

246468

Biohydrogen is an environmental friendly alternative energy carrier which can be produced by a number of different microorganisms. The halophilic unicellular cyanobacterium *Aphanothece halophytica* is capable of producing hydrogen using reversible hydrogenase activity via the photobiological-H<sub>2</sub> production process. The advantage of cultivation this cyanobacterium is that it can grow under high NaCl concentration. Therefore this work aims to grow *A. halophytica* in the seawater supplemented with the essential nutrients and followed by producing hydrogen. It was found that the addition of at least 1.76 mM NaNO<sub>3</sub> as a nitrogen source in seawater was required for the cell growth. Its growth rate and chlorophyll content were similar to the cells cultivated in normal BG11 supplemented with Turk Island salt solution. Moreover, neither an addition of carbon sources nor types of carbon sources showed any significant effect on growth and hydrogen production by *A. halophytica*. From our results, the optimum nutrient and mineral concentrations added to seawater for high hydrogen production were 1.76 mM NaNO<sub>3</sub>, 30 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.75 M NaCl, 4 μM Fe<sup>3+</sup> and 5 μM Ni<sup>2+</sup>. Finally, the sustainable hydrogen production by *A. halophytica* was investigated. The cells were grown in seawater supplemented with 1.76 mM NaNO<sub>3</sub> for 7 days and subsequently harvested, washed twice, resuspended and incubated in seawater without NaNO<sub>3</sub>. The result showed that hydrogen production by *A. halophytica* was found starting from the day 1<sup>st</sup>, was maximized at the day 2<sup>nd</sup> and it was still found after 10 days.

**Keywords :** Cyanobacteria, Hydrogen production, Seawater

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* ดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดี โดยได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากทุนงบประมาณแผ่นดินของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยทุกคนที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

นายสามารถ ต่ายขาว

ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน	5
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน	6
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	8
2.4 ไชยาโนแบคทีเรีย	12
2.5 น้ำทะเลและการใช้ประโยชน์จากน้ำทะเล	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	16
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	16
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	16
3.3 อุปกรณ์	16
3.4 วิธีการดำเนินการ	17
3.4.1 การเจริญและเพาะเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรีย	17
3.4.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของไชยาโนแบคทีเรีย	17
3.4.3 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของไชยาโนแบคทีเรีย	17

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph	18
3.4.5 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ชอบเค็ม <i>A. halophytica</i> เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ ในน้ำทะเล	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
4.1 ผลการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม <i>A. halophytica</i> เมื่อ เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เปรียบเทียบกับน้ำทะเล	22
4.2 ผลของไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	24
4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	26
4.4 ผลของซัลเฟอไรต์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	28
4.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	30
4.6 ผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	30
4.7 ผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	33
4.8 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบยั่งยืนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage	33
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	36
5.1 การศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม <i>A. halophytica</i> เมื่อ เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เปรียบเทียบกับน้ำทะเล	36
5.2 การศึกษาผลของปริมาณโซเดียมไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน ของ <i>A. halophytica</i>	37
5.3 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน ของ <i>A. halophytica</i>	38
5.4 การศึกษาผลของซัลเฟอไรต์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	38
5.5 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	39
5.6 การศึกษาผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	40

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.7 การศึกษาผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	41
5.8 การศึกษาผลการผลิตไฮโดรเจนแบบยังยืนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage	42
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	49

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	11
2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำทะเล	13
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph Thermal conductivity Detector (GC-TCD)	18

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน	6
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	7
2.3 วิธีของการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย	9
2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในไซยาโนแบคทีเรีย	10
4.1 การเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลและในอาหารที่เสริมด้วย Turk Island salt solution	23
4.2 การเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตต่างๆ	25
4.3 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ	27
4.4 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต	29
4.5 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของโซเดียมคลอไรด์	31
4.6 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของเหล็กไอออน	32
4.7 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของนิกเกิลไอออน	34
4.8 การผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ภายหลังจากเหนี่ยวนำเซลล์ในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรต เป็นเวลา 1, 2, 8 และ 10 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เหนี่ยวนำในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 1 วัน	35