

การเพาะเลี้ยงและการตรึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวทนเค็ม
Aphanothece halophytica ในน้ำทะเล
สำหรับการผลิตไฮโดรเจน

CULTIVATION AND IMMOBILIZATION OF UNICELLULAR
HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece*
halophytica IN SEAWATER FOR HYDROGEN PRODUCTION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2561
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CULTIVATION AND IMMOBILIZATION OF UNICELLULAR
HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece*
halophytica IN SEAWATER FOR HYDROGEN PRODUCTION



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ACADEMIC YEAR 2018

หัวข้อโครงการพิเศษ

การเพาะเลี้ยงและการตรึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวทนเค็ม
Aphanothece halophytica ในน้ำทะเลสำหรับการผลิตไฮโดรเจน
Cultivation and immobilization of unicellular halotolerant
cyanobacterium *Aphanothece halophytica* in seawater
for hydrogen production

ชื่อนักศึกษา

นางสาวจิตติกาญจน์ วงศ์เกย รหัสนักศึกษา 58050868
นางสาวฐิติพร ลักขณาสถิตกุล รหัสนักศึกษา 58050879
นายณัฐรุวี เขตวันชัย รหัสนักศึกษา 58050880

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2561

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
(จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การเพาะเลี้ยงและการตรึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i> ในน้ำทะเลสำหรับการผลิตไฮโดรเจน
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจิตติกาญจน์ วงศ์เกย รหัสนักศึกษา 58050868 นางสาวฐิติพร ลักขณาสถิตกุล รหัสนักศึกษา 58050879 นายณัฐวรรี เขตวันชัย รหัสนักศึกษา 58050880
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกที่มีศักยภาพชนิดหนึ่งสำหรับอนาคต ไฮโดรเจนสามารถผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวทนเค็ม *Aphanothece halophytica* ในน้ำทะเลและการตรึงเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจน *A. halophytica* เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถเจริญเติบโตและทนต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจน จึงได้นำน้ำทะเลธรรมชาติที่เป็นสารละลายที่มีปริมาณน้ำมากที่สุดในโลกมาใช้เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* จากการทดลองพบว่า *A. halophytica* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำทะเลธรรมชาติ แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และปราศจากการเติมโซเดียมคลอไรด์ งานวิจัยนี้พบว่า การผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ในเซลล์อิสระภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบสองสภาวะ มีค่าสูงกว่าการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบหนึ่งสภาวะ สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *A. halophytica* เพื่อการผลิตไฮโดรเจน คือ การใช้อะการ์ที่ความเข้มข้นอะการ์ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นวัสดุตรึงและใช้ความเข้มข้นของเซลล์ 0.2 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร โดยให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 11.20 ± 2.06 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 95.15 ± 5.95 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอ ภายหลังการบ่มในน้ำทะเลธรรมชาติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่พบว่า เซลล์ตรึงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จำนวนทั้งสิ้น 3 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยง การตรึงเซลล์ การผลิตไฮโดรเจน น้ำทะเล ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม
 ไม่มีการเปิดเผย | ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

Title	Cultivation and immobilization of unicellular halotolerant cyanobacterium <i>Aphanothece halophytica</i> in seawater for hydrogen production	
Students	MissJittikarn Wongkoei	Student ID 58050868
	MissTitiporn Lakkanasatitkul	Student ID 58050879
	Mr.Natrawee Khetwunchai	Student ID 58050880
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2018	
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch	

Abstract

Hydrogen (H₂) is an alternative potential energy carrier for the future. It can be produced by the different kinds of microorganisms such as bacteria, green algae and cyanobacteria. This work aimed to investigate the cultivation of unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* in seawater and the immobilization of cells for H₂ production. *A. halophytica* is a halotolerant cyanobacterium that is able to grow and tolerate at high NaCl concentrations. In order to reduce cost of cultivation and H₂ production, natural seawater as the most abundant aqueous solution on the earth, was utilized as a culture medium for growth and H₂ production of *A. halophytica*. The result showed that *A. halophytica* could not grow in natural seawater but could grow in seawater supplemented with 1.76 mM NaNO₃ and without addition of NaCl. In this study, H₂ production by free cells of *A. halophytica* under two-stage condition was higher than that under one-stage condition. The optimization conditions of cell immobilization of *A. halophytica* for H₂ production were using 3 % (w/v) agar concentration as support material and 0.2 mg dry cell weight mL⁻¹ of cell concentration. They gave the highest H₂ production rate of 11.20±2.06 nmol H₂ mg chl a⁻¹ h⁻¹ and the maximum H₂ production yield of 95.15±5.95 nmol H₂ mg chl a⁻¹ after incubation in natural seawater for 24 h. H₂ production by agar-immobilized cells in natural seawater could be detected for 3 cycles.

Keywords : Cultivation, Cell immobilization, H₂ production, Seawater, Halotolerant cyanobacteria

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของงานวิจัยที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกท่าน ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกฤษ์ ที่คอยให้คำปรึกษาดูแลอย่างใกล้ชิด ตลอดการดำเนินงานรวมทั้งให้ความรู้และให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษและ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการสอบโครงการพิเศษ ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ พี่นุ้ย พี่กันย์ พี่เบล พี่ตรีม และพี่เอ็ม ที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทดลองจนโครงการพิเศษฉบับนี้ผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ให้ได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจ เป็นแรงผลักดันในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ รวมถึงเพื่อนๆ และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมาในที่นี้ด้วย

ทั้งนี้ผู้จัดทำหวังว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ให้แก่ผู้ที่ได้ศึกษา สามารถนำไปเป็นแนวทางประยุกต์ใช้และต่อยอดให้เกิดผลสำเร็จได้ไม่มากนักน้อ

จิตติกาญจน์ วงศ์เกย
ฐิติพร ลักขณาสถิตกุล
ณัฐรวิ เขตวันชัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	4
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ไฮโดรเจนและคุณสมบัติของไฮโดรเจน.....	5
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	6
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำจากก๊าซชีวภาพ.....	6
2.2.2 การแยกสลายโมเลกุลของน้ำโดยไฟฟ้า.....	6
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ.....	7
2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย.....	7
2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย.....	8
2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	8
2.4.2 รังควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง.....	10
2.4.3 การสืบพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย.....	10
2.5 ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i>	11
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย.....	12
2.7 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเล.....	12
2.8 การตรึงเซลล์.....	13
2.8.1 รูปแบบของการตรึงเซลล์.....	12
2.8.2 วัสดุตรึง.....	14
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15

เอกสาร**บทที่ 3**วิธีการดำเนินงานวิจัย การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 17
 3.1 ใช้อัลลิ้นทรีที่ใช้ในโครงการพิเศษและต้องอ้างถึงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีฉบับใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	17
3.3 สารเคมี.....	17
3.3.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	17
3.3.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์.....	18
3.3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ.....	18
3.3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน.....	18
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	18
3.5 วิธีการทดลอง.....	19
3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม <i>A. halophytica</i>	19
3.5.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโต.....	19
3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน.....	20
3.5.4 วิธีการศึกษาการเพาะเลี้ยง <i>A. halophytica</i> ในน้ำทะเล.....	21
3.5.5 วิธีการศึกษาผลของการปรับตัวของเซลล์อิสระในน้ำทะเลที่มีการแปรผัน ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท.....	22
3.5.6 วิธีการตรึงเซลล์.....	23
3.5.7 วิธีการศึกษาผลของความสามารถของวัสดุตรึงอะการ์.....	24
3.5.8 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์.....	24
3.5.9 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่.....	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	25
4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม <i>A. halophytica</i> ที่ เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลเปรียบเทียบกับในอาหาร BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	25
4.2 ผลของไนเตรทต่อการเจริญของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล.....	27
4.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงใน น้ำทะเล.....	29
4.4 ผลของการปรับตัวในอาหารที่ปราศจากไนเตรทต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระ ของ <i>A. halophytica</i>	31
4.5 ผลของชนิดวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง <i>A. halophytica</i>	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับของวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 4.6 ผลของความเข้มข้นของอะการ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*..... 34
 ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

4.7 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง <i>A. halophytica</i>	36
4.8 การนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i> กลับมาใช้ใหม่.....	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	39
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	39
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	40
เอกสารอ้างอิง.....	41
ภาคผนวก.....	46
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	47
ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบ.....	49
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	54



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปริมาณการใช้พลังงานเชื้อเพลิงในอดีตและในอนาคตของประเทศไทย	5
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์	8
2.3 โครงสร้างเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย.....	10
2.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i> ที่มีกำลังขยายภาพ 400 เท่า.....	11
4.1 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (B) และจำนวนเซลล์ทั้งหมด (C) ของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	26
4.2 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (B) และจำนวนเซลล์ทั้งหมด (C) ของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4, 35.2 มิลลิโมลาร์เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	28
4.3 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (B) และจำนวนเซลล์ทั้งหมด (C) ของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 และ 3 โมลาร์ และเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	30
4.4 การผลิตไฮโดรเจนในระบบ One-stage จากเซลล์อิสระของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล มีหน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร (A) และนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (B) เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	32
4.5 การผลิตไฮโดรเจนในระบบ Two-stage จากเซลล์อิสระของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล มีหน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร (A) และนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (B) เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	33
4.6 การผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ <i>A. halophytica</i> ที่ตรึงด้วยวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ในระบบ Two-stage โดยนำไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ มาปรับตัวในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์อิสระ..	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง <i>A. halophytica</i> ที่แปรผันความเข้มข้นของอะการ์ที่ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และนำมาปรับตัวในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ₀ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	35
4.8 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ ได้แก่ 0.2, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบ Two-stage ของไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และนำมาปรับตัวในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ₀ เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	37
4.9 ผลของการนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i> กลับมาใช้ใหม่ต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบ two-stage โดยไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และนำมาปรับตัวในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทเปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ₀ เสริมด้วย Turk Island salt solution...	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ข-1 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในระบบ Two-stage จากเซลล์อิสระของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution.....	49
ข-2 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของชนิดวัสดูตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท.....	50
ข-3 ผลการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของความเข้มข้นของอะการ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท.....	51
ข-4 ผลของการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท.....	52
ข-5 การนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i> กลับมาใช้ใหม่.....	53
ค-1 ผลของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ <i>A. halophytica</i> ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution...	54
ค-2 ผลของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ <i>A. halophytica</i> ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution...	55
ค-3 ผลของของค่าการดูดกลืนแสงของ <i>A. halophytica</i> ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution...	55
ค-4 ผลของของค่าการดูดกลืนแสงของ <i>A. halophytica</i> ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution...	56
ค-5 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ <i>A. halophytica</i> ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution...	56
ค-6 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ <i>A. halophytica</i> ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution...	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่

หน้า

- ค-7 ผลของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution... 57
- ค-8 ผลของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution... 58
- ค-9 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution..... 58
- ค-10 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution..... 59
- ค-11 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution..... 59
- ค-12 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution..... 60
- ค-13 ผลของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในระบบ Two-stage จากเซลล์อิสระของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution.....60
- ค-14 ผลของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของชนิดวัสดูดตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *A. halo-phytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิล เอ..... 61
- ค-15 ผลของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของความเข้มข้นของอะการ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *A. halo-phytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท มีหน่วย

เอกสารนี้เป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอเท่านั้น ไม่อนุญาตให้วงไปใช้ประโยชน์ 62 การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค-16 ผลของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ.....	63



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบัน พลังงานเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของประชากรมนุษย์ทุกคนบนโลก ทั้งในด้านการดำรงชีวิต เกษตรกรรม ตลอดจนอุตสาหกรรมต่างๆ จากการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม และการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร ทำให้ความต้องการพลังงานในด้านเศรษฐกิจ สังคม รวมถึงการใช้พลังงานในชีวิตประจำวันเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (Jangiam, 2010) พลังงานที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยเฉพาะถ่านหินและน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งเป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วหมดไป อีกทั้งการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้ยังมีผลกระทบต่อระบบนิเวศและมลภาวะของโลก ได้แก่ การทำลายโอโซนบนชั้นบรรยากาศและการเกิดปรากฏการณ์เรือนกระจกจนนำไปสู่ภาวะโลกร้อน (Phunpruch *et al.*, 2016) ประเทศไทยมีปริมาณน้ำมันดิบไม่เพียงพอจึงมีความจำเป็นต้องนำเข้า ซึ่งนับวันน้ำมันดิบในตลาดโลกก็ยังมีราคาสูงขึ้น มีรายงานพบว่า ในเดือนมกราคมถึงมีนาคม ปี พ.ศ. 2562 ประเทศไทยมีมูลค่าการนำเข้าน้ำมันดิบรวม 998 พันบาร์เรลต่อวัน หรือคิดเป็น 14,287 ล้านลิตร (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2562) และมีแนวโน้มการนำเข้าน้ำมันดิบที่จะเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ดังนั้น หน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องจึงมีความพยายามในการแสวงหาพลังงานทางเลือกใหม่ในรูปแบบต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด สามารถทดแทนพลังงานที่ใช้ในปัจจุบันได้ และหมุนเวียนได้อย่างเพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์ในปัจจุบันและอนาคต พลังงานทางเลือกที่น่าสนใจ ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานขยะ พลังงานจากมวลชีวภาพ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

พลังงานทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจคือ พลังงานจากไฮโดรเจน (H_2 energy) เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนประกอบด้วยไฮโดรเจนอะตอม (H) 2 อะตอม และไฮโดรเจนอะตอมก็เป็นสสารที่มีอยู่มากที่สุดบนโลก พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นแหล่งพลังงานในอุดมคติสำหรับอนาคต (Tantavichet, 2010) เป็นพลังงานสะอาด มีประสิทธิภาพ จัดเป็นสื่อพลังงาน (Energy carrier) และสามารถใช้เป็นระบบพลังงานที่ถาวรและยั่งยืนได้ (Sherif *et al.*, 2003) การใช้พลังงานไฮโดรเจนนั้นจะช่วยลดการสร้างก๊าซพิษ เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO), คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂), สารประกอบไนโตรเจนออกไซด์ (NO_x), สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (VOCs), สารประกอบซัลเฟอร์ออกไซด์ (SO_x), ก๊าซไฮโดร-คาร์บอนอื่นๆ ได้ (Wanchanthuek, 2011) ไฮโดรเจนมีความสำคัญต่อภาคอุตสาหกรรมอย่างมาก เพราะว่าไฮโดรเจนสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์แอมโมเนีย แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ เป็นส่วนประกอบของน้ำมันปิโตรเลียม และน้ำมันที่ใช้บริโภค ในปัจจุบัน ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากแหล่งที่มาหลายชนิด เช่น น้ำ เชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน ชีวมวล ไฮโดรเจนซัลไฟด์ โบโร-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลังงานในการแยกไฮโดรเจนออกจากแหล่งผลิตดังกล่าว โดยพลังงานที่ใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ พลังงานความร้อน พลังงานไฟฟ้า พลังงานแสง และพลังงานชีวเคมี (Dincer *et al.*, 2013) ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการทางกายภาพและกระบวนการทางชีวภาพ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น การผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (Steam reforming) และการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis) เป็นต้น แต่การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการดังกล่าวมีอุปสรรคคือ ใช้สารตั้งต้นที่มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลและใช้พลังงานในการผลิตสูงมาก อีกทั้งยังปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biohydrogen production) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ก่อให้เกิดมลพิษ ของเสียจากกระบวนการทางชีวภาพสามารถบำบัดและกำจัดได้ง่าย (Nueangmee *et al.*, 2014) สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น

ในช่วงไม่กี่ทศวรรษที่ผ่านมา การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้น ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จาก 3 กระบวนการ คือ (1) การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Hydrogen production by photosynthesis) เป็นการใช้พลังงานแสงสลายโมเลกุลของน้ำเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน อิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการสลายโมเลกุลของน้ำจะไปรวมตัวกับโปรตอนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน (Phunpruch *et al.*, 2016) (2) การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักในสภาวะไม่มีแสง (Hydrogen production by dark fermentation) โดยไซยาโนแบคทีเรียจะเกิดกระบวนการหมักสารชีวโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดรตเพื่อผลิตไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ บางชนิดสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ (Organic compounds) เช่น กรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acids) และ แอลกอฮอล์ เป็นต้น (Ding *et al.*, 2016) (3) การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Hydrogen production by N₂-fixation) จะเกิดในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น เช่น ไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ (Heterocystous cyanobacteria) การผลิตไฮโดรเจนจะเกิดในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน (Diazotrophic conditions) เป็นหลัก ซึ่งได้ไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ (by-product) ของปฏิกิริยา (Kosourov *et al.*, 2017) ถึงแม้ว่าไฮโดรเจนที่ผลิตจากไซยาโนแบคทีเรียจะมีปริมาณต่ำกว่าปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการทางกายภาพ (Khanna and Lindblad, 2015) แต่การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยไซยาโนแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบคือ มีการลงทุนและความต้องการพลังงานที่ต่ำกว่า (Kufryk, 2013) มีรายงานวิจัยพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (Heterocystous filamentous cyanobacteria) เช่น *Anabaena cylindrica* และ *Nostoc muscorum* กลุ่มไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (Non-heterocystous filamentous cyanobacteria)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น *Oscillatoria sp.*, *Spirulina platensis* และ *Plectonema boryanum* และกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียอื่นๆ ทั้งนี้หากมีเหตุขัดแย้งหรือข้อสงสัยใดๆ กรุณาติดต่อผู้จัดทำเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียเซลล์เดียว (Unicellular cyanobacteria) เช่น *Synecho-coccus* sp. และ *Anacystis nidulans* (Dawar. et al. 2006)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้ 3 ชนิด ดังนี้ (1) เอนไซม์ไนโตรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศแล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียและได้ไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ (2) เอนไซม์อัปเดตไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่ช่วยลดการสะสมไฮโดรเจนที่สร้างมาจากเอนไซม์ไนโตรจีเนส และ(3) เอนไซม์ไบโอเดรอกซันนอลไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่เร่งทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของไฮโดรเจน (Tamagnini et al., 2002)

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวทนเค็ม *Aphanothece halophytica* ซึ่งมีรายงานวิจัยพบว่า เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงผ่านกระบวนการหมักและสลายไกลโคเจนที่สะสมไว้ภายในเซลล์ในสถานะไม่มีแสงและขาดออกซิเจน ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีกลุ่มของยีน *hox* ซึ่งถูกถอดและแปลรหัสไปเป็นเอนไซม์ไบโอเดรอกซันนอลไฮโดรจีเนส มีรายงานพบว่ายีน *hox* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 5 ยีน คือ *hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY* และ *hoxH* (Taikhao et al., 2013) นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ยังมีคุณสมบัติในการทนเค็ม ซึ่งสามารถทนความเค็มได้ถึง 3 โมลาร์ (Takabe. et al. 1986) จึงนำคุณสมบัตินี้มาใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในน้ำทะเลแทนการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต อย่างไรก็ตาม น้ำทะเลยังขาดสารอาหารและแร่ธาตุบางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* อยู่ จากการศึกษาพบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถเจริญเติบโตได้หากเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรท (Taikhao et al., 2015) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาปัจจัยในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในน้ำทะเล และผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล นอกจากนี้ยังสนใจศึกษาการตรึงเซลล์ (Cell immobilization) ใน *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลเพื่อผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากกระบวนการตรึงเซลล์สามารถทำให้เซลล์ยึดอายุในระยะพักตัวให้นานขึ้น สามารถแลกเปลี่ยนสารเข้าออกได้ง่าย นอกจากนี้ ยังช่วยให้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นและป้องกันการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น และที่สำคัญ การตรึงเซลล์ยังช่วยในการนำเซลล์กลับมาผลิตไฮโดรเจนได้หลายๆ ครั้ง (Kosourov et al., 2017) ในการตรึงเซลล์นั้นมีปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี เช่น ชนิดของวัสดุตรึง ความเข้มข้นของวัสดุตรึง และความหนาแน่นของเซลล์ เป็นต้น ที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในน้ำทะเล
- 2) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในน้ำทะเลสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในน้ำทะเลโดยเก็บน้ำทะเลมาจากหาดเตยงาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี จากนั้นนำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มาเพาะเลี้ยงในน้ำทะเล และอาหารสังเคราะห์ โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 และ 3.0 โมลาร์ จากนั้น วัดการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สำหรับการผลิตไฮโดรเจน โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา ดังนี้ ชนิดของวัสดุตรึง ได้แก่ อะการ์ อะกาโรส และแคลเซียมอัลจิเนต ความเข้มข้นวัสดุตรึง ได้แก่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเซลล์ ได้แก่ 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 3 การนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* กลับมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนใหม่

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถใช้น้ำทะเลในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* แทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์
- 2) สามารถผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล

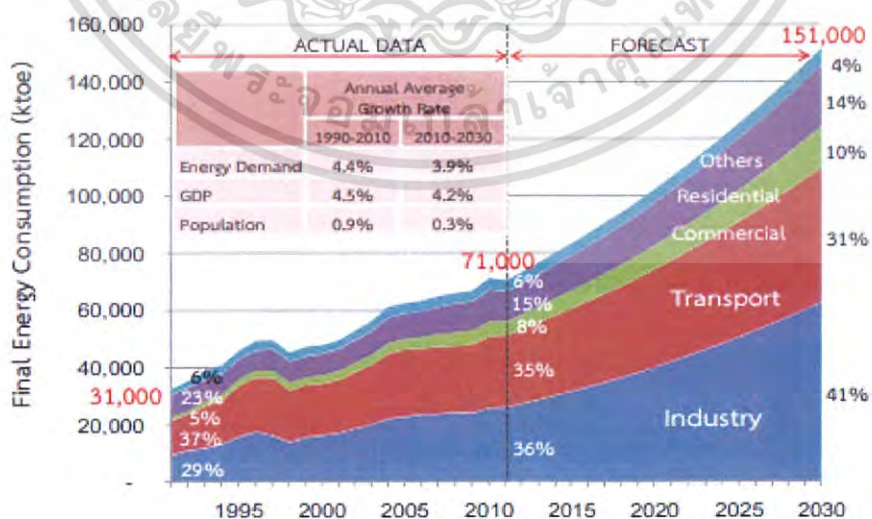
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจนและคุณสมบัติของไฮโดรเจน

ปัจจุบัน ความต้องการพลังงานเพื่อการตอบสนองต่อความต้องการของมนุษย์ในชีวิตประจำวัน มีมากขึ้นทุกๆ ปี และคาดว่าในอนาคต ความต้องการพลังงานทั่วโลกจะเพิ่มขึ้นมากถึงสองเท่า (Maness *et al.*, 2009) โดยเฉพาะประเทศไทย มีความต้องการพลังงานเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อ้างอิงจากผลการรายงานของกระทรวงพลังงานของประเทศไทย พบว่าการใช้พลังงานในประเทศไทย ในปีค.ศ. 2010 อยู่ที่ 71,000 พันตันน้ำมันดิบ และคาดว่าในปีค.ศ. 2030 การใช้พลังงานในประเทศไทยจะเพิ่มสูงถึง 151,000 พันตันน้ำมันดิบ (Ministry of energy, 2011) (รูปที่ 2.1) ในปัจจุบัน แหล่งเชื้อเพลิงที่นิยมใช้มาจาก ถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม และก๊าซธรรมชาติ ซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในฐานะแหล่งพลังงานหลักของโลก แต่อย่างไรก็ตาม แหล่งเชื้อเพลิงเหล่านี้ย่อมมีวันหมดไป เนื่องจากปัจจัยทางด้านทรัพยากรที่มีอยู่อย่างจำกัด อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการปล่อยก๊าซเรือนกระจก เช่น ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Ni *et al.*, 2006) ปริมาณของก๊าซเรือนกระจกเหล่านี้ที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลให้อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น และเกิดภาวะโลกร้อน (Sakurai and Masukawa, 2017) ดังนั้น จึงต้องอาศัยความรู้ เทคโนโลยี และนวัตกรรมในการพัฒนาการผลิตพลังงานสะอาดและยั่งยืนจากธรรมชาติ ซึ่งได้แก่ พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานชีวมวล และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น



รูปที่ 2.1 ปริมาณการใช้พลังงานเชื้อเพลิงในอดีตและในอนาคตของประเทศไทย (Ministry of energy, 2011) อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

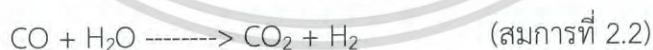
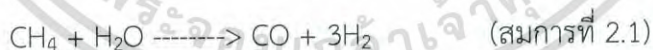
พลังงานไฮโดรเจน เป็นแหล่งพลังงานในอุดมคติสำหรับอนาคตที่จะช่วยลดการสร้างก๊าซพิษต่างๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สารประกอบซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจนประกอบไปด้วยอะตอมของไฮโดรเจนที่ประกอบไปด้วยนิวเคลียส โดยภายในนิวเคลียสประกอบไปด้วยโปรตอนและนิวตรอน ที่มีอิเล็กตรอนวิ่งอยู่รอบนอก ไฮโดรเจนยังเป็นสสารที่สามารถพบได้มากที่สุดในโลก เช่น ในโมเลกุลของน้ำ สารประกอบอินทรีย์ และสารประกอบอนินทรีย์ และสามารถทำปฏิกิริยาต่อคาร์บอน ไนโตรเจน และออกซิเจนในปฏิกิริยาเคมี ที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะความดันชั้นบรรยากาศ อะตอมของไฮโดรเจนจำนวน 2 อะตอมจะรวมกันเป็นโมเลกุลไฮโดรเจนในรูปของก๊าซ ในบรรยากาศในโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 พีพีเอ็ม ทั้งนี้ไฮโดรเจนสามารถพบได้ 3 สถานะ คือ สถานะของแข็งที่มีโครงสร้างเป็นผลึก 6 เหลี่ยม สถานะของเหลวที่มีค่าความหนืดต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว และสถานะก๊าซที่มีความหนาแน่น 0.0899 กรัม

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กระบวนการ คือ

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำจากก๊าซชีวภาพ

การรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำของก๊าซธรรมชาติที่ได้จากเชื้อเพลิงประเภทฟอสซิล เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เป็นที่ยอมรับในระดับอุตสาหกรรม โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี 2 ขั้นตอน โดนปฏิกิริยาแรก ก๊าซมีเทนที่ได้จากถ่านน้ำมันปิโตรเลียมที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะทำปฏิกิริยากับน้ำในรูปของไอน้ำภายใต้อุณหภูมิสูง (7,000-1,000 องศาเซลเซียส) โดยมีคาร์บอนมอนอกไซด์และไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (สมการที่ 2.1) จากนั้น เข้าสู่ปฏิกิริยาที่ 2 คือ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์จะทำปฏิกิริยากับน้ำในรูปของไอน้ำภายใต้อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เพื่อผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (สมการที่ 2.2) (Ni *et al.*, 2006)



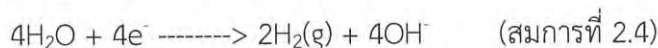
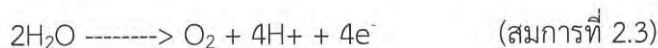
2.2.2 การแยกสลายโมเลกุลของน้ำโดยไฟฟ้า

การแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกโมเลกุลของน้ำโดยตรง เพื่อให้ได้ไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยอาศัยอิเล็กโทรด 2 ขั้วที่ตรงข้ามกันได้แก่ อิเล็กโทรดขั้วบวกและอิเล็กโทรดขั้วลบ โดยในปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดที่อิเล็กโทรดขั้วบวกที่จะเปลี่ยนโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นก๊าซออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน (สมการที่ 2.3) และใน

ปฏิกิริยารีดักชันจะเกิดที่อิเล็กโทรดขั้วลบ โดยอาศัยอิเล็กตรอนในการแยกน้ำให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไฮโดรเจนได้ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย(สมการที่ 2.4)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากชีวภาพหรือกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ที่ต่างกันในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีอยู่หลายชนิด เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียวที่อาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงและน้ำเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน และในไซยาโนแบคทีเรีย บางชนิดที่อาศัยกระบวนการหมักและกระบวนการตรึงไนโตรเจนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ทั้งนี้ การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เป็นกระบวนการผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีข้อจำกัดด้านความสามารถในการผลิตภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงต้องอาศัยการวิจัยและพัฒนาเพื่อการผลิตไฮโดรเจนให้ได้มากขึ้นต่อไป (Ni *et al.*, 2006)

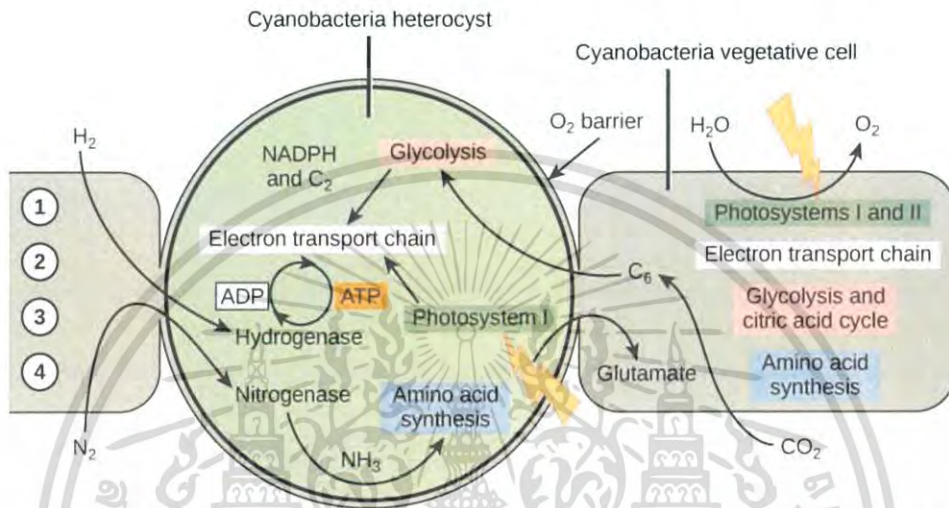
2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียหรือที่รู้จักกันในชื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จัดเป็นโปรคาริโอตที่มีความสามารถในการสังเคราะห์โดยใช้ระบบแสง 2 ระบบ คือ ระบบแสง I และระบบแสง II เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน โดยมีไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ของปฏิกิริยา ไซยาโนแบคทีเรียสามารถแบ่งประเภทตามความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้เป็น 2 ชนิด คือ ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้เนื่องจากมีเฮเทอโรซิสต์ และไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเนื่องจากไม่มีเฮเทอโรซิสต์ โดยไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่แตกต่างกันไป

ไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยอาศัยการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ จะพบระบบแสง I และสามารถตรึงไนโตรเจนผ่านเอนไซม์ไนโตรจีเนส ทำให้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายในสภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องจากเฮเทอโรซิสต์มีชั้นผนังหนา สามารถป้องกันออกซิเจนเข้ามาภายในเซลล์ เนื่องจากออกซิเจนเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสมีหน้าที่รีดิวซ์ไนโตรเจนจากบรรยากาศเป็นแอมโมเนียและไฮโดรเจน ซึ่งการรีดิวซ์พลังงานในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนได้มาจากการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมไว้ในเฮเทอโรซิสต์ แต่ในสภาวะที่มีไนโตรเจนอยู่อย่างจำกัด การตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นพร้อมกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการผลิตกรดกลูตามีน เพื่อใช้กรดกลูตามีนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเซลล์ปกติ (รูปที่ 2.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ สำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง โดยอาศัยเอนไซม์ไฮโดรเจนโซลไฮโดรจีเนส ที่มีประสิทธิภาพในการทำงานได้สูงเมื่ออยู่ในสภาวะปราศจากแสงและออกซิเจน และในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด จะพบการสะสมไกลโคเจนในเซลล์ และยังสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยตรง (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์

ที่มา : <https://www.texasgateway.org/resource/science-practice-challenge-questions19>

2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย (วิณา, 2559)

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่ถูกกำเนิดขึ้นบนโลกใบนี้ โดยมีการค้นพบหลักฐานจารึกค้นพบซากโบราณ (Fossil) ของแบคทีเรียในหินที่ตกตะกอนที่อยู่ในทะเล นักธรณีวิทยาคาดว่ามีความอายุประมาณ 3,500 ล้านปี และยังคงมีชีวิตยาวนานมาจนถึงทุกวันนี้

2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ไซยาโนแบคทีเรีย จัดอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีสารพันธุกรรมกระจายอยู่ทั่วในเซลล์ (รูปที่ 2.3) มีโครงสร้างเซลล์แบบเรียบง่าย รูปร่างเซลล์เดี่ยว กลุ่มเซลล์ หรือเซลล์เรียงต่อกันเป็นแถวยาวลักษณะเรียกว่า ไตรโคม และมีชั้นเมือกหุ้มรอบไตรโคม ซึ่งเรียกรวมในส่วนของไตรโคมและส่วนเมือกนี้ว่า ฟิลาเมนต์ ใน 1 ฟิลาเมนต์อาจมี 1 ไตรโคมหรือหลายไตรโคมก็ได้ ฟิลาเมนต์บางชนิดมีรูปร่างซับซ้อนสามารถแตกแขนงได้ อาจมีการแตกแขนงแบบแขนงแท้หรือแบบแขนงเทียม

ชั้นเมือกของไซยาโนแบคทีเรีย จะเป็นชั้นที่หุ้มผนังเซลล์ชั้นนอก ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ และช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์แบบ Gliding เนื่องจากชั้น S-Layer และชั้น Oscillin จะจับเมือก ออกมาจากเยื่อหุ้มชั้นนอกของผนังเซลล์ โดยชั้นเมือกสามารถบ่งบอกแหล่งกำเนิดของไซยาโนแบคทีเรียได้ เช่น ถ้าพบว่าชั้นเมือกมีสีแดง บ่งบอกถึงแหล่งกำเนิดมีความเป็นกรดสูง สีน้ำเงินบ่งบอกถึงแหล่งกำเนิดภายในดินทั่วไป และชั้นเมือกสีน้ำตาลหรือสีเหลือง บ่งบอกถึงแหล่งกำเนิดมีความเค็มสูง ใจกลางโพรทอพลาสซึมของไซยาโนแบคทีเรียพบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงกลม ไม่มีโปรตีนฮิสโตนเป็นองค์ประกอบ โพรทอพลาสซึมรอบนอกประกอบด้วยไทลาคอยด์ที่มีเม็ดไฟโคบิลิโซโซมเรียงอยู่บนถุงไทลาคอยด์ เม็ดไกลโคเจน ไรโบโซมขนาด 70S กระจายอยู่ทั่วเซลล์

ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจะมีลักษณะคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นเปปติโดไกลเคนอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ มีพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาล N-Acetylglucosamine, N-Acetylmuramic acid และกรดอะมิโนที่แตกต่างกันหลายชนิด ถัดจากชั้นเปปติโดไกลเคนเป็นชั้นของเพอร์ริพลาสซึม ที่มีเส้นใยเปปติโดไกลเคนเรียงกันหลวมๆ และหุ้มด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอก

ไซยาโนไฟซินแกรนูล ภายในมีไนโตรเจนสะสมอยู่ในรูปพอลิเปปไทด์ของกรดแอสพาติก และอาร์จินีน สามารถพบไซยาโนไฟซินแกรนูลในช่วงระยะการเจริญจนถึงระยะการเจริญคงที่ของไซยาโนแบคทีเรีย

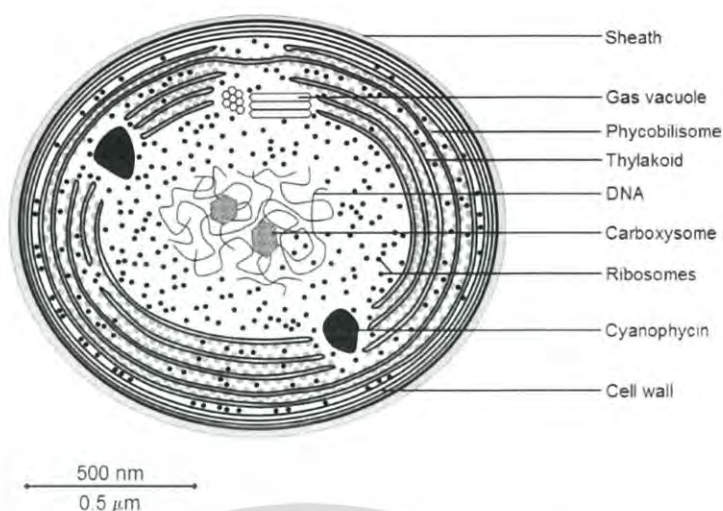
คาร์บอกซิโซมในไซยาโนแบคทีเรียสามารถพบได้ในบริเวณใจกลางของเซลล์ เป็นแหล่งที่อยู่ของเอนไซม์ไรบูโลส-1-5-บิสฟอสเฟส คาร์บอกซิเลส/ออกซิจีเนส แต่ไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์จะไม่มีเอนไซม์ดังกล่าว

แก๊สแควคิลโอล ประกอบด้วยแก๊สเวซิเคิล มีลักษณะเป็นท่อยาวหลายท่อ ส่วนปลายเป็นรูปกรวย สามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียทุกอันดับ ยกเว้น *Chamaesiphonales* เยื่อหุ้มของแก๊สคิลโอลมีคุณสมบัติให้แก๊สผ่านเข้าออกได้ เพื่อรักษาสมดุลของแก๊สกับน้ำมันภายในเซลล์

พอลิฟอสเฟตบอดีจะมีรูปร่างกลมคล้ายเม็ดไขมัน เป็นบริเวณที่มีการสะสมฟอสเฟต ไม่พบโครงสร้างชนิดนี้ในเซลล์ที่เจริญในแหล่งอาหารที่ขาดฟอสเฟตและเซลล์ที่มีอายุน้อย

พอลิกลูแคนแกรนูล พบในช่องว่างระหว่างไทลาคอยด์ มีคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส 14-16 โมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : <http://cronodon.com/BioTech/Cyanobacteria.html>

2.4.2 รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

ไซยาโนแบคทีเรียมีความสามารถในการดูดซับพลังงานแสงสำหรับการสังเคราะห์แสงภายในเซลล์ โดยรงควัตถุหลักคือ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน

คลอโรฟิลล์ เอ มีบทบาทสำคัญต่อปฏิกิริยาของกระบวนการสังเคราะห์แสง สามารถดูดซับแสงสีแดงและแสงสีน้ำเงิน จะอยู่ภายในเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ที่เป็นศูนย์กลางของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง

สารสีแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย จะพบว่าเป็นชนิดเบต้าแคโรทีน และมิกโซแซนโทฟิลล์

สารสีไฟโคบิลินที่รวมอยู่กับโปรตีนนี้จะเรียกว่า ไฟโคบิลิโปรตีน และรวมกลุ่มเป็นเม็ดเล็กๆ เรียงกันอยู่บนผิวชั้นนอกของเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ มี 4 ชนิด คือ ซีไฟโคไซยานิน แอลโลไฟโคไซยานิน ซีไฟโคอิริทริน และไฟโคอิริโทรไซยานิน ซึ่งในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดจะพบ ซีไฟโคไซยานิน และแอลโลไฟโคไซยานิน ส่วนสารสีชนิด ซีไฟโคอิริทริน และไฟโคอิริโทรไซยานิน จะพบในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด

2.4.3 การสืบพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนี้

1. การแบ่งเซลล์ พบในพวกเซลล์เดี่ยว เช่น *Chroococcus* หรือกลุ่มเซลล์ เช่น

Anacystis เอกสารนี้จัดทำขึ้นเพื่อสนับสนุนการดำเนินงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

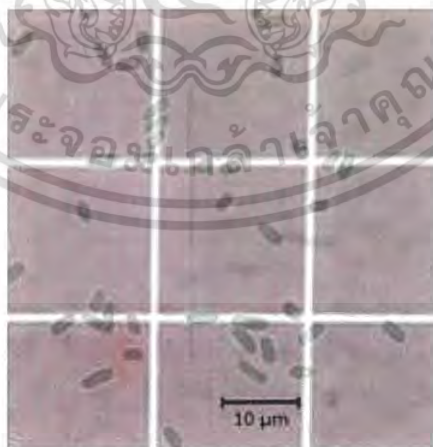
2. การสร้างฮอริโมโกเนีย พบในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายฮอริโมโกเนีย เกิดจากไตรโคมที่หักเป็นท่อนสั้นๆ และท่อนที่หักเคลื่อนที่แบบ Gliding เพื่อเจริญเป็นเส้นสายใหม่ต่อไป

3. อะคินีท พบในไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นฟิลาเมนต์ เซลล์จะสร้างผนังหนาและเกิดการสะสมอาหารมากขึ้น เพื่อใช้ในการแบ่งโปรโตพลาสต์ เช่น *Anabaena*

4. สปอร์ พบในไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม ไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ เช่น *Dermocarpa* และไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเอกโซสปอร์ เช่น *Chamaesiphon*

2.5 ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

Aphanothece halophytica เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดี่ยวทนเค็ม มีลักษณะเป็นรูปทรงรีหรือทรงกระบอก แบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีผนังเซลล์หนาและมีขนาดของเซลล์อยู่ระหว่าง 2-10 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.4) ลักษณะที่สำคัญของ *A. halophytica* คือ เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 3 โมลาร์ และสามารถเจริญได้ดีที่สุดในช่วง 0.5 - 1.0 โมลาร์ (Takabe *et al.*, 1988) เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ ป้องกันการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ที่ส่งผลทำให้เซลล์เหี่ยวและทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมหยุดชะงัก นอกจากนี้ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2, 3 และ 4 โมลาร์ พบว่า *A. halophytica* มีค่า Doubling time เท่ากับ 14.5, 18 และ 30 ชั่วโมงตามลำดับ และพีเอชสำหรับการเจริญคือประมาณที่ 7.0 - 7.8 (Tindall *et al.*, 1978)



รูปที่ 2.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่มีกำลังขยายภาพ 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย มีปัจจัยหลากหลายประการที่ต้องคำนึง ดังนี้

1. ชนิดของสาหร่าย ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และมีความสามารถเฉพาะตัว เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีกระบวนการเมแทบอลิซึมของการตรึงไนโตรเจนและการสังเคราะห์แสงที่แตกต่างกันออกไป (Hall *et al.*, 1995)

2. ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น องค์ประกอบของอาหารและแร่ธาตุ ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน (Dutta *et al.*, 2000; Weissman and Benemann, 1977) ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน (Shah *et al.*, 2001) ปริมาณซิลเฟออร์ (Antal and Lindblad, 2005) ความเข้มแสง อุณหภูมิ และความเป็นกรดต่าง เป็นต้น

2.7 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเล

โดยปกติแล้ว น้ำทะเลประกอบด้วยองค์ประกอบต่างๆ มากกว่า 50 ชนิดและสารประกอบอินทรีย์จำนวนมาก (Harrison and Berge, 2005) โดยมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ คลอรีน แมกนีเซียม ซัลเฟออร์ (เช่น ซัลเฟต) แคลเซียมและโพแทสเซียม ซึ่งมีอยู่ 99.28 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) (3.317×10^4 พีพีเอ็ม) ของเกลือที่ละลายในมหาสมุทร และมีองค์ประกอบหลักคือ โซเดียมและคลอไรด์ โดยมีอยู่มากกว่า 8528 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) องค์ประกอบรองคือ โบรมีน คาร์บอน ไนโตรเจน สตรอนเทียม โบรอน ออกซิเจน ซิลิคอนและฟลูออรีน ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1.3 พีพีเอ็ม ถึง 67 พีพีเอ็ม นอกจากนี้ ยังมีองค์ประกอบอื่นๆอีกเพียง 0.4 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดในน้ำทะเล

จากการศึกษาวิจัยที่มีการใช้ประโยชน์จากน้ำทะเลสำหรับการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย พบว่า การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและผลิตชีวมวลค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์ ดังนั้น การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเลจึงทำได้ค่อนข้างยาก มีรายงานพบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya majuscula* (Ahem *et al.*, 2007), *Oscillatoria* sp. Miami BG7 (Mitsui *et al.*, 1983) และ *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (Punshon and Moore, 2008) สามารถเจริญเติบโตและผลิตไฮโดรเจนเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยแร่ธาตุและสารอาหารบางอย่าง อีกทั้งยังพบการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวบางชนิดในทะเล เช่น *Platymonas subcordiformis* (Guana *et al.*, 2004) และ *Chaetomorpha* sp. GAF99 (Saeed and Ibrahim, 2012)

2.8 การตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ คือ การจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือทำให้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยที่เซลล์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน (Karel *et al.*, 1985) และไม่ว่าวิธีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถนำเซลล์กลับมาเวียนใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง วัตถุประสงค์ของการตรึงเซลล์ คือ การยืดอายุของเซลล์ในระยะที่มีการพักตัวให้นานขึ้น ซึ่งจะส่งผลดีต่อกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์และการนำเซลล์กลับมาใช้งานใหม่

2.8.1 รูปแบบของการตรึงเซลล์

2.8.1.1 การตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับ (Adsorption)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและมีราคาถูก เนื่องจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาติส่วนใหญ่ไม่ได้อยู่อาศัยอย่างอิสระ มักจะเจริญอยู่บนผิวของของแข็ง เช่น จุลินทรีย์ที่อยู่บนดิน จุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ และ *Rhizobium* ที่อยู่ในบมรากของพืชตระกูลถั่ว เป็นต้น วิธีการตรึงเซลล์รูปแบบนี้เป็นการนำจุลินทรีย์หรือสปอร์มาตรึงบนผิวของวัสดุตรึง โดยบรรจุวัสดุตรึงเข้าไปในคอลัมน์ แล้วปล่อยให้สารละลายเซลล์แขวนลอยไหลผ่าน จนกระทั่งจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารที่ไหลออกมามีค่าคงที่ หรืออาจทำโดยการผสมวัสดุตรึงเข้ากับเซลล์ แล้วเขย่าจนกระทั่งจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรในของเหลวมีค่าคงที่ กระบวนการตรึงเซลล์วิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับแรงของพันธะระหว่างผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์กับสารที่ใช้เป็นวัสดุตรึง เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ (Vanderwaal force) แรงไอออนิก (Ionic force) และแรงของพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen)

2.8.1.2 การยึดจับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นทำให้เซลล์จับกับวัสดุตรึง โดยจะเกิดพันธะขั้นระหว่างหมู่ฟังก์ชันของสารเคมีของวัสดุที่ใช้ตรึงกับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งส่วนใหญ่พันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่างพื้นที่ผิวด้านนอกของเซลล์จะเป็นสารประกอบจำพวกโปรตีนหรืออนุพันธ์ของโปรตีน ได้แก่ หมู่อะมิโน (NH_2) ของกรดอะมิโนไลซีนหรืออาร์จินีน หมู่อะมิโนคาร์บอกซิลิก (COOH) ของกรดอะมิโนแอสปาร์ติกหรือกลูตามิก หมู่อะมิโนไฮดรอกซิล (OH) ของกรดอะมิโนเซอรีนหรือทรีโอนีน และหมู่อะมิโนซัลไฮดริล (SH) ของกรดอะมิโนซิสเทอีน ส่วนสารที่ใช้เป็นวัสดุตรึงนั้นส่วนใหญ่จะเป็นสารสังเคราะห์

2.8.1.3 การตรึงเซลล์โดยการยึดจับ (Entrapment)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการที่เซลล์มีความเป็นอิสระจากสารละลาย แต่จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โครงสร้างมีลักษณะเป็นตาข่ายเจล ช่องว่างของร่างตาข่ายเจลที่เกิดขึ้นจะถูกควบคุมโดยโครงสร้างของเจลที่ยึดจับกับเซลล์อย่างแน่นหนา เพื่อป้องกันการรั่วหลุดของเซลล์ที่ถูกตรึงและรูที่เกิดขึ้นก็ยังจะช่วยให้อาหารและผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่เข้าออกจากเซลล์ได้อย่างอิสระ สำหรับวิธีการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะมีส่วนและทฤษฎีการตรึงเซลล์ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้

เอกสาตรึงเซลล์ เช่น อัลจิเนตมีการก่อตัวเป็นเจลโดยทำปฏิกิริยากันระหว่างประจุบวกและประจุลบของสารก่อเจลที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ อะกาโรสและเจลาตินมีการใช้อุณหภูมิในการเหนี่ยวนำให้เกิดเจลเมื่อเย็นตัวลง

2.8.1.4 การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้กัน (Crosslinking)

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้ วัสดุตรึงจะเป็นอิสระและจะมีการเชื่อมต่อของเซลล์แต่ละเซลล์กับวัสดุตรึงที่ยึดจับกับเซลล์อีกเซลล์หนึ่ง ซึ่งจะยึดจับกันเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่มีลักษณะสามมิติเชิงซ้อน และสามารถเชื่อมกันได้ทั้งแบบกายภาพและเคมี โดยกระบวนการเชื่อมไขว้ทางเคมีนั้นจะเชื่อมไขว้กันโดยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเซลล์ เช่น กลูตาาราลดีไฮด์ และ ทูลูอินไดโอโซไซยานต แต่เนื่องจากสารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูง จึงไม่นิยมที่จะนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์ ส่วนกระบวนการเชื่อมไขว้ทางกายภาพ จะเชื่อมไขว้เซลล์จนเกิดเป็นโครงสร้างที่เกาะกลุ่มกัน และเหนียวทำให้เซลล์มีความหนาแน่นสูง นอกจากนี้ กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการตรึงเซลล์วิธีอื่นคือ สามารถลดการรั่วของเซลล์ได้ เนื่องจากเซลล์เกิดการยึดเกาะกันอย่างเหนียวแน่น

2.8.1.5 การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึง (Encapsulation)

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้เป็นการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ไว้ภายในโครงสร้างตาข่ายของเจล โดยใช้วัสดุตรึงที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่าน ซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงจะเป็นอิสระจากสารละลาย แต่จะไม่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ การที่เซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ในลักษณะที่เป็นเม็ดนั้น จะทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่านของวัสดุตรึงได้ ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะสามารถเคลื่อนที่เข้าออกเม็ดเจลได้อย่างอิสระ วัสดุตรึงที่นำมาใช้จะมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 10 ถึง 100 ไมโครเมตร เช่น ไนลอน เซลลูโลสไนเตรท เป็นต้น

2.8.2 วัสดุตรึง

2.8.2.1 พอลิอะคริลาไมด์เจล

พอลิอะคริลาไมด์เจลเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ และสารเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน อาจทำให้จุลินทรีย์บางชนิดตายได้

2.8.2.2 อะการ์หรืออะกาโรส

อะการ์ เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดง *Gracilaria* หรือ *Gelidium* ส่วนอะกาโรส เป็นอะการ์ที่ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้สารละลายเกลือทำให้อะกาโรเพคตินที่มีซัลเฟต โปรทูเวต ในโครงสร้างของโมเลกุลตกตะกอนและกรองแยกในขณะที่ยังร้อน โดยอะกาโรสจะมีความแข็งแรงมากกว่าอะการ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2.3 คอลลาเจนหรือเจลาติน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนเส้นใยจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วยพันธะไฮโดรเจน และพันธะไอออนิก กระจายได้ดีในสารละลายที่มีพีเอช 2.5 - 4.5 ส่วนเจลาตินเป็นอนุพันธ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์คอลลาเจน

2.8.2.4 เคปปา-คาร์ราจีแนน

เคปปา-คาร์ราจีแนนเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดงสกุล *Eucheuma* มีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วย 3,6-anhydro-D-galactose ที่เชื่อมต่อกับ D-galactose-4-sulfate ด้วยพันธะ 1,4 แบบไกลโคซิดิก

2.8.2.5 ไคโตแซน

เป็นอนุพันธ์ของไคตินที่หมู่อะซิติกบางส่วนถูกขจัดออกไปด้วยการไฮโดรไลซ์ด้วยต่างเข้มข้น ละลายได้ในกรดอินทรีย์เจือจางที่มีพีเอชต่ำกว่า 6 เกิดจากการจับอออนซ์ตรงข้าม

2.8.2.6 แคลเซียมอัลจิเนต

กรดอัลจินิกเป็นโคพอลิเมอร์ของกรดแมนูโรนิกที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-ดี (1,4) ไกลโคซิดิก ถูกสกัดออกมาจากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Laminaria* ด้วยน้ำร้อนที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์เล็กน้อย

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Brouers และ Hall (1986) ศึกษาการตรึงเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena azollae* และ *Mastigocladus laminosus* โดยทำการตรึงเซลล์โดยใช้พอลิไวนิลและอัลจิเนตเป็นวัสดุตรึง จากการทดลองพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้พอลิไวนิลและอัลจิเนตเป็นวัสดุตรึงสามารถผลิตแอมโมเนียได้ มากกว่าเซลล์อิสระภายใต้สภาวะเดียวกัน

Laurinavichene และคณะ (2006) ศึกษากระบวนการตรึงเซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* โดยทำการเพาะเลี้ยงภายใต้อาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์และไนโตรเจน จากการทดลองพบว่า สภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์จะช่วยส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 45 มิลลิลิตรต่อวัน

Rashid และคณะ (2009) ศึกษากระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* ที่มีอะการเป็นวัสดุตรึงผ่านสองสภาวะในการทดลอง ในสภาวะไม่วากูมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แรกของการทดลองทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึงในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์และมีแสงเพื่อปรับสภาพเซลล์ ต่อมาในสภาวะที่สอง ทำการบ่มเซลล์ตรึงในสภาวะมืด ปราศจากออกซิเจน และซัลเฟอร์ เพื่อเริ่มกระบวนการผลิตไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า การตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียได้ดี ทั้งนี้ เมื่อเซลล์เข้าสู่สภาวะที่สองในการทดลอง เซลล์ตรึงของ *M. aeruginosa* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสจากภายนอก เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน การควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 ถึง 40 องศาเซลเซียส จะช่วยทำให้เซลล์ตรึงรักษาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ดียิ่งขึ้น

Wang และคณะ (2010) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงของ *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 โดยใช้พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โซเดียมอัลจิเนต และคาร์ราจีแนน เป็นวัตถุตรึง พบว่าการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลและอัตราการไหลของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับความเข้มข้น 60 มิลลิโมลต่อลิตร และในสภาวะที่มีการให้แสงที่มีความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร จะมีผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution (ภาคผนวก ก)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.3.1.1 กรดบอริก (H_3BO_3)
- 3.3.1.2 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)
- 3.3.1.3 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.3.1.4 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)
- 3.3.1.5 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- 3.3.1.6 โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)
- 3.3.1.7 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)
- 3.3.1.8 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.3.1.9 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- 3.3.1.10 กรดซิตริก (Citric Acid)
- 3.3.1.11 ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)
- 3.3.1.12 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- 3.3.1.13 แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
- 3.3.1.14 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- 3.3.1.15 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 3.3.1.16 เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$ Citrate)
- 3.3.1.17 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์

- 3.3.2.1 อะการ์ (Agar)
- 3.3.2.2 อะกาโรส (Agarose)
- 3.3.2.3 โซเดียมอัลจิเนต (Sodium Alginate)
- 3.3.2.4 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)

3.3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ

เมทานอล (CH_3OH)

3.3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน

- 3.3.4.1 ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ไนอาร์กอน
- 3.3.4.2 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999%)

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 3.4.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 3.4.2 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
- 3.4.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory 1375FX, Thailand)
- 3.4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z383K, Germany)
- 3.4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 3.4.6 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 3.4.7 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)
- 3.4.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.4.9 เครื่องวัดค่าความเค็ม (Conductivity meter)
- 3.4.10 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Thermo Electron Corporation, Helios Gamma, USA)
- 3.4.11 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)
- 3.4.12 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
- 3.4.13 เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ (Gas Chromatograph) (Shimadzu GC-15A, Japan)

เอกสารนี้เป็น 3.4.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด 3.4.15 ไมโครปิเปต (Micropipette) และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.16 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.4.17 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
- 3.4.18 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
- 3.4.19 เดซิเคเตอร์ (Desiccator)
- 3.4.20 ขวดแก้วขนาด 12.5 และ 21 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (Vials) (National Scientific USA)
- 3.4.21 เข็มฉีดยา (Syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่เรียก A. *halophytica*

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่เรียก A. *halophytica* ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเล (น้ำทะเลเก็บบริเวณหาดเตยงาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ที่ละติจูด 12.40'88"N ลองจิจูด 100.51'41"E อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) การเตรียมน้ำทะเลทำโดยนำน้ำทะเลมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 จากนั้นนำไปปรับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.4 และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เพาะเลี้ยง A. *halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution และน้ำทะเล ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้มีการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโอสไนด์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน

3.5.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโต

3.5.2.1 วัดค่าการดูดกลืนแสง

วัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

3.5.2.2 นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด

ศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดบน Hemocytometer นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นเอกสารหลังสว่างทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน ซ้ำกันเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรมากรองด้วยเครื่องกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No 1 จากนั้น นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ไปอบที่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นลงในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก นำไปคำนวณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งโดยลบน้ำหนักกระดาษกรองและบันทึกค่า

3.5.2.4 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

สำหรับเซลล์อิสระ การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ทำได้โดยนำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยเทียบกับเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ดังสมการที่ 3.1 ตามวิธีของ MacKinney (1941)

สำหรับการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของเซลล์ตรึง ทำได้โดยนำตัวอย่างเซลล์ตรึงมาใส่ในหลอดทดลองจำนวน 5 ขัน แช่ในเมทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝาพันพาราฟิล์มไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยเทียบกับเมทานอล นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ดังสมการที่ 3.1 ตามวิธีของ MacKinney (1941)

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = 12.7 \times A_{665} \text{ นาโนเมตร} \times \text{ค่าการเจือจาง} \quad (\text{สมการที่ 3.1})$$

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

สำหรับเซลล์อิสระ นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในพลาสติกปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายเซลล์ในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเซลล์ทั้งหมดใส่ขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแก้ว จากนั้นไล่อากาศโดยการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที หุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น ดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Headspace) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วย

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอนเป็นก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

มาตรฐาน

ไม่วาทกรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเซลล์ตรึง นำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรียปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้ว ขนาด 21 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารที่ปราศจากไนเตรทปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแก้ว นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมล โฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น นำขวดแก้วมาไล่อากาศโดยการฟังก๊าซ อาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Headspace) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ โดยจะใช้ก๊าซไฮโดรเจนความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน

3.5.4 วิธีการศึกษาการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเล

3.5.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหารน้ำทะเล

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 (pH 7.4) ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วัน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเล 2 ครั้ง นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

3.5.4.2 วิธีการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 (pH 7.4) ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วัน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเล 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ดังนี้ 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

3.5.4.3 วิธีการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 (pH 7.4) ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วัน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเล 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ดังนี้ 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครอินสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

เซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์และเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 และ 3 โมลาร์ (น้ำทะเลมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.5 โมลาร์) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

3.5.5 วิธีการศึกษาผลของการปรับตัวของเซลล์อิสระในน้ำทะเลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียแบบ One-stage ทำได้โดยนำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงตามหัวข้อ 3.5.4.2 เป็นเวลา 7 วัน มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท นำสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตรและจากนั้นไล่อากาศโดยการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปปั่นที่ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Headspace) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยจะใช้ก๊าซไฮโดรเจนความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียแบบ Two-stage เป็นการเพาะเลี้ยงที่มี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ดังนี้ 1.76, 8.8 และ 17.6 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ขั้นที่ 2 เป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียด ทำได้โดยนำไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในขั้นแรกมาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท 2 ครั้ง และนำไปกระจายในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรทปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด จึงเก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตรและนำขวดแก้วมาไล่อากาศโดยการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปปั่นที่ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Headspace) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยจะใช้ก๊าซไฮโดรเจนความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6 วิธีการตรึงเซลล์

3.5.6.1 การเตรียมไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหาร BG11 (pH 7.4) เสริมด้วย Turk Island salt solution และน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท 2 ครั้งก่อนการตรึงเซลล์ โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 0.2 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจะถูกตรึงด้วยวัสดุตรึงที่แตกต่างกัน ดังนี้ อะการ์ อะกาโรส และโซเดียมอัลจิเนต

3.5.6.2 การเตรียมวัสดุตรึง

เตรียมสารละลายอะการ์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท ละลายอะการ์บนเครื่องให้ความร้อนและนำไปฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการล้างจากข้อ 3.5.6.1 มาผสมกับสารละลายอะการ์ อัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน เทลงเพลท รอให้อะการ์แข็งตัว จึงตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปวัดไฮโดรเจนตามหัวข้อ 3.5.3

เตรียมสารละลายอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท ละลายอะกาโรสบนเครื่องให้ความร้อนและนำไปฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการล้างจากข้อ 3.5.6.1 มาผสมกับสารละลายอะกาโรสเข้มข้น อัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน เทลงเพลท รอให้อะกาโรสแข็งตัว จึงตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปวัดไฮโดรเจนตามหัวข้อ 3.5.3

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 6 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท ละลายโซเดียมอัลจิเนตบนเครื่องให้ความร้อนและนำไปฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการล้างจากข้อ 3.5.6.1 มาผสมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต อัตราส่วน 1 ต่อ 9 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดฉีดยามาดูดปริมาตร 6 มิลลิลิตร หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์แช่เม็ดเจลเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและทำการล้างเจลที่ตรึงได้ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท จากนั้นนำไปวัดไฮโดรเจนตามหัวข้อ 3.5.3

3.5.7 วิธีการศึกษาผลของความสามารถของวัสดุตรึงอะการ์

เตรียมสารละลายอะการ์ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยละลายอะการ์ในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทบนเครื่องให้ความร้อนและนำไปฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าไมวากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการล้างจากข้อ 3.5.6.1 มาผสมกับสารละลายอะการ์ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน เกล็ด เกล็ด รอให้อะการ์แข็งตัว จึงตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปวัดไฮโดรเจนตามหัวข้อ 3.5.3

3.5.8 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์

เพาะเลี้ยง *A. halophytica* ตามหัวข้อ 3.5.6.1 โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์เท่ากับ 0.2, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายอะการ์ 3 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน เกล็ด เกล็ด รอให้อะการ์แข็งตัว จึงตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปวัดไฮโดรเจนตามหัวข้อ 3.5.3

3.5.9 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่

เพาะเลี้ยง *A. halophytica* ตามหัวข้อ 3.5.6.1 จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายอะการ์ 3 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน เกล็ด เกล็ด รอให้อะการ์แข็งตัว จึงตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปวัดไฮโดรเจนตามหัวข้อ 3.5.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำเซลล์ตรึงกลับมาล้างด้วยอาหารใหม่ที่ปราศจากไนเตรท และเติมอาหารใหม่ลงในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำขวดแก้วมาไล่อากาศโดยการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น ดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Headspace) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟอีกครั้ง

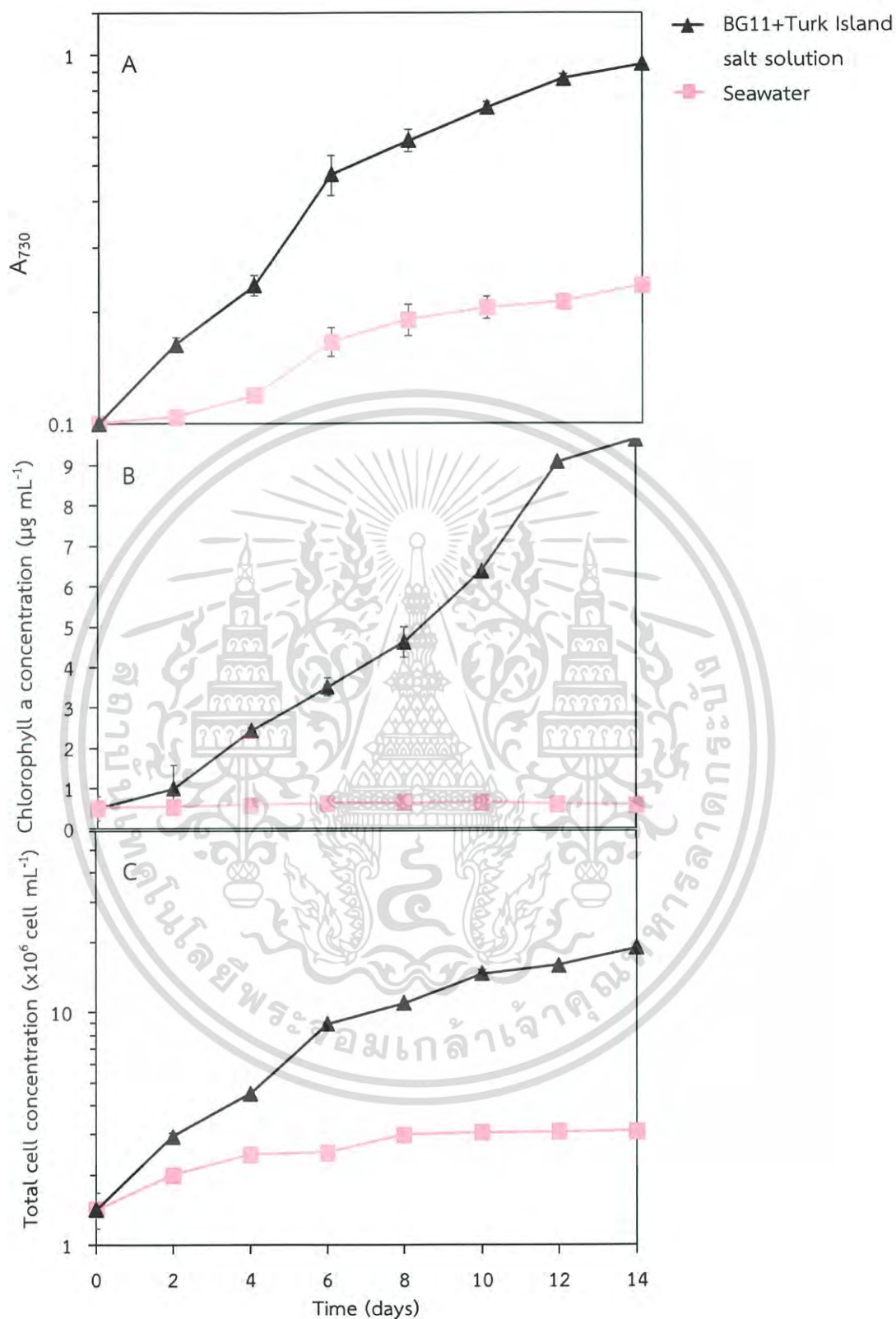
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลเปรียบเทียบกับในอาหาร BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* ในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลไอน์สไตรีนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อวินาที และวัดการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution โดยจะพบว่าในวันที่ 14 การเจริญของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลจะน้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ประมาณ 5 เท่า (รูปที่ 4.1A) นอกจากนี้ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น สอดคล้องกับรูปแบบของค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 4.1 A,B) ในขณะที่ค่าคลอโรฟิลล์ เอ ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลจะไม่มีการเพิ่มขึ้นและเซลล์จะมีสีเหลือง (รูปที่ 4.1B) เมื่อพิจารณาจากจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ *A. halophytica* พบว่าในวันที่ 14 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลจะมีจำนวนเซลล์ทั้งหมดน้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ประมาณ 5 เท่า (รูปที่ 4.1C) เช่นเดียวกับรูปแบบของค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 4.1A) แสดงให้เห็นว่า *A. halophytica* สามารถเจริญเติบโตในน้ำทะเลได้เล็กน้อย แต่ไม่มีการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ ดังนั้น หากต้องการให้ *A. halophytica* สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำทะเล จึงจำเป็นต้องเติมธาตุอาหารที่ช่วยให้ *A. halophytica* เจริญเติบโตได้ดี ในการทดลองถัดไป จึงทำการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชและสาหร่าย โดยใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



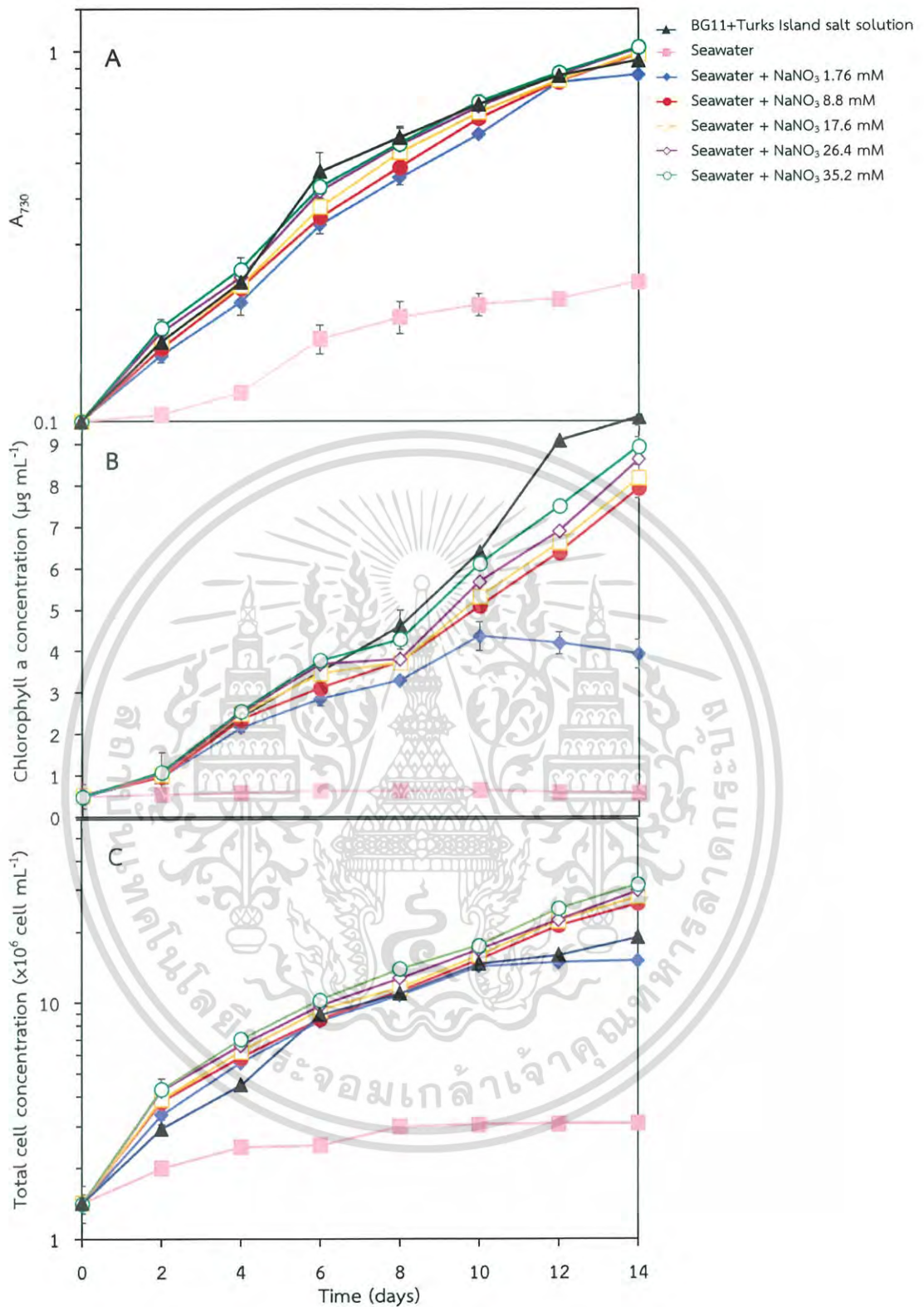
รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (B) และจำนวนเซลล์ทั้งหมด (C) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของไนเตรทต่อการเจริญของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่า *A. halophytica* มีการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และจำนวนเซลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทสูงกว่า 1.76 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution พบว่า *A. halophytica* มีการเจริญเติบโต คลอโรฟิลล์ เอ และจำนวนเซลล์ทั้งหมดใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.2 A,B,C) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ (Gilbert *et al.*, 1986) และรายงานที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากไนเตรทและแอมโมเนียมในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis viridis* (Von rücker and Giani, 2004) แสดงให้เห็นว่าไนเตรทมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* เนื่องจากอะตอมของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ สารประกอบชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น กรดนิวคลีอิก (DNA, RNA) กรดอะมิโน และเม็ดสี เช่น คลอโรฟิลล์ และไฟโคไซยานิน (Markou *et al.*, 2014) จากงานวิจัยของ Becker (1994) รายงานว่าภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กมีปริมาณโปรตีนประมาณ 30-60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเซลล์จึงต้องการแหล่งไนโตรเจนจำนวนมาก ในการทดลองถัดไป จึงทำการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 17.6 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมและเป็นความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

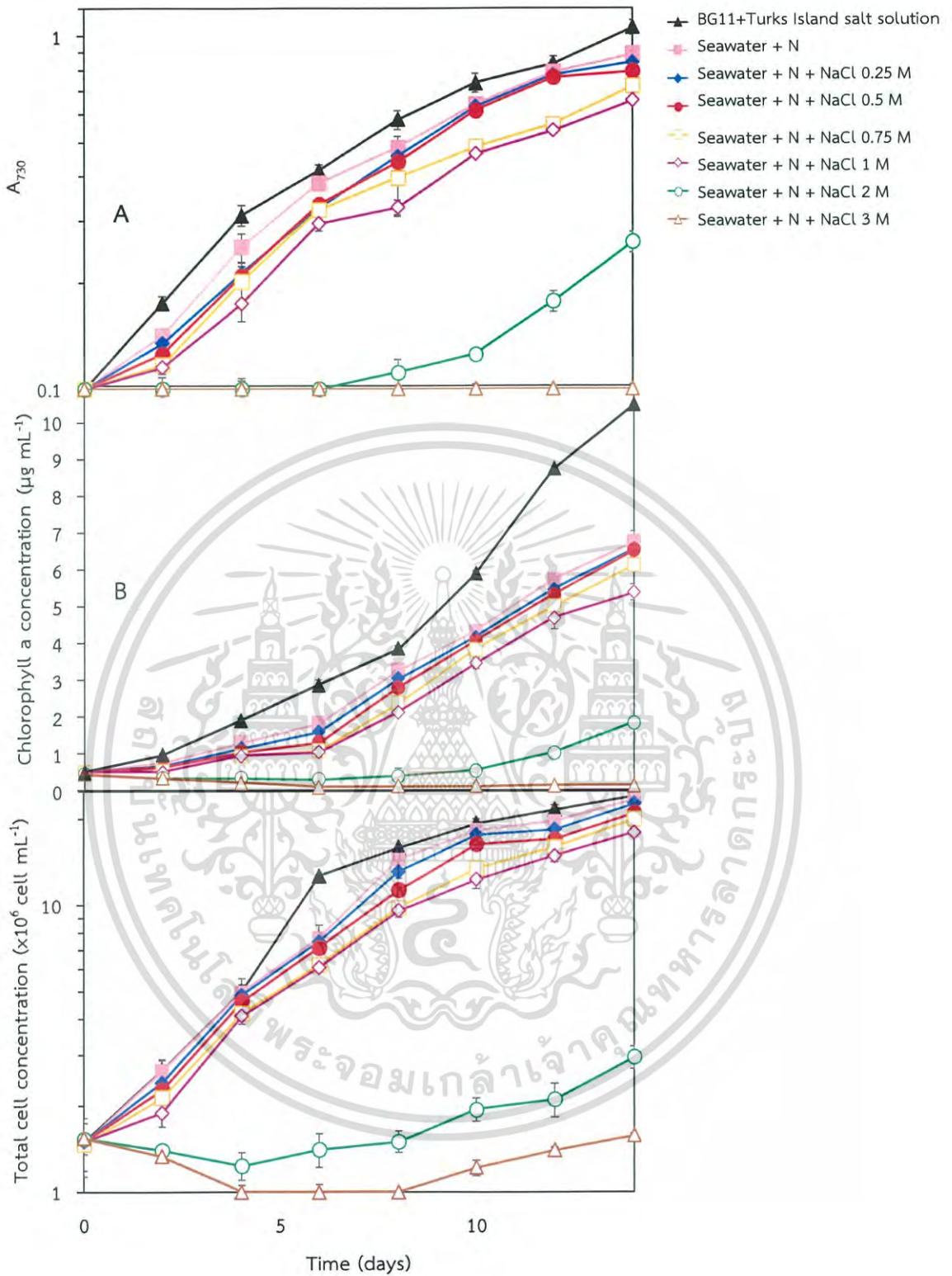


รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (B) และจำนวนเซลล์ทั้งหมด (C) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4, 35.2 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล

ในการทดลองนี้ใช้น้ำทะเลจากหาดเตยงาม อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ซึ่งทำการวัดค่าความเค็มด้วยเครื่องคอนดักติวิตี พบว่าน้ำทะเลมีค่าความเค็มประมาณ 0.5 โมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะให้แสงที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลไอน์สไตรีนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดทุก 2 วัน พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและใกล้เคียงกันเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ และเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ และใกล้เคียงกับการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เซลล์จะมีการเจริญเติบโตลดลงและมีช่วงระยะพักนานประมาณ 6 วัน และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไป 3 โมลาร์ พบว่าเกิดสภาวะเครียด ทำให้เซลล์แตกเห็นเป็นสารละลายสีฟ้า และไม่พบการเจริญของเซลล์ (รูปที่ 4.3 A,B,C) มีรายงานวิจัยพบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0.5-1 โมลาร์ หรือ 2.93-5.85 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงถึง 3 โมลาร์ หรือ 17.5 โมลาร์ (Takabe *et al.*, 1988) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำทะเลตามธรรมชาติที่มีโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.5 โมลาร์ เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ในการทดลองถัดไปจึงเลือกน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ และไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ไปทำการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



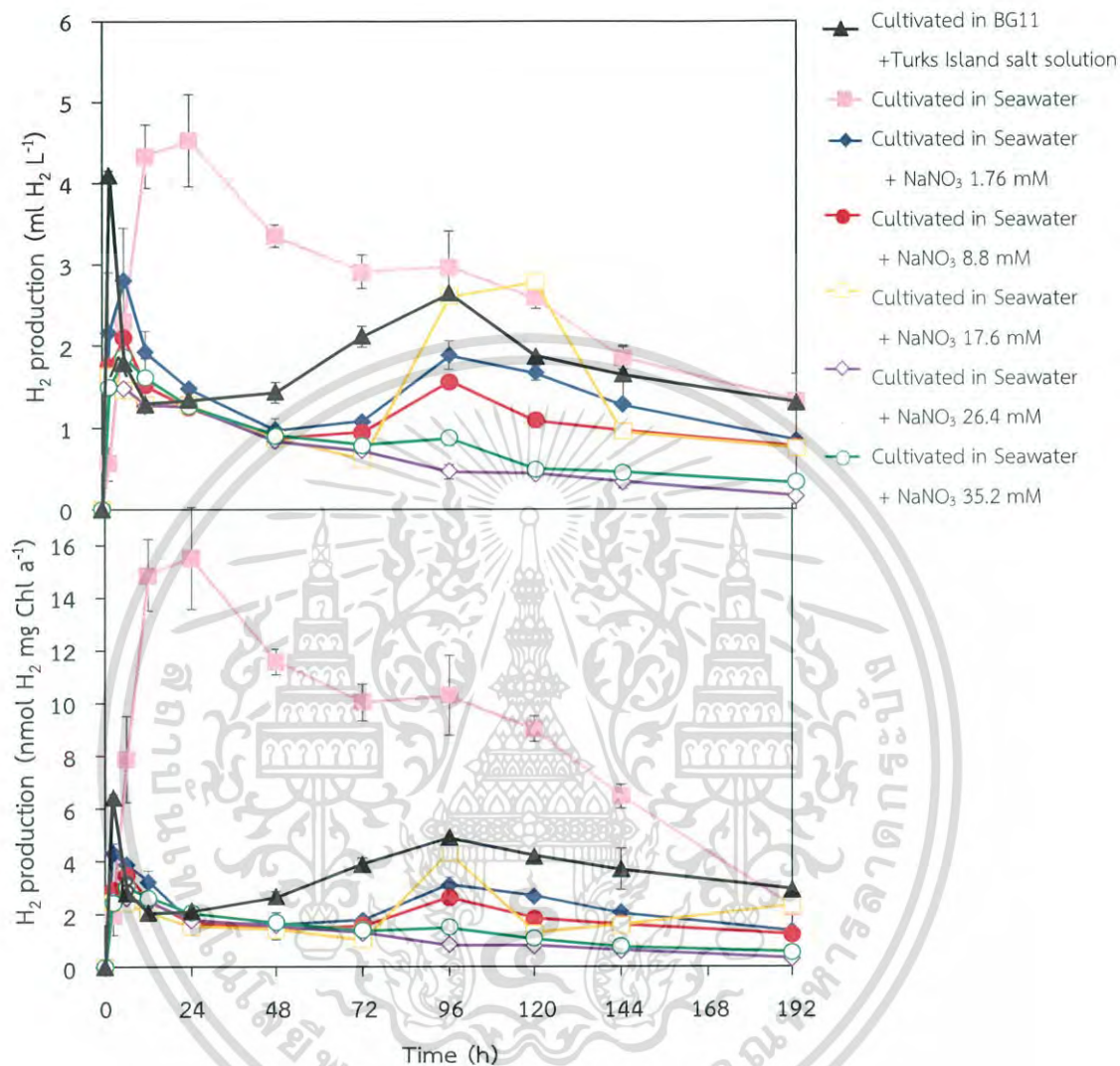
รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (B) และจำนวนเซลล์ทั้งหมด (C) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 และ 3 โมลาร์ และเปรียบเทียบกับ การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 การค้าไม่ว่าที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของการปรับตัวในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระของ *A. halophytica*

การผลิตไฮโดรเจนในระบบ One-stage ดำเนินการทดลองโดยเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4, 35.2 มิลลิโมลาร์ และไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลไอน์สต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้มากระจายในขวดแก้วเล็กขนาด 12 มิลลิลิตร ที่มีน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท 5 มิลลิลิตร ในนำไปพ่นแก๊สอาร์กอนเพื่อไล่อากาศ บ่มโดยให้แสง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี สำหรับการผลิตไฮโดรเจนในระบบ Two-stage จะแตกต่างจากระบบ One-stage คือ เมื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76, 8.8, 17.6 มิลลิโมลาร์ และไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ และล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทจำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มากระจายในขวดแก้วเล็กขนาด 12 มิลลิลิตร ที่มีน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท 5 มิลลิลิตร บ่มโดยให้แสง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เพื่อเป็นการให้เซลล์ปรับตัวในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท หลังจากนั้นนำขวดแก้วเล็กที่บรรจุเซลล์แขวนลอยไว้ มาพ่นแก๊สอาร์กอนเพื่อไล่อากาศ บ่มโดยให้แสง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี จากการทดลองพบว่า การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในระบบ One-stage เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่ไม่มีโซเดียมไนเตรทเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายเซลล์ลงในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 4.53 มิลลิลิตรของไฮโดรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.4 A) หรือ 15.52 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (รูปที่ 4.4 B) เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในระบบ Two-stage จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทสูงขึ้น จะทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน แล้วปรับตัวในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท 1 วัน สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 59.24 มิลลิลิตรของไฮโดรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.5 A) หรือ 44.59 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (รูปที่ 4.5 B) กล่าวคือระบบ Two-stage สามารถทำให้การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สูงกว่าระบบ One-stage เนื่องจากในระบบ Two-stage ไซยาโนแบคทีเรียจะมีการสังเคราะห์โปรตีนลดลงและสะสมไกลโคเจนภายในเซลล์มากขึ้นภายใต้สภาวะที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน และเมื่อเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศ เซลล์จะมีการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักในที่มืด (Dark fermentation) ซึ่งสารตั้งต้นของกระบวนการหมักในที่มืดคือไกลโคเจนที่สะสมไว้ภายในเซลล์ และได้ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนคือ อิเล็กตรอนและโปรตอน ซึ่งจะเข้าสู่เอนไซม์ไปโดเรกซัน

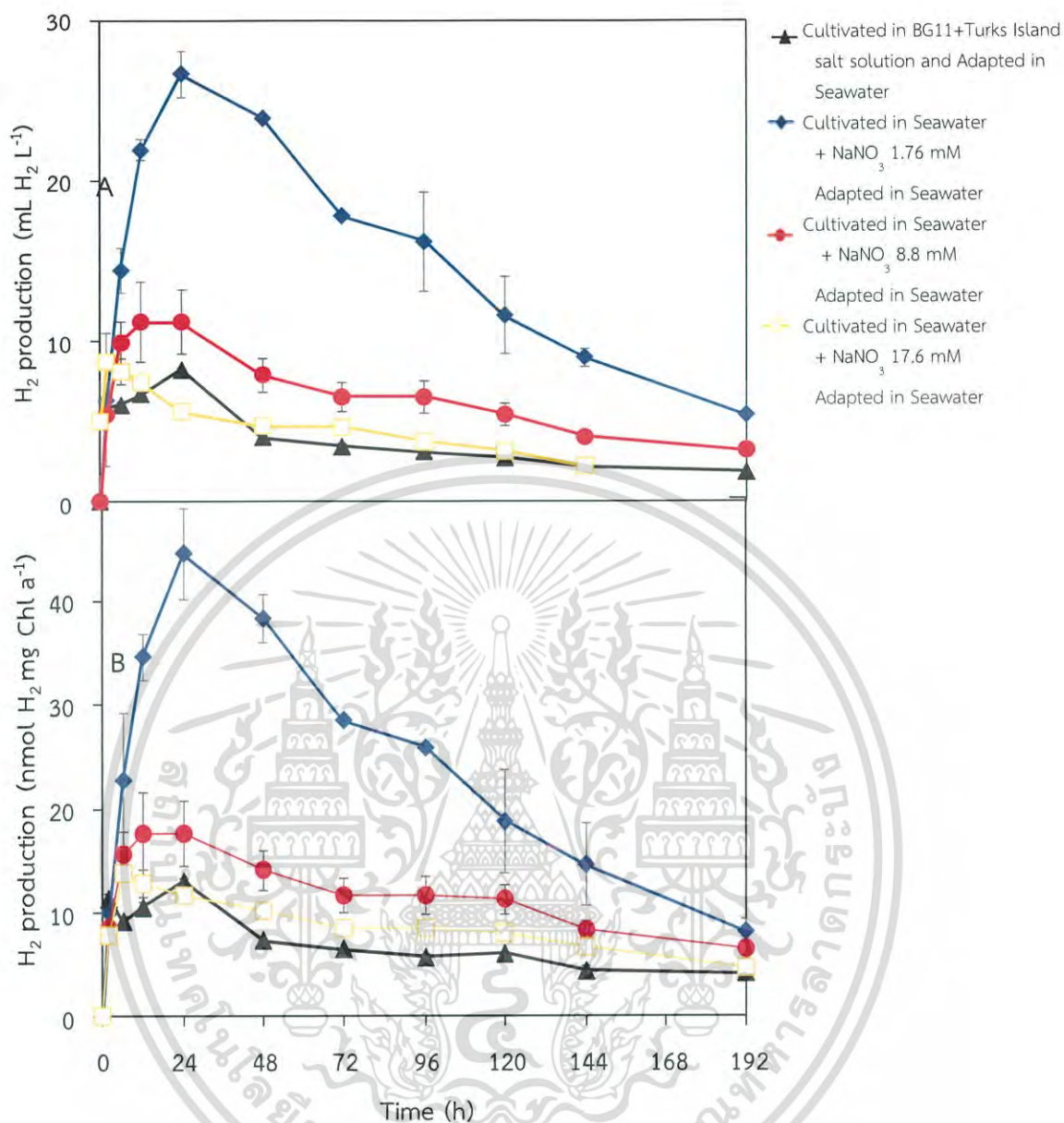
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเอาไปใช้ประโยชน์อื่นใด
 นอลไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นจึงเลือกการผลิตไฮโดรเจนในระบบ two-stage โดยใช้น้ำ
 ไม่วางกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทะเลที่มีโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน และปรับตัวในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทเป็นเวลา 1 วัน ไปทำการทดลองถัดไป



รูปที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจนในระบบ One-stage จากเซลล์อิสระของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล มีหน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร (A) และนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอ (B) เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

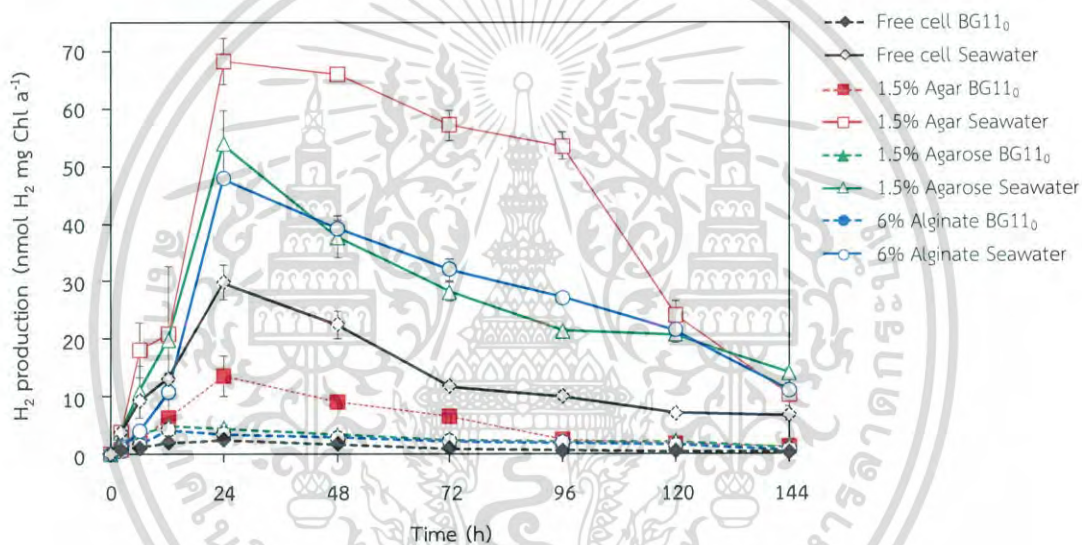


รูปที่ 4.5 การผลิตไฮโดรเจนในระบบ Two-stage จากเซลล์อิสระของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล มีหน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร (A) และนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอ (B) เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

4.5 ผลของชนิดวัสดุตั้งต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*

จากการศึกษาชนิดวัสดุตั้งต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica* โดยทำการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11 จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ไปกระจายในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11

แล้วผสมเซลล์กับวัสดุตั้ง ได้แก่ อะการ์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร และแคลเซียมอัลจิเนต 6 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร (ที่ทำการละลายในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀) อัตราส่วนในการผสมระหว่างเซลล์ต่อวัสดุตั้งเท่ากับ 1 ต่อ 9 นำเซลล์ตั้งไปบ่มโดยให้แสง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ เป็นเวลา 1 วัน ก่อนการพ่นแก๊สอาร์กอนเพื่อไล่อากาศ ผลการทดลองพบว่าเซลล์ *A. halophytica* ที่ตั้งด้วยอะการ์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดประมาณ 68.21 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอ (รูปที่ 4.6) โดยมีรายงานพบว่าอะการ์เป็นวัสดุตั้งที่มีศักยภาพ ช่วยป้องกันเซลล์จากพีเอชภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ไม่เหมาะสมต่อกลไกเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (Sagir *et al.*, 2018) ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงเลือกตั้งเซลล์ด้วยอะการ์



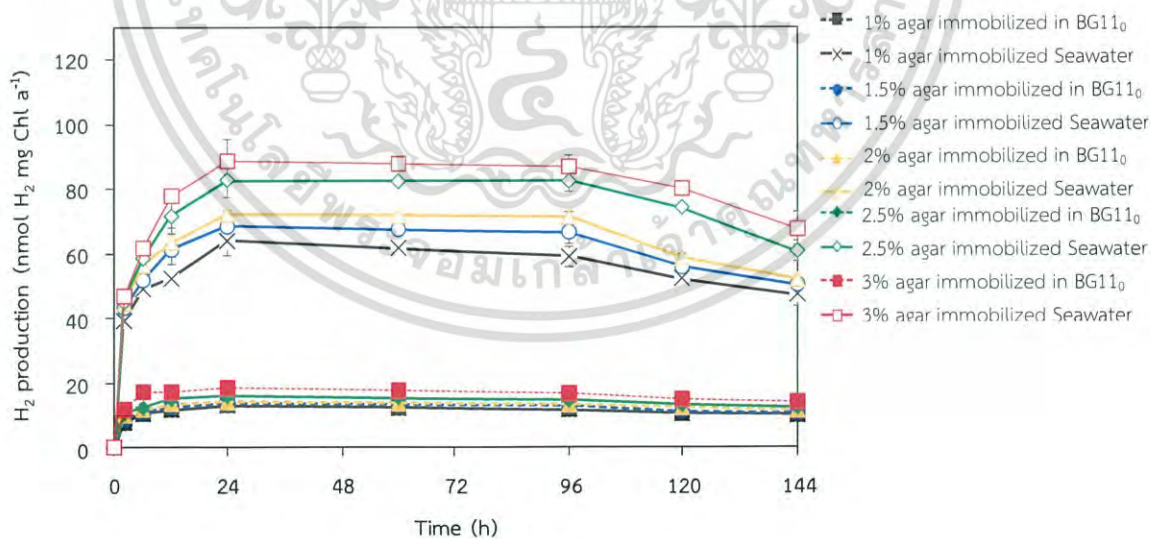
รูปที่ 4.6 การผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ *A. halophytica* ที่ตั้งด้วยวัสดุตั้งชนิดต่างๆ ในระบบ Two-stage โดยนำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ มาปรับตัวในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

4.6 ผลของความเข้มข้นของอะการ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตั้ง *A. halophytica*

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของอะการ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตั้ง *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 โมลาร์ ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ไปกระจายในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ แล้วผสมเซลล์กับ

อะการ์โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ (ทำการละลายในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀) อัตราส่วนในการผสมระหว่างเซลล์ต่อ ไม้วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะการีในอาหารปราศจากไนเตรทเท่ากับ 1 ต่อ 9 นำเซลล์ตรึงไปบ่มโดยให้แสง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท หรือ BG11₀ เป็นเวลา 1 วัน ก่อนการพ่นแก๊สอาร์กอนเพื่อไล่อากาศ จากการทดลองพบว่าเซลล์ *A. halophytica* ที่ตรึงด้วยอะการีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดประมาณ 53.80 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (รูปที่ 4.7) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica* จะแปรผันตรงต่อความเข้มข้นของอะการี กล่าวคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะการีให้สูงขึ้นจะทำให้การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica* สูงขึ้นด้วย เช่นเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Pansook และคณะ (2016) ที่ทำการตรึงเซลล์ *A. halophytica* ด้วยแคลเซียมอัลจินเตความเข้มข้น 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เพื่อผลิตไฮโดรเจน พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจินเตที่ทำให้เซลล์ตรึง *A. halophytica* ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดคือ 4.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของวัสดุตรึงจะทำให้เกิดกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) ทำให้ผนังของวัสดุตรึงมีขนาดของรูพรุนเล็กลง เป็นผลทำให้ออกซิเจนจากภายนอกสามารถเข้ามาในเซลล์ได้น้อย ซึ่งออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เป็นเอนไซม์สำคัญในการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* แต่หากความเข้มข้นของวัสดุตรึงมากเกินไป จะทำให้การแลกเปลี่ยนสารของเซลล์และสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นได้ยาก เป็นสาเหตุทำให้การผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงลดลง ดังนั้น จึงเลือกใช้อะการีเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจนในการทดลองถัดไป



รูปที่ 4.7 การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica* ที่แปรผันความเข้มข้นของอะการีที่ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และนำมาปรับตัวในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ

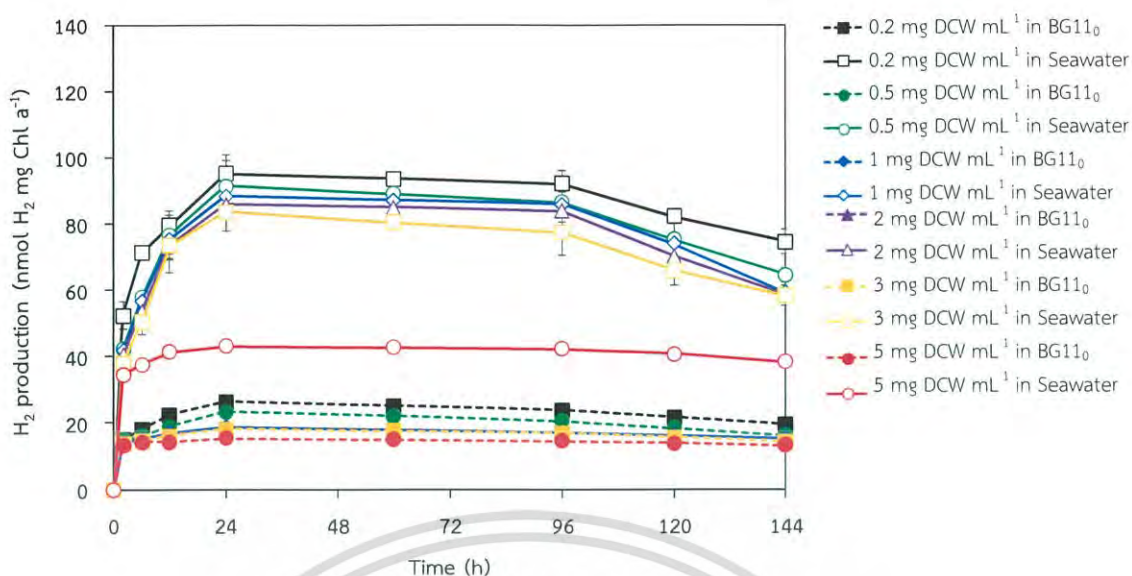
BG11₀ ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

ไม่ทราบว่ากรณินี้ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ไปกระจายในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ แล้วผสมเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร กับความเข้มข้นสุดท้ายของอะการ์ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร (ทำการละลายในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀) อัตราส่วนในการผสมระหว่างเซลล์ต่ออะการ์ในอาหารปราศจากไนเตรทเท่ากับ 1 ต่อ 9 นำเซลล์ตรึงไปบ่มโดยให้แสง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ เป็นเวลา 1 วัน ก่อนการพ่นแก๊สอาร์กอนเพื่อไล่อากาศ ผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของเซลล์มากขึ้น จะทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง โดยในงานวิจัยนี้พบว่าการใช้เซลล์ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร มาทำการตรึงเซลล์ในอะการ์ ให้ค่าไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 61.43 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (รูปที่ 4.8) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pansook และคณะ (2019) ที่ทำการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ด้วยอะการ์ในอาหาร BG11₀ เสริมด้วย Turk Island salt solution โดยแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเซลล์ 0.2 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด เนื่องจากการที่มีเซลล์น้อยจะทำให้เซลล์ได้รับการถ่ายเทสารได้ดีกว่าการมีเซลล์มาก ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลล์เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตรในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจนในการทดลองถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



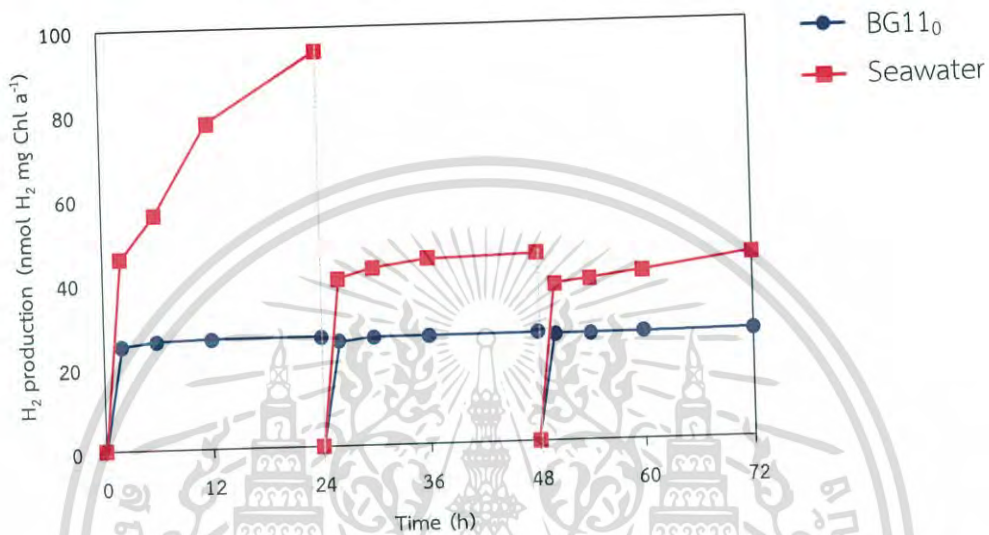
รูปที่ 4.8 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ ได้แก่ 0.2, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบ Two-stage ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และนำมาปรับตัวในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11₀ เสริมด้วย Turk Island salt solution

4.8 การนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* กลับมาใช้ใหม่

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์โคลโรไรด์ เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ไปกระจายในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ แล้วผสมเซลล์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร กับอะการ์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร (ที่ทำให้การละลายในน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀) อัตราส่วนในการผสมระหว่างเซลล์ต่ออะการ์ในอาหารปราศจากไนเตรทเท่ากับ 1 ต่อ 9 นำเซลล์ตรึงไปบ่มโดยให้แสง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ เป็นเวลา 1 วัน ก่อนการพ่นแก๊สอาร์กอนเพื่อไล่อากาศ ทำการวัดไฮโดรเจนจนถึง 24 ชั่วโมง (เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด) นำเซลล์ตรึงออกมาจากอาหารเดิม หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำทะเลปราศจากไนเตรทหรือ BG11₀ 2 ครั้ง ย้ายเซลล์ตรึงลงอาหารใหม่ ก่อนพ่นแก๊สอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มในสภาวะเดิม วัดไฮโดรเจนถึง 24 ชั่วโมง แล้วย้ายเซลล์ตรึงลงอาหารใหม่ เช่นเดิม ซึ่งในการทดลองนี้สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่เพื่อผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 3 ครั้ง เนื่องจากครั้งที่ 4 ไฮโดรเจนที่ได้มีค่าน้อยมาก จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเมื่อนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* กลับมาใช้ใหม่ ค่าไฮโดรเจนที่วัดได้จะน้อยลงเรื่อยๆ ตามจำนวนรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ตามการค้า โดยในรอบแรกไฮโดรเจนที่ผลิตจากเซลล์ตรึง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท มีค่าไม่วากรณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 97.22 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ รอบที่สองมีค่าเท่ากับ 47.77 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ และรอบที่สาม มีค่าเท่ากับ 6.84 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ (รูปที่ 4.9) อธิบายได้ว่าเซลล์ที่นำกลับมาใช้ใหม่จะมีสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจนน้อยลง และเซลล์ยังอยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนเท่าการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงในครั้งแรก



รูปที่ 4.9 ผลของการนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* กลับมาใช้ใหม่ต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบ Two-stage โดยไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และนำมาปรับตัวในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11₀ เสริมด้วย Turk Island salt solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการนำน้ำทะเลมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* สรุปได้ว่า

1. การเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นตั้งแต่ 1.76 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป ในน้ำทะเล สามารถทำให้ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เจริญเติบโตได้ และมีค่าการเจริญเติบโต คลอโรฟิลล์ เอ และจำนวนเซลล์ทั้งหมดใกล้เคียงกับการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

2. การเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำทะเลไม่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถเติบโตได้ดีในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรท 17.6 มิลลิโมลาร์ และไม่ต้องเติมโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากในน้ำทะเลมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์

3. การผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระ *A. halophytica* จะสูง เมื่อทำการบ่มในระบบ Two-stage โดยเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น ถ่ายเซลล์อิสระลงในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรทเพื่อเป็นการปรับตัวเป็นเวลา 1 วัน

4. การแปรผันชนิดของวัสดุตรึง ได้แก่ อะการ์ อะกาโรส และแคลเซียมอัลจิเนต ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica* พบว่าการใช้อะการ์เป็นวัสดุตรึงทำให้เซลล์ตรึง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เท่ากับ 68.21 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ

5. การแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของอะการ์ เท่ากับ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica* พบว่าการใช้อะการ์เข้มข้นสุดท้าย 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ทำให้เซลล์ตรึง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เท่ากับ 88.80 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ

6. การแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ตรึง ได้แก่ 0.2, 0.5, 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica* พบว่าการใช้เซลล์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ตรึง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด เท่ากับ 95.15 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ในงานวิจัยนี้สามารถนำเซลล์ตรึง *A. halophytica* กลับมาใช้ผลิตไฮโดรเจนใหม่ได้ถึง 3 รอบ เนื่องจากรอบที่ 4 เซลล์จะไม่มีการผลิตไฮโดรเจนแล้ว และในรอบที่ 1 เซลล์ตรึง *A. halophytica* จะมีค่าไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 97.22 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปอาจจะมีการปรับปรุงพันธุ์เชื้อ หรือเลือกเชื้อตัวอื่นในการผลิต ปรับปรุงสูตรอาหาร รวมทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า. วันที่สืบค้น 29 มิถุนายน 2562 ที่มา http://www.greencarcongress.com/2004/11/milestone_ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน. วันที่สืบค้น 29 มิถุนายน 2562. ที่มา http://www.enea.or.jp/WELNET/suiso/suiso1_e.html.

นิสิต ต้นทิวชฎ. 2010. Water electrolysis เทคโนโลยีผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สะอาดและยั่งยืน. Technology Energy. 36(209) : 59-62.

ละอองดาว แสงหล้า, วิระศักดิ์ เทพจันทร์, ธวัชชัย ศุภดิษฐ์. ไฮโดรเจน เชื้อเพลิงแห่งอนาคตที่ไม่มีวันสูญสิ้น. วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม. 48-60.

สร้อยญา พันธุ์พุกข์, อรัญ อินทรเจริญศักดิ์. 2556. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* โดยการตรึงเซลล์. ภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน. รายงานสถิติพลังงานของประเทศไทย 2561. วิณา ชูโชติ. 2559. สำหรับวิทยา. ภาควิชา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Ahem, K.S., Ahern, C.R. and Udy, J.W. 2007. "Nutrient additions generate prolific growth of *Lyngbya majuscula* (cyanobacteria) in field and bioassay experiment." Harmful Algae. 6 : 134-151.

Antal, T., Oliveira, P. and Lindblad, P. 2006. "The bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803." Int. J. Hydrogen Energy. 31: 1439-1444.

Bergman B, Gallon JR, Rai AN, Stal LJ (1997) N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. FEMS Microbiol Rev. 19 : 139-185.

Brouers M, Hall DO 1986. Ammonia and hydrogen production by immobilized cyanobacteria. J Biotech. 3 : 307-321.

Chen PC, Fan SH, Chiang CL, Lee CM 2008. Effect of growth conditions on the hydrogen production with cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CH₃. Int J Hydrogen Energy. 33 : 1460-1464.

Dawar, S., Masukawa, H., Mohanty, P., Sakurai, H. 2006. "Prospects of biohydrogen production using cyanobacteria – an overview" Proc Indian Natn Sci Acad. 72(4) : 213-223.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dincer, I., Joshi, A.S. 2013. "Solar based hydrogen production systems" SpringerBriefs in Energy.
- Ding, C., Yang, K.-L., He, J. 2016. "Biological and fermentative production of hydrogen" Handbook of Biofuels Production. 303-333.
- Dutta D, De D, Chaudhuri S, Bhattacharya SK (2005) Hydrogen production by cyanobacteria. *Microb Cell Fact.* 4 : 36-46. Eric M, Richard R 2000. Photoelectrochemical hydrogen production: Proceeding the 2000 Hydrogen Program Review.1 : 1-14.
- Fay, p. 1976. "Factors influencing dark nitrogen fixation in a blue-green alga." *Appl. Environment. Microbiol.* 31 : 376-379.
- Gilbert, P.M, Kana, T.M, Olson, R.J, Kirchman, D L, and Alberte R. S. 1986. "Clonal comparisons of growth and photosynthetic responses to nitrogen availability in marine *Synechococcus* spp." *J. hp. Mur. Biuf. Ecoi.* 101 : 199-208.
- Guana, Y., Denga, M., Yu, X. and Zhang, W. 2004. "Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*." *Biochem. Eng. J.* 19 : 69-73.
- Gupta, R. 2009. Hydrogen fuel production, transport, and storage. United States of America : CRC Press Taylor & Framcos Group.
- Hall DO, Markov SA, Watanabe Y and Rao KK (1995) The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynth Res.* 46 : 159-167.
- Harrison, P.J. and Berges, J.A. 2005. "Marine culture media." 21-33. In Andersen, R.A. *Algal culturing techniques.* Amsterdam : Elsevier Inc.
- Karel SF, Kibicki SB, Robertson CR 1985. Immobilization of whole cells: engineering principles. *Chem Eng Sci.* 40 : 1321-1354.
- Khanna, N., Lindblad, P. 2015. "Cyanobacterial hydrogenases and hydrogen metabolism revisited: Recent progress and future prospects" *Int. J. Mol. Sci.* 16 : 10537-10561.
- Kosourova, S., Murukesana, G., Seibertb, M., Allahverdiyeva, Y. 2017. "Evaluation of light energy to H₂ energy conversion efficiency in thin films of cyanobacteria and green alga under photoautotrophic conditions" *Algal Research.* 28 : 253-263.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kufryk, G., 2013. “Advances in utilizing cyanobacteria for hydrogen production” *Advances in Microbiology*. 3 : 60-68.
- Lindberg P (2003) Cyanobacterial hydrogen metabolism-Uptake hydrogenase and hydrogen production by nitrogenase in filamentous cyanobacteria. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of science and technology*.
- MacKinney, G. 1941. “Absorption of light by chlorophyll solutions.” *J. Biol. Chem.* 140 : 135-322.
- Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M.L. 2009. “Photobiology hydrogen production prospects and challenges.” *Microbe*. 4 : 275-280.
- Markou, G, Vandamme, D, and Muylaert, K. 2014 “Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients.” *Water research*. 65 : 186-202.
- Ministry of Energy. 2011. Thailand 20-year energy efficiency development plan 2011-2030. www.eppo.go.th/encon/ee-20yrs/EEDP_Eng.pdf
- Mitsui, A., Philips, E.J., Kumazawa, S., Reddy, K.J., Ramachandran, S., Matsunaga, T., Haynes, L. and Ikemoto, H. 1983. “Progress in research toward outdoor biological hydrogen production using solar energy, sea water, and marine photosynthetic microorganisms.” *Ann. NY. Acad. Sci.* 413 : 514-530.
- Ni, M., Leung D.Y.C., Leung, M.K.H., and Sumathy, K. 2006. “An overview of hydrogen production from biomass.” *Fuel Process Technol.* 87 : 461-472.
- Pansook, S, Incharoensakdi, A, and Phunpruch, S. 2016. “Hydrogen production by immobilized cells of unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece Halophytica* in alginate beads.” *KKU Res. J.* 22(1) : 248-255.
- Pansook, S, Incharoensakdi, A, and Phunpruch, S. 2019. “Enhanced dark fermentative H₂ production by agar-immobilized cyanobacterium *Aphanothece halophytica*.” *Journal of Applied Phycology*.
- Phunpruch, S., Taikhao, S., Incharoensakdi, A. 2016. “Identification of bidirectional hydrogenase genes and their co-transcription in unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*” *J Appl Phycol.* 28 : 967–978.
- Punshon, S. and Moore, R.M. 2008. “Aerobic hydrogen production and dinitrogen fixation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101.” *Limnol. Oceanogr.* 53 : 2749-2753.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rashid N, Song W, Park J, Jin H-F, Lee K. 2009. Characteristics of hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* through cycles of photosynthesis and anaerobic incubation. *J Ind Eng Chem.* 15 : 498-503.
- Rückert, G. V, and Giani, A. 2004 “Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria).” *Revista Brasil. Bot.* 27(2) : 325-331.
- Saeed, F.F.M. and Ibrahim, M.A. 2012. “Hydrogen production by green alga GAF99 in sea water bioreactor: II modeling the effect of temperature.” *Biotechnology.* 11 : 258-262.
- Sagir, E, Alipour, S, Elkahlout, K, Koku, H, Gunduz, U, Eroglu, I, and Yucel, M. 2018. “Biological hydrogen production from sugar beet molasses by agar immobilized *R. capsulatus* in a panel photobioreactor.” : 1-9.
- Sakurai, H. and Masukawa, H. 2007. “Promoting R&D in photobiological hydrogen production utilizing mariculture-raised cyanobacteria.” *Mar. Biotechnol.* 9 : 128-145.
- Shah V, Garg N, Madamwar D (2001) Ultrastructure of the freshwater cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production. *FEMS Microbiol Lett.* 194 : 71-75.
- Sherif, S. A., Barbir, F., Veziroglu, T. N. 2003 “Principles of hydrogen energy production, storage and utilization” *Journal of Scientific & Industrial Research.* 62 : 46-63.
- Simon, R.D. 1977. “Sporulation in the filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. The course of spore formation.” *Arch. Microbiol.* 111 : 283-288.
- Taikhao S, Junyapoon S, Incharoensakdi A, Phunpruch S. 2013. Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *J. Appl. Phycol.* 25 : 575-585.
- Takabe T, Incharoensakdi A, Arakawa K, Yokota S (1988) CO₂ fixation rate and RuBisCO content increase in the halotolerant cyanobacterium, *Aphanothece halophytica*, grown in high salinities. *Plant Physiol.* 88 : 1120-1124.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Fredrik, O., Wünschiers, R., Lindblad, P.. 2002. “Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria” *Microbiology and molecular biology reviews.* 66(1) : 1-20.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tindall DR, Yopp JH, Miller DM, Schmid WE (1978) Physico-chemical parameters governing the growth of *Aphanothece halophytica* (Chroococcales) in hypersaline media. *Phycologia*. 17 : 179–185.
- Turner, J., Sverdrup, G., Mann, M.K., Maness, P.C., Kroposki, B., Ghirardi, M., Evans, R.J. and Blak, D.2008. “Renewable hydrogen production.” *Int. J. Energy. Res.* 32 : 379-407.
- Wanchanthuek, R. 2011. “Hydrogen gas: the expectation to be a promising sustainable energy source” *Burapha Sci. J.* 16(1) : 131-140.
- Wang YZ, Liao Q, Zhu X, Tian X, Zhang C 2010. Characteristics of hydrogen production and substrate consumption of *Rhodospseudomonas palustris* CQK01 in an immobilized-cell photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 101 : 4034-4041.
- Weissman JC, Benemann JR (1977) Hydrogen production by nitrogenstarved cultures of *Anabaena cylindrica*. *Appl Env Microbiol.* 33 : 123-131.
- Zhang L, Shiraiwa, Y, Sui, Z.H. and Zhang, X.C. 2005. “Cloning and characterization of *hox Y* gene from *Arthrospira* and *Spirulina* its application in phylogenetic studies.” *Periodical Ocean Univ. China.* 35 : 1021-1025.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution (Garlick *et al.*, 1977)

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร		

ส่วนประกอบ Stock A 10 เท่า

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	89.40	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	27.05	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	99.73	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบ Stock B 10 เท่า

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
--	-------	-------------

ส่วนประกอบอาหาร BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution

Trace metal mix 1000 เท่า	1	มิลลิลิตร
อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้โดยไม่ขออนุญาต
 'ไม่ว่ากรณีใดๆ' Stock A 10 เท่า 100 มิลลิลิตร
 'ไม่ว่ากรณีใดๆ' Stock B 10 เท่า 100 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution(ต่อ)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	โมลาร์
โซเดียมคาร์บอเนต (Na ₂ CO ₃)	1	มิลลิลิตร
(2 กรัม/100 มิลลิลิตร)		

ส่วนประกอบอาหาร BG11 เสริมด้วย Turk Island salt solution (ต่อ)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	1	มิลลิลิตร
(3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)		
เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท (FeNH ₄ Citrate)	1	มิลลิลิตร
(0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)		

ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับ ปริมาตร โดยปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร สำหรับการเตรียมอาหารแข็งทำได้โดยชั่งส่วนประกอบ ตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลดิบ

ผลของการปรับตัวในอาหารที่ปราศจากไนเตรตต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระของ *A. halophytica*

ตารางที่ ข-1 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในระบบ Two-stage จากเซลล์อิสระของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

Two-stage	การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹ h ⁻¹)	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹)
BG11+T	2.91±0.78	6.43±2.99
1.76 mM	8.44±1.29	50.25±3.12
8.8 mM	2.94±0.34	11.19±2.51
17.6 mM	2.49±0.09	8.10±0.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของชนิดวัสดุตั้งต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*

ตารางที่ ข-2 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของชนิดวัสดุตั้งต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท

ชนิดวัสดุตั้ง	การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹ h ⁻¹)	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹)	
Free cell	BG11+Turks		
	island salt solution	0.44±0.04	2.54±0.09
	Seawater	1.88±0.34	29.78±3.05
Agar	BG11+Turks		
	island salt solution	0.37±0.07	13.57±3.41
	Seawater	1.95±0.28	68.21±3.91
Agarose	BG11+Turks		
	island salt solution	0.71±0.11	4.49±0.70
	Seawater	1.87±0.11	53.87±5.90
Ca-Alginate	BG11+Turks		
	island salt solution	0.21±0.03	3.49±0.92
	Seawater	0.53±0.07	47.81±0.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของความเข้มข้นของอะการ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*

ตารางที่ ข-3 ผลการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของความเข้มข้นของอะการ์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท

ความเข้มข้นของอะการ์		การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹ h ⁻¹)	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹)
1%	BG11+Turks island salt solution	1.32±0.07	13.05±1.30
	Seawater	2.06±0.23	63.93±4.64
1.5%	BG11+Turks island salt solution	1.84±0.32	13.71±0.18
	Seawater	4.05±0.08	68.49±2.97
2%	BG11+Turks island salt solution	2.41±0.35	14.05±0.11
	Seawater	4.71±0.17	72.05±1.11
2.5%	BG11+Turks island salt solution	2.76±0.13	15.93±0.45
	Seawater	5.04±0.18	82.60±5.39
3%	BG11+Turks island salt solution	3.44±0.25	18.51±0.40
	Seawater	5.82±0.53	88.80±6.73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*

ตารางที่ ข-4 ผลของการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท

ความเข้มข้นของเซลล์ (Dry cell weigh mL ⁻¹)	การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹ h ⁻¹)	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹)	
0.2	BG11+Turks island salt solution	1.48±0.04	26.29±0.91
	Seawater	11.20±2.06	95.15±5.95
0.5	BG11+Turks island salt solution	1.43±0.05	23.44±1.52
	Seawater	6.25±0.36	91.43±7.78
1	BG11+Turks island salt solution	0.86±0.08	18.70±0.31
	Seawater	5.86±1.33	88.39±2.26
2	BG11+Turks island salt solution	0.83±0.08	18.22±0.12
	Seawater	5.21±0.57	85.76±2.73
3	BG11+Turks island salt solution	0.79±0.02	18.13±0.11
	Seawater	4.00±1.82	83.56±5.51
5	BG11+Turks island salt solution	0.72±0.01	15.26±0.13
	Seawater	2.21±0.06	43.00±0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* กลับมาใช้ใหม่

ตารางที่ ข-5 การนำเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* กลับมาใช้ใหม่

ครั้งที่		การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹ h ⁻¹)	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹)
1	BG11+Turks island salt solution	4.28±0.07	26.52±0.54
	Seawater	9.31±0.15	97.22±3.50
2	BG11+Turks island salt solution	4.27±0.02	12.68±0.01
	Seawater	7.02±0.06	47.77±0.64
3	BG11+Turks island salt solution	4.23±0.01	7.58±0.32
	Seawater	6.39±0.02	6.84±0.99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่ม (Completely Randomized Design หรือ CRD) นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS ซอฟต์แวร์รุ่น 24 ได้ดำเนินการโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one-way analysis of variance (ANOVA) ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่มีค่า p น้อยกว่า 0.05 ตามด้วยการทดสอบ post hoc ด้วยวิธี Duncan's multiple range test เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล ผลลัพธ์ที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลของไนเตรตต่อการเจริญของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล

ตารางที่ ค-1 ผลของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเซลล์ทั้งหมด (10^6 cell mL ⁻¹)
BG11+Turks Island salt solution	10.96 \pm 0.16 ^d
Seawater	2.99 \pm 0.04 ^e
Seawater + NaNO ₃ 1.76 mM	10.80 \pm 0.41 ^d
Seawater + NaNO ₃ 8.8 mM	11.21 \pm 0.29 ^{cd}
Seawater + NaNO ₃ 17.6 mM	11.55 \pm 0.40 ^c
Seawater + NaNO ₃ 26.4 mM	12.71 \pm 0.22 ^b
Seawater + NaNO ₃ 35.2 mM	13.96 \pm 0.51 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 ผลของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของ โซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเซลล์ทั้งหมด (10^6 cell mL ⁻¹)
BG11+Turks Island salt solution	18.95 ± 0.64 ^g
Seawater	3.09 ± 0.18 ^f
Seawater + NaNO ₃ 1.76 mM	15.09 ± 0.43 ^e
Seawater + NaNO ₃ 8.8 mM	26.33 ± 0.93 ^d
Seawater + NaNO ₃ 17.6 mM	28.19 ± 1.04 ^c
Seawater + NaNO ₃ 26.4 mM	29.87 ± 0.64 ^b
Seawater + NaNO ₃ 35.2 mM	31.70 ± 1.34 ^a

ตารางที่ ค-3 ผลของค่าการดูดกลืนแสงของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของ โซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสง
BG11+Turks Island salt solution	0.58 ± 0.04 ^a
Seawater	0.19 ± 0.019 ^b
Seawater + NaNO ₃ 1.76 mM	0.45 ± 0.02 ^c
Seawater + NaNO ₃ 8.8 mM	0.49 ± 0.013 ^{cd}
Seawater + NaNO ₃ 17.6 mM	0.53 ± 0.01 ^{ad}
Seawater + NaNO ₃ 26.4 mM	0.56 ± 0.03 ^a
Seawater + NaNO ₃ 35.2 mM	0.56 ± 0.05 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-4 ผลของค่าการดูดกลืนแสงของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสง
BG11+Turks Island salt solution	0.95 ± 0.01 ^a
Seawater	0.24 ± 0.01 ^b
Seawater + NaNO ₃ 1.76 mM	0.87 ± 0.02 ^c
Seawater + NaNO ₃ 8.8 mM	0.98 ± 0.01 ^d
Seawater + NaNO ₃ 17.6 mM	0.99 ± 0.01 ^d
Seawater + NaNO ₃ 26.4 mM	1.02 ± 0.01 ^e
Seawater + NaNO ₃ 35.2 mM	1.03 ± 0.03 ^e

ตารางที่ ค-5 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (µg mL ⁻¹)
BG11+Turks Island salt solution	4.62 ± 0.37 ^a
Seawater	0.63 ± 0.02 ^b
Seawater + NaNO ₃ 1.76 mM	3.30 ± 0.09 ^c
Seawater + NaNO ₃ 8.8 mM	3.75 ± 0.03 ^d
Seawater + NaNO ₃ 17.6 mM	3.73 ± 0.03 ^d
Seawater + NaNO ₃ 26.4 mM	3.81 ± 0.07 ^d
Seawater + NaNO ₃ 35.2 mM	4.29 ± 0.25 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-6 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 1.76, 8.8, 17.6, 26.4 และ 35.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
BG11+Turks Island salt solution	9.65 ± 0.20^a
Seawater	0.58 ± 0.05^b
Seawater + NaNO_3 1.76 mM	3.93 ± 0.35^c
Seawater + NaNO_3 8.8 mM	7.93 ± 0.06^d
Seawater + NaNO_3 17.6 mM	8.17 ± 0.48^{de}
Seawater + NaNO_3 26.4 mM	8.62 ± 0.14^{ef}
Seawater + NaNO_3 35.2 mM	8.94 ± 0.21^f

ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล
 ตารางที่ ค-7 ผลของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเซลล์ทั้งหมด ($10^6 \text{ cell mL}^{-1}$)
BG11+Turks Island salt solution	15.88 ± 0.66^a
Seawater + N	14.48 ± 0.20^{ab}
Seawater + N + NaCl 0.25 M	13.15 ± 0.30^b
Seawater + N + NaCl 0.5 M	11.33 ± 0.12^c
Seawater + N + NaCl 0.75 M	9.83 ± 0.20^c
Seawater + N + NaCl 1 M	9.58 ± 0.85^c
Seawater + N + NaCl 2 M	1.50 ± 0.18^d
Seawater + N + NaCl 3 M	1.00 ± 0.08^d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-8 ผลของจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเซลล์ทั้งหมด (10^6 cell mL ⁻¹)
BG11+Turks Island salt solution	23.98 ± 0.01 ^a
Seawater + N	23.33 ± 0.2 ^a
Seawater + N + NaCl 0.25 M	22.65 ± 0.41 ^{ab}
Seawater + N + NaCl 0.5 M	20.98 ± 0.2 ^{abc}
Seawater + N + NaCl 0.75 M	19.95 ± 0.61 ^{bc}
Seawater + N + NaCl 1 M	17.94 ± 0.2 ^c
Seawater + N + NaCl 2 M	2.95 ± 0.26 ^e
Seawater + N + NaCl 3 M	1.58 ± 0.03 ^e

ตารางที่ ค-9 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสง
BG11+Turks Island salt solution	0.58 ± 0.04 ^a
Seawater + N	0.48 ± 0.04 ^b
Seawater + N + NaCl 0.25 M	0.46 ± 0.01 ^{bc}
Seawater + N + NaCl 0.5 M	0.44 ± 0.05 ^{bc}
Seawater + N + NaCl 0.75 M	0.40 ± 0.09 ^{cd}
Seawater + N + NaCl 1 M	0.33 ± 0.02 ^d
Seawater + N + NaCl 2 M	0.11 ± 0.01 ^e
Seawater + N + NaCl 3 M	0.08 ± 0.01 ^e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-10 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสง
BG11+Turks Island salt solution	1.06 ± 0.05 ^a
Seawater + N	0.89 ± 0.03 ^b
Seawater + N + NaCl 0.25 M	0.84 ± 0.01 ^c
Seawater + N + NaCl 0.5 M	0.79 ± 0.01 ^d
Seawater + N + NaCl 0.75 M	0.72 ± 0.01 ^e
Seawater + N + NaCl 1 M	0.66 ± 0.01 ^f
Seawater + N + NaCl 2 M	0.26 ± 0.02 ^g
Seawater + N + NaCl 3 M	0.08 ± 0.00 ^h

ตารางที่ ค-11 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
BG11+Turks Island salt solution	3.85 ± 0.07 ^a
Seawater + N	3.24 ± 0.19 ^b
Seawater + N + NaCl 0.25 M	3.03 ± 0.01 ^{bc}
Seawater + N + NaCl 0.5 M	2.79 ± 0.00 ^c
Seawater + N + NaCl 0.75 M	2.37 ± 0.13 ^d
Seawater + N + NaCl 1 M	2.13 ± 0.03 ^d
Seawater + N + NaCl 2 M	0.38 ± 0.23 ^e
Seawater + N + NaCl 3 M	0.11 ± 0.04 ^e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-12 ผลของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 โมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG 11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
BG11+Turks Island salt solution	10.45 ± 0.00^a
Seawater + N	6.72 ± 0.30^b
Seawater + N + NaCl 0.25 M	6.55 ± 0.17^b
Seawater + N + NaCl 0.5 M	6.50 ± 0.15^b
Seawater + N + NaCl 0.75 M	6.10 ± 0.16^c
Seawater + N + NaCl 1 M	5.37 ± 0.21^d
Seawater + N + NaCl 2 M	1.82 ± 0.01^e
Seawater + N + NaCl 3 M	0.14 ± 0.02^f

ผลของการปรับตัวในอาหารที่ปราศจากไนเตรตต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระของ *A. halophytica*

ตารางที่ ค-13 ผลของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในระบบ Two-stage จากเซลล์อิสระของ *A. halo-phytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ เปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนในน้ำทะเลและอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

การผลิตไฮโดรเจนในระบบ Two-stage	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ($\text{nmol H}_2 \text{ mg Chl a}^{-1}$)
BG11+T	6.43 ± 2.99^c
1.76 mM	50.25 ± 3.12^a
8.8 mM	11.19 ± 2.51^b
17.6 mM	8.10 ± 0.82^{bc}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของชนิดวัสดุตั้งต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*

ตารางที่ ค-14 ผลของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของชนิดวัสดุตั้งต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ

ชนิดของวัสดุตั้ง		อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹)
Free cell	BG11+Turks island salt solution	2.54 ± 0.09 ^e
	Seawater	29.78 ± 3.05 ^c
Agar	BG11+Turks island salt solution	13.57 ± 3.41 ^d
	Seawater	68.21 ± 3.91 ^a
Agarose	BG11+Turks island salt solution	4.49 ± 0.70 ^e
	Seawater	53.87 ± 5.90 ^b
Ca-Alginate	BG11+Turks island salt solution	3.49 ± 0.92 ^e
	Seawater	47.81 ± 0.82 ^b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของความเข้มข้นของอะการต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*

ตารางที่ ค-15 ผลของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของความเข้มข้นของอะการต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *A. halo-phytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ

ความเข้มข้นของอะการ		อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹)
1%	BG11+Turks island salt solution	13.05 ± 1.30 ^a
	Seawater	63.93 ± 4.64 ^d
1.5%	BG11+Turks island salt solution	13.71 ± 0.18 ^e
	Seawater	68.49 ± 2.97 ^{cd}
2%	BG11+Turks island salt solution	14.05 ± 0.11 ^e
	Seawater	72.05 ± 1.11 ^c
2.5%	BG11+Turks island salt solution	15.93 ± 0.45 ^e
	Seawater	82.60 ± 5.39 ^b
3%	BG11+Turks island salt solution	18.51 ± 0.40 ^e
	Seawater	88.80 ± 6.73 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของความเข้มข้นของอะการต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. halophytica*

ตารางที่ ค-16 ผลของอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *A. halo-phytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปราศจากไนเตรท มีหน่วยเป็นนาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ

	ความเข้มข้นของเซลล์ (Dry cell weigh mL ⁻¹)	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (nmol H ₂ mg Chl a ⁻¹)
0.2	BG11+Turks island salt solution	26.29 ± 0.91 ^e
	Seawater	95.15 ± 5.95 ^a
0.5	BG11+Turks island salt solution	23.44 ± 1.52 ^e
	Seawater	91.43 ± 7.78 ^{ab}
1	BG11+Turks island salt solution	18.70 ± 0.31 ^e
	Seawater	88.39 ± 2.26 ^b
2	BG11+Turks island salt solution	18.22±0.12 ^e
	Seawater	85.76±2.73 ^{bc}
3	BG11+Turks island salt solution	18.13±0.11 ^e
	Seawater	83.56±5.51 ^c
5	BG11+Turks island salt solution	15.26±0.13 ^f
	Seawater	43.00±0.01 ^d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้