บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

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

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.2.2 อาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution (ภาคผนวก ข)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV- 50, Japan)

3.3.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)

3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)

3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.3.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory 1375FX, Thailand)

3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z383K, Germany)

3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion Sartorius BP2215, Thailand)

3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)

3.3.9 เครื่องผสมสาร (vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.3.10 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.11 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)

3.3.12 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)

3.3.13 แท่งแม่เหล็กคนสาร (magnetic bar)

3.3.14 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (National Scientific, USA)

3.3.15 เข็มฉีดแก๊ส (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.3.16 เครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu) (GC-15A, Japan)

3.4 วิธีการดำเนินการ

3.4.1 การเจริญและการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 (Rippka *et. al.*, 1979) ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution (Garlick *et. al.*, 1977) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเล โดยนำน้ำทะเลมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้น นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.6 ด้วย HCl และนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution และน้ำทะเล โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน

3.4.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

วัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียโดยนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาเติมเมทานอลปริมาตร 900 มิลลิลิตร vortex เป็นเวลา 45 วินาที ห่อฟอยล์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับเมทานอล 90 เปอร์เซนต์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสมการที่ 3.1 ตามวิธีของ MacKinney (1941)

ปริมาณคลอโรฟิลล์ = 12.7 x ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร x 10 สมการที่ 3.1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph

นำไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลาย จากนั้น กระจายเซลล์ในอาหารใหม่ 10 มิลลิลิตร แล้วปิเปตใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด ห่อฟอยล์ แล้วใช้เข็มฉีดยาเข็มที่ 1 เจาะทางด้านบนของขวดเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวด ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซ พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นคว่ำขวด นำก๊าซในขวดไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph โดยฉีดก๊าซปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่เวลา 2 ชั่วโมงของการบ่ม สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph–Thermal conductivity Detector (GC-TCD)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Gas Chromatograph	
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Column	Pack column 2 m.; Molecular sieve 5A mesh 60/80 (Varian, USA)
Temperature Program	Injector temperature : 100 ^{o}C Oven temperature : 50 ^{o}C (initial temperature), holding at 50 ^{o}C for 5 min, to 100 ^{o}C at 4 ^{o}C/min, holding at 100 ^{o}C for 2 min Detector temperature : 100 ^{o}C
Ar Carrier gas	Flow rate20 ml/min (99.999 % purity) (Praxair, Korea, Co., Ltd.)

3.4.5 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ ในน้ำทะเล

3.4.5.1 การศึกษาผลของไนเตรทต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเล 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ดังนี้ 0, 0.176, 1.76, 17.6

และ 176 มิลลิโมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (C-deprivation เป็น control, Na_2CO_3, glucose, fructose, sucrose, maltose และ lactose) โดยมีจำนวนโมลของคาร์บอนเท่ากันคือ 0.189 ไมโครคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งตรงกับจำนวนโมลคาร์บอนใน อาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution สูตรปกติ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.3 การศึกษาผลของซัลเฟอร์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0, 1.5, 15, 30 และ 150 มิลลิโมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.4 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริม

ด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และเติมโซเดียมคลอไรด์จากความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (เป็นความเข้มข้นโดยประมาณของน้ำทะเล) จนได้ความเข้นข้น 0.75, 1, 2 และ 3 โมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.5 การศึกษาผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีเหล็กไอออนความเข้มข้น 0, 0.4, 4, 40 และ 400 ไมโครโมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.6 การศึกษาผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีนิเกิลไอออนความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 5, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.7 การผลิตไฮโดรเจนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage

การเพาะเลี้ยงแบบ two-stage เป็นการเพาะเลี้ยงที่มี 2 ขั้น ขั้นแรกเป็นการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต โดยเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ ขั้นที่ 1 เป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจน ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้ นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียม

ไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 7 วัน หลังจากนั้น นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 1, 2, 4, 8 และ 10 วัน และนำเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ ไปวัดการผลิตไฮโดรเจน