บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1) เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
2) เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared spectrophotometer) รุ่น Excalibur FTS 3000 ของบริษัท Biorad, USA
3) เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas Chromotography) รุ่น GC Simdist 3800 ของบริษัท Varian, USA
4) เครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Agarose Gel Electrophoresis Apparatus) รุ่น Gelmate 2000 ของ บริษัท Toyobo, Japan
5) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) รุ่น Gene Amp PCR system 2400 ของบริษัท Applied Biosystem, USA
6) เครื่องอ่านเจล (Gel Reader) ของบริษัท Biorad, USA
7) กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
8) กล้องจุลทรรศน์ชนิด 3 ตา (Triocular compound microscope) รุ่น BX51 ของบริษัท Olympus, Japan
9) กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope) รุ่น JSM 5800 LV ของบริษัท Jeol, Japan
10) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงปรับความเย็น (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น J 2-21 ของบริษัท Beckman, USA
11) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบตั้งโต๊ะ (Superspeed table-top centrifuge) รุ่น Biofuge Stratos ของบริษัท Sorvall, USA
12) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณน้อยแบบตั้งโต๊ะ (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan
13) เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Rotary vaccuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan

14) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA

15) หม้อนึ่งความดันไอฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy, Japan

16) เครื่องเขย่า (Orbital Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA

17) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA

18) ตู้อบ (Hot air Oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany

19) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany

20) ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U356 D ของบริษัท Sanyo, Japan

21) เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland

22) เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland

23) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybernatics, Singapore

24) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA

25) เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ระบบรีเวอร์สออซโมซิส รุ่น Option 3A ของบริษัท Elga, England

26) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Indutries, USA

27) เครื่องอุ่นสารละลาย (Dry-block heater) รุ่น TDB-120 ของบริษัท Biosan, Korea

28) ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์

1) สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton X-100)(OctylPhenoxyPolyethoxy Ethanol) ของบริษัท Sigma, USA
2) สารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมเทค 307 (Chemtec 307 Dispersant) ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ กองทัพเรือ
3) น้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จากบริษัทไทยออยล์จำกัด ประเทศไทย
4) น้ำมันดีเซลหมุนช้า จากเรือหลวงรัตนโกสินทร์ กองเรือฟริเกตที่ 1 กองเรือยุทธการ
5) น้ำมันเครื่องยนต์เรือใช้แล้ว จากเรือตรวจการณ์ชายฝั่ง หมายเลข 221 กองเรือตรวจอ่าว กองเรือยุทธการ
6) คีโรซีน (Kerosene) หรือน้ำมันก๊าด จากกรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ กองทัพเรือ
7) น้ำมันปาล์ม บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
8) น้ำทะเลฝั่งอ่าวไทย จากบริเวณชายหาดดงตาล กองเรือยุทธการ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
9) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England
10) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
11) เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May and Baker, Germany
12) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
13) โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) ของบริษัท Riedel, Germany
14) โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
15) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต($(NH_4)_2HPO_4$) ของบริษัท May and Baker, Germany
16) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
17) ทริปโตน (Tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
18) แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
19) สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
20) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) จากสถาบันพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
21) แบคโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
22) กลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, Germanyories, USA

23) อิโนซิทอล (Inositol) ของบริษัท Sigma, USA

24) แคสซิโตน (Casitone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

25) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) ของบริษัท Merck, Germany

26) ทริสมาเบส (Trisma base ; Tris[hydroxymetyhl] aminomethane)($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA

27) ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, USA

28) ฟีนอลเรด (Phenol red) ของบริษัท Carlo Erba, Italy

29) โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous NA_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany

30) คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ของบริษัท Mallinckrodt, USA

31) คาร์บอนไดซัลไฟด์ (CS_2) ของบริษัท Merck, Germany

32) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท Lab-scan, Ireland

33) เมทานอล (Methanol) ของบริษัท Merck, Germany

34) เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท Merck, Germany

35) เฮกเซน (Hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท Merck, Germany

36) ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) (C_6H_{12}) ของบริษัท May and Baker, Germany

37) โดเดกเคน (Dodecane) ($C_{12}H_{26}$) ของบริษัท Acros Organics, USA

38) เฮกซะเดกเคน (Hexadexane) ($C_{16}H_{34}$) ของบริษัท Acros Organics, USA

39) แอนทราซีน (Anthracene) ($C_{14}H_{10}$) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan

40) ไดเบนโซ [เอ] ไพรีน (Dibenzo[*a*] pyrene) ($C_{24}H_{14}$) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan

41) พาราฟินออย (Paraffin oil) ของบริษัท Carlo Erba, Italy

42) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท Merck, Germany

43) โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck, Germany

44) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England

45) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) ของบริษัท JT Baker, USA

46) ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany

47) เฟอรัส ลฟ่า ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany

48) โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany

49) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany

50) โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4.2H_2O$) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England

51) แคลเซียมแพนโนทีเนต (Cacium Pantothenate) ของบริษัท Sigma, USA

52) อีดีทีเอ (EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA

53) กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท Merck, Germany

54) กรดฟอสเฟอริก (H_3PO_4) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England

55) กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (*p*-Aminobinzoic acid) ของบริษัท Sigma, USA

56) กรดโฟลิก (Folic acid) ของบริษัท Sigma, USA

57) โบโอติน (Biotin) ของบริษัท Sigma, USA

58) ไนอาซิน (Niacin) ของบริษัท Sigma, USA

59) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ของบริษัท Sigma, USA

60) ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl) ของบริษัท Sigma, USA

61) ไพโรดอกซิน ไฮโดรคลอไรด์ (Pyrodoxine-HCl) ของบริษัท Sigma, USA

62) อาหารเลี้ยงเชื้อแมกคอนกี (MacConkey agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

63) อาหารเลี้ยงเชื้อบลัดอะการ์ (Blood Agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

64) อาหารเลี้ยงเชื้อทริปเปิลชูการ์ไอร์ออน (Triple Sugar Iron (TSI) agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

65) อาหารเลี้ยงเชื้อยูรีเอส (Urease broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

66) อาหารเลี้ยงเชื้อไลซีนไอร์ออน (Lysine Iron Agar ;LIA) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

67) อาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็ม-ไอ-โอ (Motility Indole Ornithine (MIO) medium) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

68) อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็ม-อาร์-วี-พี (Methyl Red Voges-Proskaver (MRVP) Broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

69) อาหารเลี้ยงเชื้อซิมมอนซิเตรต (Simmon Citrate medium) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

70) อาหารเลี้ยงเชื้อเอสคิวลิน (Esculin Agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

71) ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล (DNA elute kit) ของบริษัท Quigen, USA

72) บรอมฟีนอลบลู (Bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany

73) *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA

74) Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA

75) โปรตีเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Qiagen, Germany

76) ดีเอ็นทีพี (dNTP; Deoxynucleotidetriphosphate) ของบริษัท Promega, USA

77) โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (Oligonucleotide Primer) ของหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

78) อะกาโรสเจล (Agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan

79) 1 kb DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, USA

80) CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), [$C_{16}H_{32}N(CH_3)_3)Br$] ของบริษัท TCI-EP, Japan.

81) SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan

82) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamylalcohol) ของบริษัท Merck, Germany

83) ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ของบริษัท Merck, Germany

84) เอทิเดียมโบรไมด์ (EtBr) ของบริษัท Sigma, USA

85) ชุดพิสูจน์ชนิดแบคทีเรีย (Rapid Bacterial Identification kit) รุ่น GN2 Microplate ของบริษัท Biolog, USA

86) กระดาษกรอง 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, USA

87) ชุดกรองขนาด 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, USA

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยทุกชนิดเป็นประเภทเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade) หรือดีกว่า

จุลินทรีย์

ในงานวิจัยนี้มีการใช้แบคทีเรีย จำนวน 2 สายพันธุ์ ดังนี้

1) ***Pseudomonas aeruginosa*** สายพันธุ์ A41 สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิด (Rhamnolipid) ซึ่งคัดแยกได้ในงานวิจัยของ อารีย์ กังฉิน (2542) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) ***Bacillus subtilis*** สายพันธุ์ BBK1 สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน (Surfactin) ซึ่งคัดแยกได้ในงานวิจัยของ นิรันดร์ รุ่งสว่าง (2542) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากทรายทะเลที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ

3.1.1 การเก็บตัวอย่างทรายทะเล

เก็บตัวอย่างทรายทะเล บริเวณต่างๆ ที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียม น้ำมันเครื่องยนต์ คราบไขมัน หรือบริเวณใกล้เคียงกับที่จอดเรือท่องเที่ยว หรือ เรือประมง จากชายหาดท่องเที่ยว 2 แห่งได้แก่ ชายหาดพัทยา จ.ชลบุรี และ ชายหาดหัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ โดยเก็บตัวอย่างบริเวณละ 6 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 วิธีการเก็บโดยขุดทรายผิวหน้าชายหาดลึกประมาณ 2 – 5 ซม. ตัวอย่างน้ำทะเลเก็บที่ระดับความลึกประมาณ 30 ซม. เก็บทรายหรือน้ำทะเลตัวอย่างไว้ในภาชนะบรรจุที่ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ.จนกว่าดำเนินการแยกเชื้อ

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างทรายทะเล เพื่อนำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ

1. ทรายทะเล ชายหาดหัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	2. ทรายทะเล ชายหาดพัทยา จ.ชลบุรี
1.1 ร้านอาหารหาดทราย	2.1 ศาลเจ้าพ่อเกศงาม พัทยาเหนือ
1.2 สะพานปลา	2.2 โรงแรมฮาร์ดร็อค พัทยากลาง
1.3 สถานีสมุทรศาสตร์	2.3 รอยัลการ์เด้นท์พลาซ่า พัทยาใต้
1.4 อาคารรับรองนาวีภิรมย์	2.4 สะพานปลา พัทยาใต้
1.5 ภัตตาคารลมทะเลชีฟู้ด	2.5 ป้อมตำรวจจอมเทียน
1.6 น้ำทะเลบริเวณสะพานปลา	2.6 น้ำทะเลบริเวณพัทยาใต้

3.1.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ ตามวิธีของ Atlas และ Bartha (1975) และ Rice และ Hemmingsen (1997)

นำตัวอย่างทรายทะเล ที่มีการปนเปื้อนของคราบน้ำมันปริมาณ 10 กรัม หรือตัวอย่างน้ำทะเล ปริมาตร 10 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว BH (Bushnell - Hass medium) ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ หรือ BH sea (ภาคผนวก ก หมายเลข1) ปริมาตร 100 มล.ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. แล้วเติมน้ำมันดิบ 0.5 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวแล้ว

เพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 5 วัน สังเกตดูว่าอาหารขุ่นมากขึ้น ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเจริญจุลินทรีย์ให้มากขึ้นต่อไป โดยถ่ายอาหารที่มีเชื้อลงในอาหารเหลว BH sea และ น้ำมันดิบ 0.5 % ที่เตรียมใหม่ ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ความเข้มข้นเหมาะสม แล้วจึงใส่จานเพาะเชื้อ เททับด้วยอาหารแข็ง BH sea ที่มีน้ำมันดิบปกคลุม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ. จนกว่าเชื้อจะมีการเจริญเป็นโคโลนีบนผิวหน้าของอาหาร ซึ่งแสดงว่าเชื้อมีความสามารถย่อยน้ำมันดิบได้ แล้วจึงคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ หรือไอโซเลตที่มีความสามารถในการย่อยสลายคราบน้ำมัน โดยสังเกตลักษณะโคโลนี การเจริญบนอาหาร ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม ของแต่ละไอโซเลตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้เก็บไว้ในอาหารเหลว NB (Nutrient Broth) ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ หรือ NB sea (ภาคผนวก ก หมายเลข2) ที่เติมกลีเซอรอล ในอัตราส่วน 1 :1 (ปริมาตร ต่อปริมาตร) บรรจุในหลอดฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสาร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ถึง -70 °ซ. เก็บรักษาไว้ได้ 1 ปี หรือเก็บไว้หลอดเอียงหรือจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง NA (Nutrient Agar) ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ หรือ NA sea (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 °ซ. จะเก็บรักษาไว้ได้ 1 เดือน

3.2 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของทรายทะเล และน้ำทะเล และน้ำมันดิบ ที่นำมาใช้ในการวิจัย

3.2.1 การวิเคราะห์ตัวอย่างทรายทะเล และน้ำทะเลที่นำมาใช้ในการวิจัย

ทรายทะเล และน้ำทะเลที่นำมาใช้ในการวิจัย จำนวน 5 ตัวอย่าง ดังนี้

1) ทรายทะเล ชายหาดหัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
2) ทรายทะเล ชายหาดพัทยา จ.ชลบุรี
3) น้ำทะเล ชายหาดหัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
4) น้ำทะเล ชายหาดพัทยา จ.ชลบุรี
5) น้ำทะเล ชายหาดดงตาล อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี

ตัวอย่าง ทรายทะเลหมายเลข 1) และ 2) เก็บรักษาไว้ที่ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เพื่อใช้ตลอดการวิจัย และ น้ำทะเล ชายหาดดงตาล อ.สัตหีบ นำมาผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ที่ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เพื่อใช้ตลอดการวิจัย

รายการวิเคราะห์ ของตัวอย่างทรายทะเล และน้ำทะเล มีดังนี้

1) ลักษณะทราย

ลักษณะของทรายทะเลที่นำมาใช้ในการวิจัย ดังรูปที่ 3.1

2) ค่าความเค็ม (Salinity)

วิเคราะห์หาปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ด้วยเครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์ (Refractometer)

3) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

วิเคราะห์ด้วย เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

4) ปริมาณไนโตรเจน

วิเคราะห์หา Total Kjedahl Nitrogen (TKN) โดยวิธี Macro Kjedahl

5) ปริมาณฟอสฟอรัส

วิเคราะห์หาปริมาณอนินทรีย์ฟอสเฟต โดยวิธี Bray II

6) ปริมาณโปแตสเซียม

วิเคราะห์ด้วยเครื่องเฟลมโฟโตมิเตอร์ (Flamephotometer)

7) ปริมาณสารอินทรีย์ (Organic matters)

วิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Walkley-Black method โดยคำนวณเทียบกับปริมาณไนโตรเจน

8) ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน (Organic carbon)

วิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Wooduff 's method โดยคำนวณเทียบกับปริมาณไนโตรเจน

9) ปริมาณไขมัน และน้ำมัน (Total Oil and Grease)

วิเคราะห์หาปริมาณไขมัน และน้ำมัน โดยวิธีชั่งน้ำหนัก (Partition Gravimetric)

10) ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (Total Petroleum Hydrocarbon)

วิเคราะห์หาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer)

รายการวิเคราะห์หมายเลข 3) ถึง 8) ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร โดยส่งตัวอย่างทรายทะเล ตัวอย่างละ 500 กรัม และตัวอย่างน้ำทะเล ตัวอย่างละ 1 ลิตร

รูปที่ 3.1 ทรายทะเล บริเวณชายหาดหัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ ชายหาดพัทยา จ.ชลบุรี ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่นำมาใช้ในการวิจัย

น้ำมันดิบที่นำมาใช้ในการวิจัย เป็นน้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จากบริษัทไทยออยล์จำกัด ประเทศไทย ดังรูปที่ 3.2 ก่อนนำมาใช้ในงานวิจัยนำมาผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอนในชุดกรองที่ปลอดเชื้อ แล้วบรรจุในภาชนะที่ปลอดเชื้อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ตลอดการวิจัย จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์ดังนี้

3.2.2.1 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared spectrophotometer) หรือ FTIR

เพื่อหาองค์ประกอบ และหมู่ฟังก์ชันของน้ำมันดิบ อันได้แก่ กลุ่มอัลเคน (alkane) และ กลุ่มอะโรมาติก (aromatic)ตามวิธีของ Greenberg และคณะ(1992) และ Nollet (2000)

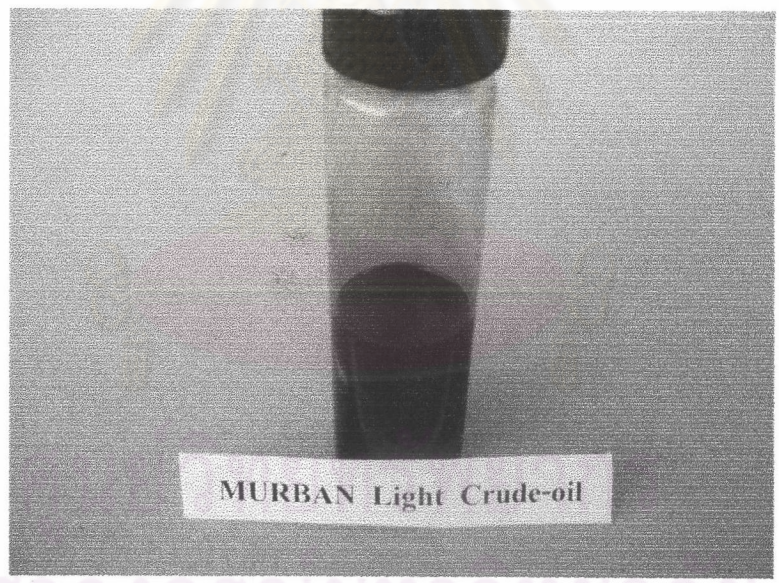
ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง ต้องทำ background apsorption ก่อนเสมอ โดยใช้คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น ZnSe window แล้วประกบด้วย window อีกแผ่นหนึ่ง ใส่ใน Cell Holder แล้วนำไปเข้าเครื่อง แล้วตั้งค่าดูดกลืนแสงอินฟาเรด (IR absorbance) ที่ช่วงคลื่น (Wave Number) 4,000-500 ซม.$^{-1}$ ตั้งเวลาในการวิเคราะห์สารตัวอย่างละ 20 วินาที ก่อนและระหว่างการวิเคราะห์ต้องปล่อยก๊าซไนโตรเจนเข้าเครื่องทุกๆ 30 นาที เพื่อกำจัดการรบกวนของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้น หลังจากทำ background apsorption แล้วจึงทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันดิบ ใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วทำตามเหมือนขั้นตอนข้างต้น นำค่าอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้ มาแปรผลหาองค์ประกอบและหมู่ฟังก์ชันของน้ำมันดิบ โดยใช้โปรแกรม Biorad Merlin

3.2.2.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromotography)

เพื่อหาปริมาณและชนิดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จำนวนคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบ ตามวิธีของ Greenberg และคณะ(1992) และ Nollet (2000)

นำตัวอย่างน้ำมันดิบละลายในคาร์บอนไดซัลไฟด์ (CS_2) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง GC ซึ่งติดตั้งคอลัมน์ชนิด capillary column DB-5 และ Flame Ionization Detector (FID) สภาพการวิเคราะห์ดังนี้ อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (injector) เท่ากับ

295°ซ. อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ เท่ากับ 320°ซ. อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ เท่ากับ 30°ซ. ทำการเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 °ซ.ต่อนาที จนอุณหภูมิสุดท้ายของคอลัมน์ เท่ากับ 320°ซ. คงที่เป็นเวลา 28 นาที และใช้ก๊าซฮีเลียม เป็นตัวพา นำผลแก๊สโครมาโตรกราฟีโครมาโตแกรมที่ได้มาแปรผลหาปริมาณและชนิดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จำนวนคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบ เปรียบเทียบกับ Retention Time ของสารมาตรฐานปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของอัลเคน 32 ชนิด ที่มี C_5-C_{36} (Pentane C_5 H_{12}-Hexatricontane,$C_{36}H_{74}$) และพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 6 ชนิด Acenaphthene, Fluorene , Anthracene, Fluoranthene, Pyrene และ Chrysene ที่ใช้ภาวะต่างๆอย่างเดียวกันโดยใช้โปรแกรม Simdist Varian Postpro



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.2 น้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จากบริษัทไทยออยส์ จำกัด ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้

3.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกไว้

ศึกษาการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกไว้ ทั้งหมด 6 ไอโซเลต คือ HU1, HU2, HU3, PA214, PA226 และ PA415 แล้วนำผลการศึกษาที่ได้ไว้สำหรับการเลือกใช้ไอโซเลตที่มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบ เพื่อนำไปศึกษาการจำแนกชนิดแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน และ การย่อยสลายน้ำมันดิบโดยไอโซเลตชนิดนี้เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ต่อไป

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อของแต่ละไอโซเลต ตามวิธีของ Venosa และคณะ (1997) และ Rahman และคณะ (2002)

โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของไอโซเลต จากจานอาหารแข็ง BH sea ที่มีน้ำมันดิบปกคลุม ลงในอาหารเหลว LB (Luria Bertani) ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ หรือ LB sea (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ปริมาตร 50 มล.ในขวดเคลทท์ฟลาส์ก (Klett flask) ขนาด 250 มล.นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 6-12 ชม. (แล้วแต่ชนิดของไอโซเลต) หรือจนกว่าสามารถวัดความขุ่นของอาหารที่มีแต่ละเชื้ออยู่ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.05 (จะมีเชื้อประมาณ 10^6 CFU ต่อ มล.)

นำขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุทรายที่ปลอดเชื้อ 5 กรัม เติมน้ำมันดิบปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในทราย หลังจากนั้นจึงเติม อาหารเหลว BH sea ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มล. (ความเข้มข้นของน้ำมันดิบเป็น 1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วใส่หัวเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มล. (หรือ 2 %) ลงไป โดยทรายทะเลหัวหิน เติมหัวเชื้อรหัส HU และทรายทะเลพัทยา เติมหัวเชื้อรหัส PA นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 8 วัน ทุกชุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่ 0 ถึง 8 วัน แต่ละเวลาจะมีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุดควบคุมที่ 1 (control 1) เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายน้ำมันดิบเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพ (Abiotic Degradation) โดยไม่มีการเติมหัวเชื้อลงไปในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ ส่วนชุดควบคุมที่2 (control 2) เป็นชุดควบคุมการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต เมื่อไม่มีการเติมน้ำมันดิบลงในอาหารเหลว BH sea

3.3.2 การศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต

ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตตามวิธีในข้อ 3.3.1 และนับเซลล์โดยวิธี viable plate count ตามวิธีของ Vankateswaran และ คณะ (1995)

โดยการดูดอาหารที่มีเชื้อ มาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ความเข้มข้นเหมาะสม แล้วจึงใส่จานเพาะเชื้อ เททับด้วยอาหารแข็ง LB sea เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ.

3.3.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต

3.3.3.1 การสกัดน้ำมันดิบออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีของ Greenberg และคณะ(1992) และ Nollet (2000)

เติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ปริมาตร 10 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารปริมาตร 50 มล.ที่มีเชื้อ เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้นเป็นเวลา 10-15 นาที จะเห็นชั้นล่างเป็นชั้นของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ซึ่งเป็นตัวทำละลายน้ำมันดิบ ดูดสารละลายชั้นล่างนี้เก็บไว้ ทำการสกัดน้ำมันดิบซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยการเติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ครั้งละปริมาตร 5 มล. จากนั้นนำตัวทำละลายน้ำมันดิบที่สกัดได้ มากำจัดน้ำโดยการกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous NA_2SO_4) แล้วใส่หลอดฝาเกลียวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 °ซ.จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในน้ำมันดิบ โดยวิธี IR spectrophotometry ด้วยเครื่อง FTIR

3.3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ในน้ำมันดิบ โดยวิธี IR spectrophotometry ด้วยเครื่อง FTIR ตามวิธีของ Greenberg และคณะ (1992) และ Nollet (2000)

เตรียมชุดควบคุม โดยเติมน้ำมันดิบลงในอาหารเหลว BH sea ให้มีความเข้มข้น เป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% โดยปริมาตร แล้วทำการสกัดน้ำมันดิบในอาหารเหลว

ด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ตามขั้นตอนเดียวกับชุดทดลอง แล้วจึงนำสารละลายที่สกัดได้ ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR ตามขั้นตอนข้อ 3.2.2.1 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงอินฟาเรด (IR absorbance) ในช่วงคลื่น (Wave Number) 4,000-500 ซม.$^{-1}$ ซึ่งอินฟราเรดสเปคตรัมของน้ำมันดิบจะมีพีคเด่น อยู่ที่ช่วงคลื่น 2,936-2,916 ซม.$^{-1}$ และ 2,863-2,843 ซม.$^{-1}$ (ได้จากผลการศึกษาข้อ 3.2.2.1) ค่าดูดกลืนแสงอินฟาเรดที่ช่วงคลื่นในพีคเด่นนี้ ของแต่ละความเข้มข้น นำมาทำกราฟมาตรฐานของน้ำมันดิบเมอร์บาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) สำหรับใช้คำนวณเทียบหาปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่

การหาปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ (residual oil) คิดเป็นร้อยละหรือเปอร์เซ็นต์ เท่ากับ [ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในชุดทดลองในแต่ละวัน / ปริมาณน้ำมันดิบที่มีอยู่ในวันที่ 0] x 100

การหาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ (% Degradation) เท่ากับ [(ปริมาณน้ำมันดิบที่มีอยู่ในวันที่ 0 – ปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ในแต่ละวัน) / ปริมาณน้ำมันดิบที่มีอยู่ในวันที่ 0] x 100

3.3.3.3 การวิเคราะห์ชนิดของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีการย่อยสลายไปในน้ำมันดิบ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas Chromotography) ตามวิธีของ Greenberg และคณะ (1992) และ Nollet (2000)

นำสารละลายน้ำมันดิบที่สกัดได้ จากข้อ 3.3.3.1 ไประเหยแห้งสูญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °ซ. เพื่อทำให้เข้มข้นขึ้นและกำจัดคาร์บอนเตตระคลอไรด์ออกไป เติมคาร์บอนไดซัลไฟด์ (CS_2) ปริมาตร 1 มล. นำสารละลายที่ได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ตามขั้นตอนข้อ 3.2.2.1 เพื่อหาชนิดไฮโดรคาร์บอน และจำนวนคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันดิบที่มีการย่อยสลายไป

3.3.4 การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต

3.3.4.1 ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต ตามวิธีในข้อ 3.3.2 และ 3.3.3 ติดตามค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) ของอาหารเลี้ยงเชื้อของทุกชุดการทดลอง

3.3.4.2 ศึกษาเพิ่มเติม เพื่อยืนยันการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของแต่ละไอโซเลต โดยการเติมหัวเชื้อของแต่ละไอโซเลต ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว BH sea ปริมาตร 5 มล. ที่เติมน้ำมันดิบเข้มข้น 0.5 % (5 ไมโครลิตรต่อ มล.) และที่มีฟีนอลเรด (Phenol Red) เข้มข้น 24 ไมโครกรัมต่อ มล. ทดสอบในหลอดแก้วขนาด 22 มล.ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ. เป็นเวลา 8 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน ถ้าไอโซเลตสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและมีการเจริญ อาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่นและเปลี่ยนจากสีแดง เป็นสีเหลือง

3.3.5 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม หรือกลุ่มจุลินทรีย์

ศึกษาการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม หรือกลุ่มจุลินทรีย์ (Mixed Culture) 2 กลุ่ม คือ กลุ่มจุลินทรีย์ HU (HU1 +HU2+ HU3) และ กลุ่มจุลินทรีย์ PA (PA214 +PA226 + PA415)

3.3.5.1 เตรียมหัวเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการทดลอง เหมือนข้อ 3.3.1 ทุกประการ แต่การเติมหัวเชื้อ กลุ่มจุลินทรีย์ HU ใช้ไอโซเลต HU1, HU2 และ HU3 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 ปริมาตรไอโซเลตละ 330 ไมโครลิตร ส่วนกลุ่มจุลินทรีย์ PA ใช้ไอโซเลต PA214, PA226 และ PA415 ผสมกันในอัตราส่วน และปริมาตร เช่นเดียวกับกลุ่มจุลินทรีย์ HU

3.3.5.2 ทำการศึกษาการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ และการเปลี่ยนแปลงสี และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของแต่ละกลุ่มจุลินทรีย์ เหมือนข้อ 3.3.2 - 3.3.4

3.3.6 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ของแบคทีเรีย ที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว

แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว 2 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ A41 และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ทำการศึกษาการเจริญ และการย่อยสลายน้ำมันดิบ และการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบ ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 3.3.1 - 3.3.4

3.4 การจำแนกทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) ของไอโซเลตที่คัดแยกได้

3.4.1.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลตที่คัดแยกได้ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลตที่คัดแยกได้ ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของไอโซเลต ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชม.) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มล. ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มก.ต่อมล. (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมล. ของโปรตีนเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชม. แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโพรพานอลทิ้ง

แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มล. ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มก.ต่อ มล. (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 4°ซ.

3.4.1.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามี อาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง ความเข้มข้นของดีเอ็นเอคำนวณหาจาก

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมล.) เท่ากับ A_{260} x 50 x dilution factor

3.4.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.1.1 โดยปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

ไพร์เมอร์คู่ที่ 1 forward primer 10f 5'- AGTTTGATCATGGCTC -3'
reverse primer 1540r 5'- AAGGAGGTGATCCAGCC -3'

ไพร์เมอร์คู่ที่ 2 forward primer 350f 5'- TACGGGAGGCAGCAG -3'
reverse primer 1240r 5'- CCATTGTAGCACGTGT -3'

ในปฏิกิริยา PCR มีส่วนผสมสาร ความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัวสำหรับการเพิ่มปริมาณ 16S ribosomal DNA ของไอโซเลตที่สกัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มจำนวน 16Sr DNA

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$	25 mM	3	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 x	5	1 x
ไพร์เมอร์ 10f	50 µM	1	1.0 µM
ไพร์เมอร์ 1540r	50 µM	1	1.0 µM
dNTP	2 mM	5	200 µM
Taq DNA polymerase	1 U/ µl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ (template)	1 pg -1 µg/µl	1	1 pg -1 µg
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		32.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

ตั้งโปรแกรมในการทำปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ.	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ.	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	46°ซ.	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ.	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ.	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1xTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ (chamber) เทบัฟเฟอร์ 1xTAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า โดยอาจจะปรับปริมาตรด้วยน้ำในกรณีใช้ปริมาตรของดีเอ็นเอน้อย หยอดสารผสมลงในช่องวิ่งและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จากนั้นทำอีเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ดังนี้ ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10

ไมโครกรัมต่อมล. (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.4.1.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ในข้อ 3.4.1.3) มาแยกชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ออกจากอะกาโรสด้วย ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล (Quigen DNA elute kit) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG (Quigen) ปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที หรือกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมดได้เป็นสารละลายใสสีเหลือง นำสารละลายดังกล่าวใส่ใน QIA quick spin column (Quigen) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้องเทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มล.ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มล. ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่เหลือติดคอลัมน์ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงกลางแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส (ประมาณ 100 ไมโครลิตร) เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °ซ.

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยนำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 40 ไมโครลิตร ส่งไปวิเคราะห์ที่ หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้ไพร์เมอร์ดังนี้คือ forward primer 10f, forward primer 350f, reverse primer 1540r และ reverse primer 1240r นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ประมาณ 1,400-1,500 bp มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GeneBank ด้วยโปรแกรม BlastN ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm. nih.gov/ เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ที่ได้ จะนำมาใช้ในการจำแนกชนิดแบคทีเรีย (Bacterial genera and species) ของไอโซเลตที่คัดแยกได้

3.4.2 การศึกษาลักษณะของไอโซเลตที่คัดแยกได้ ทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมี

3.4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง NA sea ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 3 -4 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี และการเจริญบนอาหาร หลังจากนั้นทำการย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธีย้อมสีแกรม (Gram's Staining) เพื่อศึกษารูปร่าง และลักษณะการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.4.2.2 การศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอก ขนาด และรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BH sea ปริมาตร 50 มล. ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 % นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ.เป็นเวลา 2-3 วัน ถ่ายอาหารเหลวที่มีเชื้อปริมาตร 50 มล. ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 100 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวและน้ำมันดิบ ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ปริมาตร 5 มล. บรรจุในหลอดฝาเกลียว แล้วส่งไปยังศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเตรียมตัวอย่าง ตามวิธีของ Anderson(1951) อ้างถึงในเวคิน นพนิตย์ (2527) และทำการถ่ายภาพลักษณะโครงสร้างภายนอก ขนาด และรูปร่าง ของไอโซเลตที่คัดแยกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด หรือ SEM ที่กำลังขยาย 15,000 เท่า

3.4.2.3 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือ การทดสอบทางชีวเคมี (Physiological characteristic and Biochemical Test)

ศึกษาตามวิธีของคู่มือการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย (Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology) ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9 (Holt และคณะ 1994)

เตรียมเชื้อที่มีอายุ 18-24 ชม. เขี่ยโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารชนิดต่าง ๆและทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่

การเจริญในที่มีเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 3, 5 และ 10 % (ในอาหารเหลว LB ที่ pH 7.5 และอุณหภูมิ 30 °ซ.)

การเจริญที่ pH 5.0, 7.5, 9.0 และ 12.0 (ในอาหารเหลว LB sea ที่มีเกลือ 0.5% ที่อุณหภูมิ 30 °ซ.)

การเจริญที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40 และ 55 °ซ. (ในอาหารเหลว LB sea ที่มีเกลือ 0.5% ที่ pH 7.5)

การเจริญบนอาหารแข็ง MacConkey agar, การเจริญบนอาหารแข็ง Blood Agar การเจริญบนอาหารแข็ง Triple Sugar Iron (TSI) agar การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การสร้างเอนไซม์คะตะเลส การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การสร้างเอนไซม์ดีอะมิเนส, การสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส การย่อยสลายเอสคิวลิน การสร้างอินโดล การทดสอบเมทิลเรด การทดสอบวี-พี การใช้ซิเตรท การเคลื่อนที่

การย่อยสลายกลูโคสในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนและภาวะน้ำทะเล (Modified-Oxidative/Fermentative of glucose) ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็ม-โอ-เอฟ (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ.

การใช้ไฮโดรคาร์บอน น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว ชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (ที่ความเข้มข้น 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็ม-โอ-เอฟ ที่มีหลอดดักก๊าซ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ.) ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) โดเดกเคน (Dodecane) เฮกซะเดกเคน (Hexadexane) แอนทราซีน (Anthracene) ไดเบนโซ [เอ] ไพรีน (Dibenzo[a] pyrene) พาราฟินออย (Paraffin oil) น้ำมันดิบ (Murban crude-oil) น้ำมันดีเซล น้ำมันเครื่องใช้แล้ว น้ำมันก๊าด หรือ คีโรซีน (Kerosene) น้ำมันปาล์ม CTAB SDS ไตรตอนเอ็กซ์-100(Triton x-100) เคมเทค 307 (Chemtec 307 Dispersant) แรมโนลิพิด (Rhamnolipid) และ เซอร์แฟคติน (Surfactin)

การทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน จำนวน 95 ชนิด เป็นแหล่งพลังงาน โดยใช้ชุดพิสูจน์ชนิดของแบคทีเรียแกรมลบ GN2 Microplate (Biolog, Rapid Bacterial Identification kit) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

3.5 การศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิว ที่นำมาใช้ในการวิจัย

สารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้ มี 4 ชนิด (รูปที่ 3.3) ดังนี้

1) ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton x-100)
   เป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ
2) เคมเทค 307 (Chemtec 307 Dispersant)
   เป็นสารเคมีขจัดคราบน้ำมันของกองทัพเรือ ที่ใช้ในการขจัดคราบน้ำมันในทะเล
3) แรมโนลิพิด (Rhamnolipid)
   เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ตามวิธีของนพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545)
4) เซอร์แฟคติน (Surfactin)
   เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งผลิตจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ตามวิธีของ นิรันดร์ รุ่งสว่าง (2542)

3.5.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.5.1.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิด (Rhamnolipid)

ตามวิธีของ นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ (2545) การเตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ A41 ที่เก็บรักษาไว้ ลงบนอาหารแข็ง NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ซ.ม. แล้วเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว difine medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) ที่มีน้ำมันปาล์ม 2 % เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 16 ชม. แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโมเมตร มีค่าประมาณ 1 แล้วถ่ายเชื้อ 4% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว difine medium ที่เตรียมไว้ 3 ลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 72 ชม.

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ 72 ชม. นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ได้ส่วนน้ำใสที่ปลอดเซลล์ ไปทดสอบค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว แล้วนำส่วนน้ำใสนี้ มาตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล จนมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °ซ. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว

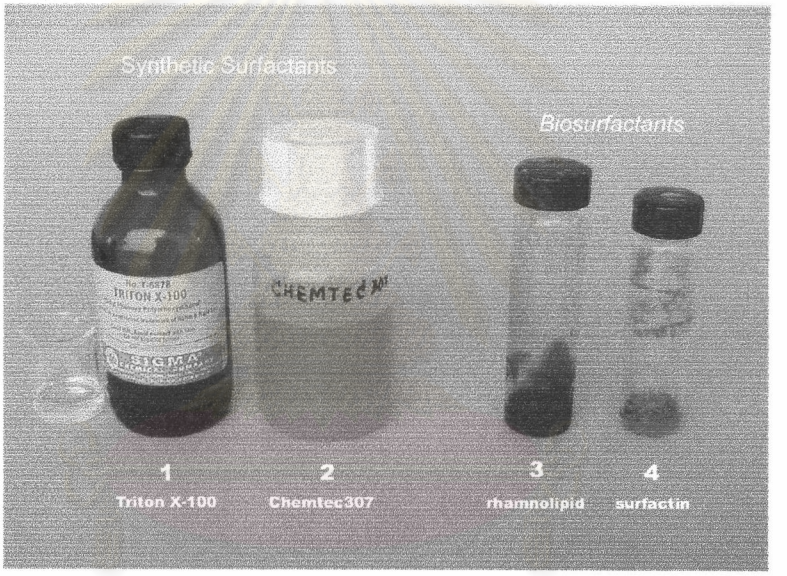
10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอนที่ได้ล้างในน้ำกลั่นที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 จนตะกอนละลายหมดพอดี นำมาสกัดโดยใช้กรวยแยกด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม และ เอทานอล อัตราส่วน 2:1 เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มากำจัดน้ำออกโดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส โดยใส่สารจนกว่าจะเห็นตะกอนสีขาว (น้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์หมด) กรองแยกตะกอนโซเดียมซัลเฟต นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ปราศจากน้ำ ไประเหยแห้งสูญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °ซ. จะได้สารซึ่งมีลักษณะเหนียวหนืด มีสีน้ำตาลไหม้ จากนั้นจึงนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง ในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 4-5 วัน จะได้แรมโนลิพิดที่บริสุทธิ์บางส่วน (Crude Rhamnolipid) เป็นผลึกสีน้ำตาลไหม้ (รูปที่ 3.3 หมายเลข 3)

3.5.1.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน (Surfactin)

ตามวิธีของ นิรันดร์ รุ่งสว่าง (2542) การเตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BBK-1 ที่เก็บรักษาไว้ ลงบนอาหารแข็ง NA เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว LB ดัดแปลง (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% ปริมาตร 50 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 13 ช.ม แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโมเมตร มีค่าประมาณ 2.5 แล้วถ่ายเชื้อ 4% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% ที่เตรียมไว้ 3 ลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 48 ชม.

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ 48 ชม. นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ได้ส่วนน้ำใสที่ปลอดเซลล์ ไปทดสอบค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว แล้วนำส่วนน้ำใสนี้ มาตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล จนมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °ซ. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอนที่ได้ล้างในน้ำกลั่นที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นาน 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนตะกอนมาสกัด โดยใช้

กรวยแยก ด้วยเมธานอล เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มากำจัดน้ำออกโดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ปราศจากน้ำ ไประเหยแห้งสูญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 °ซ. จะได้สารซึ่งมีลักษณะเหนียวหนืด มีสีเหลืองน้ำตาล จากนั้นจึงนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง ในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 4-5 วัน จะได้เซอร์แฟคตินที่บริสุทธิ์บางส่วน (Crude Surfactin) เป็นผลึกสีเหลืองน้ำตาล (รูปที่ 3.3 หมายเลข 4)



รูปที่ 3.3 สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน

เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และสูตรโครงสร้าง สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton x-100) ศึกษาโดย Edwards และคณะ (2003) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิด (Rhamnolipid) ศึกษาโดย Thaniyavam และคณะ (2005) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์แฟคติน (Surfactin) ศึกษาโดย Roongsawang และคณะ (2002) ส่วนสารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมเทค 307 (Chemtec 307 Dispersant) ยังไม่ได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ดังนั้นจึงได้นำมาศึกษาโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR เพื่อหาองค์ประกอบและหมู่ฟังก์ชันของเคมเทค 307

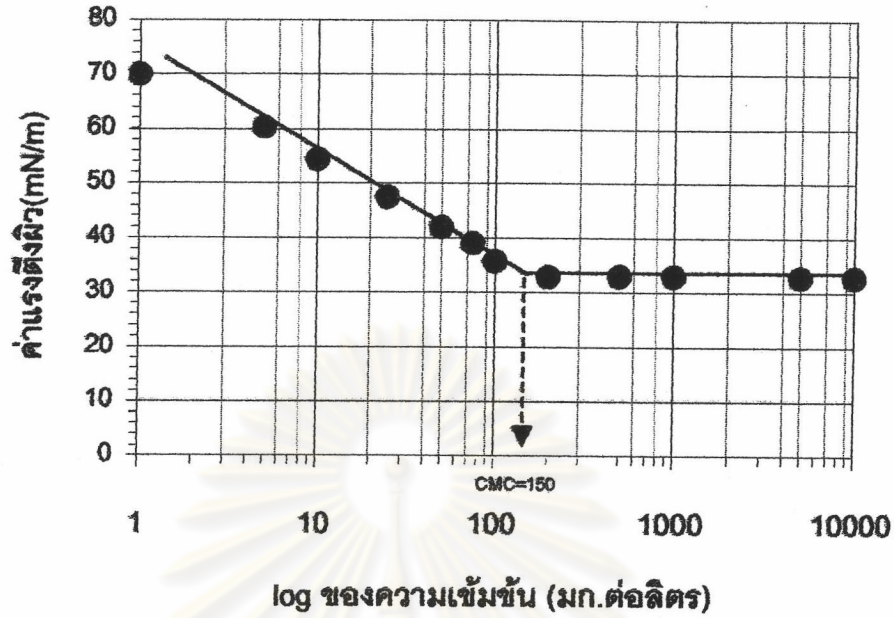
3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว

3.5.3.1 การวัดค่าแรงตึงผิว

ไตรตอนเอ็กซ์-100 และ เคมเทค 307 ปริมาตรละ 10 มล. นำไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) ส่วนแรมโนลิพิด และ เซอร์แฟคติน ที่ผลิตได้ จากข้อ 3.5.1.1 และ 3.5.1.2 ชั่งน้ำหนักอย่างละ 5 มก. ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ทริสบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ปริมาตรละ 10 มล. ปั่นผสมสารให้เข้ากัน นำไปวัดค่าแรงตึงผิว

3.5.3.2 การหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration,CMC)

ตามวิธีของ Duvnjak,Cooper, and Kosaric (1982) โดยเตรียมสารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิด ชั่งน้ำหนักแล้วนำมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 1 - 100,000 มก.ต่อลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าแรงตึงผิว นำค่าที่ได้ไปวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับ ค่า log ของความเข้มข้นของสารละลายลดแรงตึงผิว ตัวอย่างกราฟแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.4 การหาค่า CMC หรือค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ ของสารลดแรงตึงผิว ตามวิธีของ Duvnjak, Cooper, and Kosaric (1982)

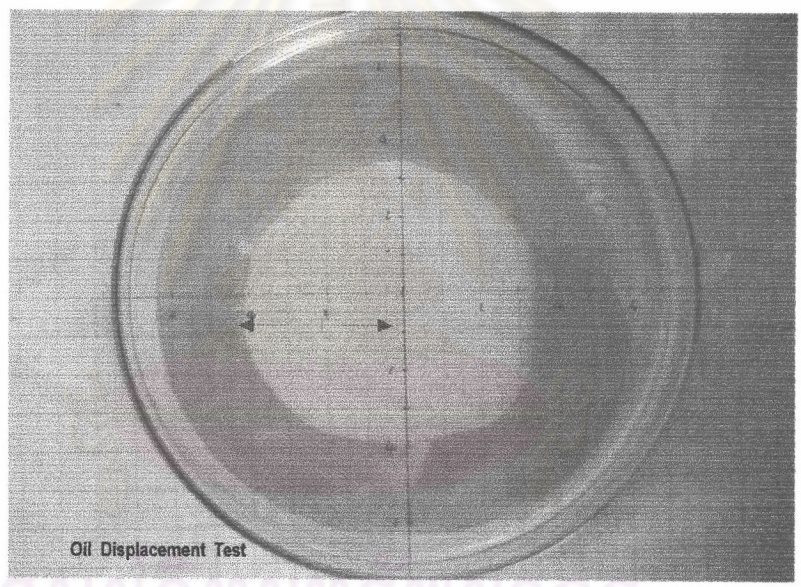
จากกราฟ จุด CMC คือ จุดความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด ที่ทำให้ค่าแรงตึงผิวมีค่าต่ำสุดและเริ่มคงที่ มีค่าเท่ากับ 150 มก.ต่อลิตร

3.5.3.3 การวัดการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)

ตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993) โดยตวงน้ำกลั่นปริมาตร 40 มล. ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ซม. ซึ่งวางทับอยู่บนกระดาษกราฟ เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 ซม.) หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ให้ปกคลุมบนผิวน้ำจะเห็นแผ่นฟิลม์คราบน้ำมัน หยดสารลดแรงตึงผิวที่เจือจางในทริสบัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปตรงจุดกึ่งกลางของวงกลมแผ่นฟิลม์คราบน้ำมัน อ่านความกว้างของบริเวณใสของการกระจายน้ำมัน แล้วมาคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายตัวของน้ำมัน ดังแสดงในรูปที่ 3.5

พื้นที่ของบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมัน มีค่าเท่ากับ πr^2 เมื่อ r คือ รัศมีความกว้างของบริเวณใส (ซม.) และกำหนด 1 ตร.ซม. ของการกระจายตัวของน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

วิธีการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันนี้ จะใช้ได้กับสารที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 10 ไมโครกรัม หรือ 10 นาโนโมลขึ้นไป ดังนั้น ถ้าสารตัวอย่างมีความเข้มข้นมาก ให้เจือจางจนสามารถวัดค่าได้และคูณกลับด้วยความเจือจาง (Dilution Factor)



รูปที่ 3.5 แสดงวิธีการวัดการกระจายตัวของน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 การศึกษาผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลตที่คัดแยกได้

ศึกษาการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลตที่มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่คัดแยกได้ เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดลงไป เปรียบเทียบกับการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว และเพื่อเป็นการศึกษาว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดใดมีประสิทธิภาพดีในการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยไอโซเลตที่คัดแยกได้

3.6.1 การศึกษาผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นที่ค่าการกระจายตัวของน้ำมันเท่ากัน ซึ่งสูงกว่าค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์หรือค่า CMC

3.6.1.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิว

โดยเตรียมสารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิด ชั่งน้ำหนักแล้วนำมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 1 - 100,000 มก.ต่อลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมัน หาความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่สารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิด มีค่าเท่ากันได้ เพื่อนำไปศึกษาการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลตที่คัดแยกได้

3.6.1.2 การเตรียมชุดการทดลอง เพื่อศึกษาผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยไอโซเลตที่คัดแยกได้

เตรียมหัวเชื้อของไอโซเลต์ HU2 ซึ่งมีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่คัดแยกได้จากข้อ 3.4 ที่มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU ต่อ มล. ตามวิธีในข้อ 3.3.1 ใส่หัวเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มล. (หรือ 2 %) ลงไปในอาหารเหลว BH sea ปริมาตร 50 มล. ที่มีทรายทะเลจากแหล่งเดียวกับไอโซเลตที่คัดแยกได้ที่ปลอดเชื้อ 5 กรัม และปนด้วยน้ำมันดิบปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นของน้ำมันดิบเป็น 1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร)

หลังจากนั้นจึงเติมสารลดแรงตึงผิวที่ผ่านการกรองให้ปลอดเชื้อด้วย ชุดกรอง 0.45 ไมครอน ที่ความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่สารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิด มีค่าเท่ากัน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในอาหารเหลว BH sea นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ. เป็นเวลา 4 วัน ทุกชุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก

วันตั้งแต่ 0 ถึง 4 วัน แต่ละเวลาจะมีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุดควบคุมที่ 1 (control 1) เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายน้ำมันดิบเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพและสารลดแรงตึงผิว โดยไม่มีการเติมไอโซเลต HU2 ลงไปในอาหาร ส่วนชุดควบคุมที่2 (control 2) เป็นชุดควบคุมการย่อยสลายน้ำมันดิบเนื่องจากปัจจัยทางกายภาพอย่างเดียว โดยไม่มีการเติมไอโซเลต HU2

ศึกษาการเจริญของไอโซเลตโดยวิธี viable plate count (ตามวิธีข้อ 3.3.2)และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยการสกัดน้ำมันดิบออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันดิบที่เหลืออยู่ ด้วยเครื่อง FTIR และ GC (ตามวิธีข้อ 3.3.3)

3.6.2 การศึกษาผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น เท่ากับค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์

เตรียมสารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์หรือ ค่า CMC (จากผลวิจัยข้อ 3.5.3.2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ผ่านการกรองให้ปลอดเชื้อ ลงไปในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบและหัวเชื้อของไอโซเลต HU2 เช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.2 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 4 วัน ทุกชุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่ 0 ถึง 4 วัน แล้วศึกษาผลการเจริญของไอโซเลต HU2 และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

3.6.3 การศึกษาผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากันและ น้อยกว่าค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์

เตรียมสารลดแรงตึงผิวทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (จากผลวิจัยข้อ 3.5.3.2) และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดที่เท่ากัน ที่ 100 มก.ต่อลิตร (หรือ 0.01%) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ผ่านการกรองให้ปลอดเชื้อ ลงไปในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบและหัวเชื้อของไอโซเลต HU2 เช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.2 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 4 วัน ทุกชุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่ 0 ถึง 4 วัน แล้วศึกษาผลการเจริญของไอโซเลต HU2 และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

3.7 การศึกษาผลของการเติมแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบของไอโซเลตที่คัดแยกได้

เตรียมหัวเชื้อของไอโซเลต HU2 ลงในอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.2 แล้วเติมหัวเชื้อของแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิว *P.aeruginosa* สายพันธุ์ A41 หรือ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU ต่อ มล. ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (หรือ 0.4 %) ลงไปแทนการเติมสารลดแรงตึงผิว

เปรียบเทียบกับผลการเจริญของไอโซเลต HU2 และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป

3.8 การศึกษาผลของธาตุอาหารในอาหาร BH และน้ำทะเลต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ ของไอโซเลตที่คัดแยกได้เมื่อการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป

เลือกสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันดิบ (จากผลวิจัยข้อ 3.6) โดยเตรียมที่ความเข้มข้นเท่ากับค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์หรือค่า CMC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ผ่านการกรองให้ปลอดเชื้อ ลงไปในอาหารเหลวที่มีน้ำมันดิบ 1% โดยปริมาตร มีหัวเชื้อของไอโซเลต HU2 ลงในอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.2 และทรายทะเลที่ปลอดเชื้อ 5 กรัม ดังนี้

ชุดการทดลองที่1 อาหาร BH sea ที่มีน้ำทะเลเข้มข้น 100%

ชุดการทดลองที่ 2 อาหาร BH sea ที่มีน้ำทะเลเข้มข้น 50 %

ชุดการทดลองที่ 3 อาหาร BH (ไม่มีน้ำทะเล และทรายทะเล)

ชุดการทดลองที่ 4 น้ำทะเล (ไม่มีอาหาร BH)

ศึกษาผลการเจริญของไอโซเลต HU2 และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ