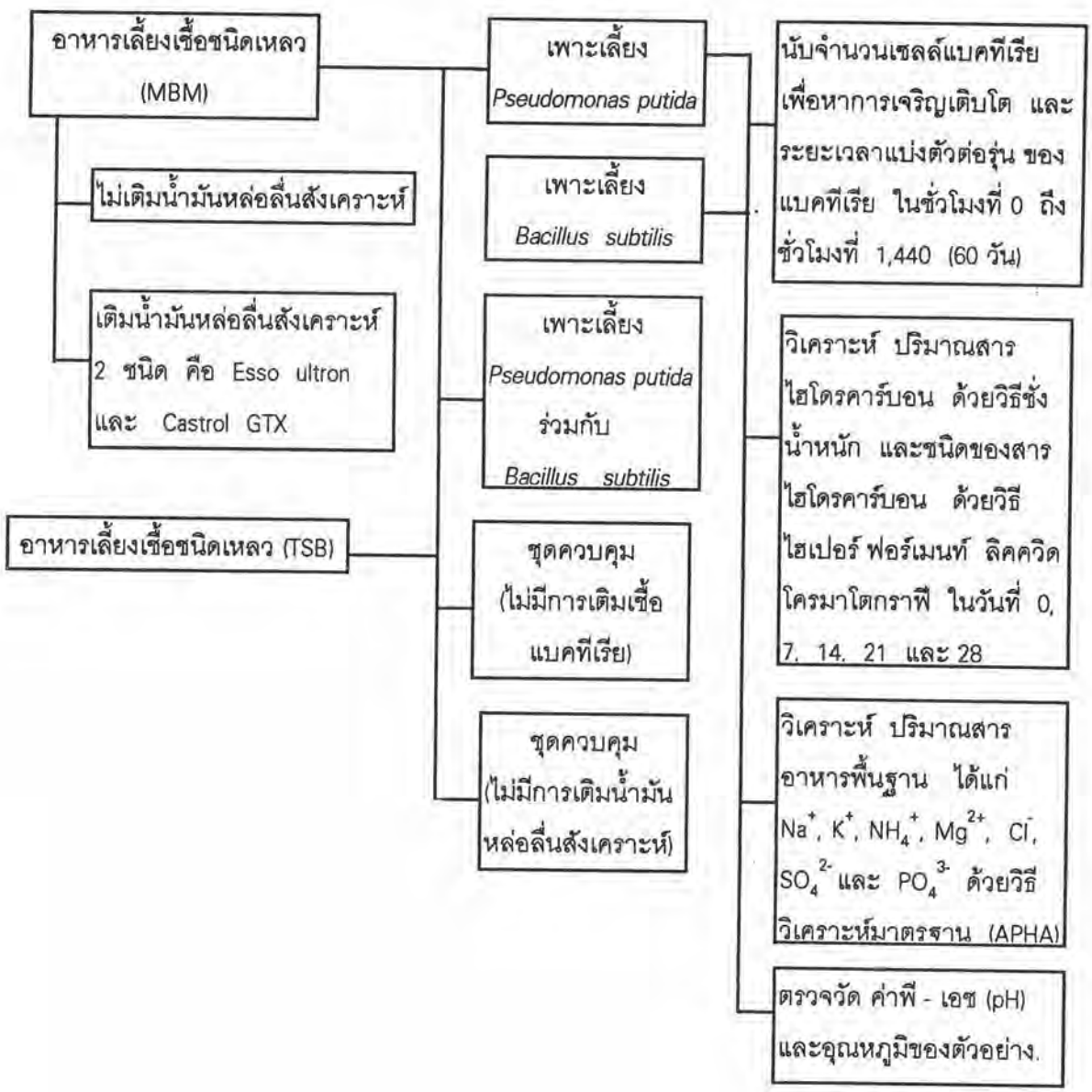
บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 รูปแบบการศึกษา

ในการศึกษาการสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ โดยแบคทีเรียสองชนิด มีรูปแบบการศึกษา ดังแสดงไว้ข้างล่าง



3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ใช้สำหรับแบคทีเรีย

เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเพาะเลี้ยงขนาด 15 x 100 มิลลิลิตร หลอดทดลอง ปิเปต ขวดรูปชมพู่ ขวดวัดปริมาตร บีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้วคน หลอดหยด

เครื่องมือ อุปกรณ์ ได้แก่

1. สำลี กระดาษอลูมิเนียม
2. ตู้อบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave sterilizing),รุ่น HA-3D ของ Tokyo Hirayama manufacturing
3. ตู้อบแห้ง (Hot air sterilizing oven), Memmert รุ่น TU 60 Western Germany.
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Memmert, Western Germany.
5. ตู้เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (Biological Safety Carbinets Nuaire Model NU969 แบบ larminar flow
6. เครื่อง Mixer, รุ่น K - 550 - GE, NO 14609 220 volts, 50 Hz ของ Scientific Industries , USA.
7. เครื่องนับโคโลนี (Darkfield Quebac American optical, รุ่น 3326 ของ NY, USA.
8. เครื่องกวนแท่งคนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer with magnetic bar), ของ Corning Hot-Stir plate, รุ่น PC 351
9. เครื่องเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อ (shaker), รุ่น VRN - 200 K - Gemmy ของ Industrial Coorperation
10. เครื่องวัดพี - เอช พร้อมวัดอุณหภูมิ pH meter) รุ่น F - 11 ของ Horiba, Japan
11. เครื่องชั่งชนิดหยาบ Sartorius รุ่น B - 310 s
12. เครื่องเขย่าล้างหลอดทดลอง รุ่น 320 Branson
13. เตาอบไมโครเวฟ (micro wave) White Westing house

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (Difco, Bacto, Nutrient agar dehydrated)
2. Tryptic soy agar (Difco, Bacto Tryptic soy agar dehydrated)
3. Tryptic soy broth (Difco, Bacto Trypticas soy broth dehydrated)
4. Mineral base medium
5. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (ดังภาคผนวก ฌ)

2. ใช้สำหรับสกัดและตรวจวัดปริมาณสารไฮโดรคาร์บอน

เครื่องแก้ว ได้แก่ กรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร กรวยแก้วกรอง ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ขวด vial ปิเปต แท่งแก้วคน หลอดหยด

เครื่องมือ อุปกรณ์ ได้แก่

1. กระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 42 กระดาษอลูมิเนียม พาราฟิล์ม

2. เครื่องชั่งชนิดละเอียด Sartorius รุ่น B - 2400 s

3. เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary vacuum evaporator ของ Eyela Tokyo Evaporator NE)

4. เครื่องมือ High performance liquid chromatograph ของ Gilson รุ่น 107

5. เตาเผาสาร (Carbolite furances, Bamford, shelflield รุ่น SS02 AU, England)

6. เดสิเคเตอร์

- สารเคมี

1. นอร์มัล-เฮกเซน ($n\text{-}C_6H_{14}$) Merck AR grade

2. อะซิโตน (CH_3COCH_3) Merck, AR grade

3. โซเดียมซัลเฟตแห้ง (ผลึกปราศจากน้ำ) (anhydrous, Na_2SO_4) Merck, AR grade

4 แก๊สไนโตรเจน

3. สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารพื้นฐาน

3.1 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโซเดียม (Na^+)

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต

เครื่องมืออุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปคโตรมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrometer, AAS) Varian, รุ่น SpectrAA 300/400 โดยใช้กระบวนการทำให้สารแตกตัวเป็นอะตอมด้วยเปลวไฟ (flame atomization technique) ที่เกิดจากอากาศ และอะเซทีลีน [air - C_2H_2 (acetylene)] มีอัตราการไหลของอากาศ (air flow) 13.5 ลิตรต่อนาที อัตราการไหลของเชื้อเพลิงอะเซทีลีน (acetylene flow) 2 ลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 330.3 นาโนเมตร และมีแหล่งกำเนิดแสง (light source) แบบ Hollow Cathode Lamps (HCLs)

2. เครื่องกรองพร้อมปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump)

3. กระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

สารเคมี ได้แก่

1. สารละลายมาตรฐานโซเดียม (standard sodiam solution) เตรียมความเข้มข้นของโซเดียมในช่วง 50-300 มิลลิกรัมโซเดียมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (1 มิลลิลิตร = 1,000 ไมโครกรัมโซเดียม) 0, 5, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายโซเดียมที่มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมโซเดียมต่อลิตร ใช้อันที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแบลงค์ (blank) เขียนกราฟความสัมพันธ์ (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียม (มิลลิกรัมต่อลิตร) จะได้เป็นเส้นตรงผ่านจุดเริ่มต้น

2. อากาศ (air)

3. แก๊สอะเซทีลีน (C_2H_2)

3.2 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปตัสเซียม (K^+)

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต

เครื่องมืออุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปคโตรมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrometer, AAS) Varain, รุ่น SpectrAA 300/400 โดยใช้กระบวนการทำให้สารแตกตัวเป็นอะตอมด้วยเปลวไฟ (flame atomization technique) ที่เกิดจากอากาศและอะเซทีลีน [air - C_2H_2 (acetylene)] มีอัตราการไหลของอากาศ (air flow) 13.5 ลิตรต่อนาที อัตราการไหลของเชื้อเพลิงอะเซทีลีน (acetylene flow) 2 ลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 769.9 นาโนเมตร และมีแหล่งกำเนิดแสง (light source) แบบ Hollow Cathode Lamps (HCLs)

2. เครื่องกรองพร้อมปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump)

3. กระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

สารเคมี ได้แก่

1.สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียม (standard potassium solution) เตรียมความเข้มข้นของโปตัสเซียมในช่วง 1.0 - 4.0 มิลลิกรัมโปตัสเซียมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียม ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (1 มิลลิลิตร = 1,000 ไมโครกรัมโปตัสเซียม) 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตรของสารละลายโปตัสเซียมที่เตรียมไว้ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใช้อันที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแบลงค์ (Blank) เขียนกราฟความสัมพันธ์ (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของสารละลายโปตัสเซียม (มิลลิกรัมต่อลิตร) จะได้เป็นเส้นตรงผ่านจุดเริ่มต้น

3.3 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียม (NH_4^+)

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ ขวดวัดปริมาตร ปิเปต กระบอกตวง หลอดหยดสาร

เครื่องมืออุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ใช้ที่ความยาวคลื่น 630.0 นาโนเมตร และ light Path 1 เซนติเมตร (spectronic 21)

2. เครื่องกรองพร้อมปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump)

3. เครื่องกวนพร้อมแท่งคนแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

4. เครื่องชั่งชนิดละเอียด Sartorius รุ่น B-2400 s

5. กระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

สารเคมี ได้แก่

1. น้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนียม เตรียมโดยวิธีการกลั่น คือ กำจัดแอมโมเนียในน้ำกลั่นได้โดยเติม 0.1 มิลลิลิตรของกรดกำมะถันเข้มข้น (conc H_2SO_4) ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วกลั่นซ้ำ

2. กรดไฮโปคลอรัส เติม 5 เปอร์เซนต์ น้ำยาฟอกขาว (commercial bleach) 10 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับพี - เอชด้วยกรดเกลือ (HCl) จนได้ประมาณ 6.5 - 7.0 (เตรียมใช้แต่ละสัปดาห์เพราะไม่อยู่ตัว)

3. สารละลายมังกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) 0.003 โมลาร์ ละลาย $MnSO_4.H_2O$ 50.0 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. น้ำยาฟีเนท (phenate solution) ละลาย NaOH 2.5 กรัม และฟีนอล (C_6H_5OH) 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (เตรียมใช้แต่ละสัปดาห์ เพราะน้ำยานี้จะมีสีเข้มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อตั้งทิ้งไว้)

5. สารละลายสตอคแอมโมเนียม (stock ammonium solution) ละลาย NH_4Cl 381.9 มิลลิกรัม (อบให้แห้งที่ 100 องศาเซลเซียสก่อน) ในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

1 มิลลิลิตร = 100 ไมโครกรัมในไนโตรเจน = 122 ไมโครกรัมแอมโมเนียม

6. สารละลายมาตรฐานแอมโมเนียม (standard ammonium solution) ทำ 5 มิลลิลิตรของสารละลายสตอคแอมโมเนียมให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

1 มิลลิลิตร = 0.5 ไมโครกรัมไนโตรเจน = 0.6 ไมโครกรัมแอมโมเนียม

เตรียมความเข้มข้นของแอมโมเนียมในช่วง 0.1 - 0.4 มิลลิกรัมแอมโมเนียมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียม 0, 2, 4, 6 และ 8 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายแอมโมเนียม ที่มีความเข้มข้น ,0.1 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมแอมโมเนียมต่อลิตร ใช้อันที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแบลงค์ (blank) เขียนกราฟความสัมพันธ์ (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียม (มิลลิกรัมต่อลิตร) จะได้เป็นเส้นตรงผ่านจุดเริ่มต้น

3.4 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณมักนีเซียม (Mg^{2+})

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต

เครื่องมืออุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปคโตรมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrometer, AAS) Varian, รุ่นSpectr AA 300/400 โดยใช้กระบวนการทำให้สารแตกตัวเป็นอะตอมด้วยเปลวไฟ (flame atomization technique) ที่เกิดจากอากาศ และอะเซทีลีน [air - C_2H_2 (acetylene)] มีอัตราการไหลของอากาศ (air flow) 13.5 ลิตรต่อนาที อัตราการไหลของเชื้อเพลิงอะเซทีลีน (acetylene f low) 2 ลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 285.6 นาโนเมตร และมีแหล่งกำเนิดแสง (light source) แบบ Hollow Cathode Lamps (HCLs)

2. เครื่องกรองพร้อมปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump)

3. กระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

สารเคมี ได้แก่

1.สารละลายมาตรฐานมักนีเซียม (standard magnesium solution) เตรียมความเข้มข้นของมักนีเซียมในช่วง 0.1 - 0.8 มิลลิกรัมมักนีเซียมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานมักนีเซียม ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (1 มิลลิลิตร = 1,000 ไมโครกรัมมักนีเซียม) 0, 10, 30, 50 และ 80 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายมักนีเซียมที่มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.8 มิลลิกรัมมักนีเซียมต่อลิตร ใช้อันที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแบลงค์ (blank) เขียนกราฟความสัมพันธ์ (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของสารละลายมักนีเซียม (มิลลิกรัมต่อลิตร) จะได้เป็นเส้นตรงผ่านจุดเริ่มต้น

2. อากาศ (air)

3. แก๊สอะเซทีลีน (C_2H_2)

3.5 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคลอไรด์ (Cl^-)

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ บิวเรต กระบอกตวง ปิเปต หลอดหยดสาร ช้อนตักสาร

เครื่องมืออุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่องชั่งชนิดละเอียด

2. เครื่องกรองพร้อมปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump)

3. กระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

สารเคมี ได้แก่

1. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคลอไรด์ (standard Sodium chloride solution) 0.014 โมลาร์ : ละลาย 824.1 มิลลิกรัม NaCl (อบให้แห้งที่ 140 องศาเซลเซียสก่อน) ในน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. กรดไนตริก (HNO_3) 0.014 โมลาร์ : 6.4 มิลลิลิตรของ HNO_3 ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.100 โมลาร์ : ละลาย NaOH 4.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

4. น้ำยาเคมีสำหรับทิเทรตตัวอย่างที่มีปริมาณคลอไรด์สูง

4.1 น้ำยาเคมีที่เป็นตัวบ่งชี้แบบผสม (mixed indiicator reagent) ละลาย 5.9 กรัม ไดฟีนีลคาร์บาโซน (diphenylcarbazone และ 0.5 กรัม บรอร์มฟีนอล บลู (bromphenol blue) ใน 750 มิลลิลิตร 95 เปอร์เซนต์ เอธิลอัลกอฮอล์ C_2H_5OH และเติม C_2H_5OH จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

4.2 สารละลายมาตรฐานเมอร์คิวริคไนเตรตเข้มข้น [strong standard Hg $(NO_3)_2$] 0.141 โมลาร์ ต่อละลาย 25 กรัมของ $Hg(NO_3)_2.H_2O$ ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ซึ่งเติม 5 มิลลิลิตร กรดไนตริก (Conc HNO_3) เข้มข้น เรียบร้อยแล้ว เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรน้อยกว่า 1,000 มิลลิลิตร และทำการปรับมาตรฐาน (Standardize) ก่อนใช้ โดยใช้ 25 มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน NaCl และ 25 มิลลิลิตรของน้ำกลั่น แล้วทิเทรต ดังวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.5 (5) และปรับความเข้มข้นของ $Hg(NO_3)_2$ จนได้ 0.141 โมลาร์พอดี ซึ่งทำให้ 1 มิลลิลิตรของ $Hg(NO_3)_2$ สมมูลย์กับคลอไรด์ 5.0 มิลลิกรัม

3.6 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต (SO_4^{2-})

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ ขวดวัดปริมาตร ปิเปต กระบอกตวง หลอดหยดสาร ช้อนตักสาร

เครื่องมืออุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ใช้ที่ความยาวคลื่น 420.0 นาโนเมตร และ light path 4 เซนติเมตร

2. ตัวกรองโฟโตมิเตอร์ (filter photometer) พร้อม violet filter เพื่อให้ค่าสูงสุดของการที่ให้แสงผ่าน (maximum transmittance) ที่ใกล้ 420.0 นาโนเมตร และ light path 4 เซนติเมตร

3. เครื่องชั่งชนิดละเอียด

4. เครื่องกรองพร้อมปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump)

5. กระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

6. นาฬิกาจับเวลา (stop - watch)

สารเคมี ได้แก่

1.สารปรับสภาพ (conditioning reagent) ให้ผสมกลีเซอรอล 50 มิลลิลิตร กับสารละลายที่ประกอบด้วย กรดเกลือ (conc HCl) เข้มข้น 30 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร 95 เปอร์เซนต์ เอธิลอัลกอฮอล์ (C_2H_5OH) 100 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 75.0 กรัม

2. แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$ crystal) ขนาด 20 - 30 Mesh

3. สารละลายมาตรฐานซัลเฟต (standard sulfate solution) ละลาย Na_2SO_4 (anhydrous) 147.9 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1 มิลลิลิตร = 100 ไมโครกรัมซัลเฟต

เตรียมความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปต 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิลิตรของสารละลายซัลเฟตที่เตรียมไว้ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใช้อันที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแบลงค์ (blank)

เขียนกราฟความสัมพันธ์ (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของสารละลายซัลเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร) จะได้เป็นเส้นตรงผ่านจุดเริ่มต้น

3.7 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต (PO_4^{3-})

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ ขวดวัดปริมาตร ปิเปต กระบอกตวง หลอดหยดสาร ช้อนตักสาร

เครื่องมืออุปกรณ์ ได้แก่

1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) พร้อมด้วย infared spectrophotometer สำหรับใช้ที่ 880.0 นาโนเมตร และ light path 1 เซนติเมตร

2. เครื่องกรองพร้อมปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump)

3. กระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

4. เครื่องชั่งชนิดละเอียด

สารเคมี ได้แก่

1. สารละลายกรดกำมะถัน (H_2SO_4) 5 โมลาร์ เติม conc H_2SO_4 70 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

2. สารละลายแอนติโมนีโปตัสเซียมทาเทรท ละลาย 1.3715 กรัม K(SbO) $C_4H_4O_6$.1/2 H_2O ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้ว

3. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท ละลาย 20 กรัม $(NH_4)_6$ MO_7O_{24} $4H_2O$ ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายเอสคอร์บิคแอซิด (ascobic acid) 0.1 โมลาร์ ละลาย 1.76 กรัม เอสคอร์บิคแอซิดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้จะอยู่ตัวประมาณ 1 สัปดาห์ ถ้าเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5. น้ำยาเคมีรวม (Combined Reagent) ผสมน้ำยาเคมีในสัดส่วน สำหรับ 100 มิลลิลิตร ดังนี้

- 50 มิลลิลิตร 5 โมลาร์ H_2SO_4
- 5 มิลลิลิตร สารละลายแอนติโมนีโปตัสเซียมทาเทรต
- 15 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท และ
- 30 มิลลิลิตร กรดเอสคอร์บิค ตั้งน้ำยาเคมีรวมเหล่านี้ทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง จึงจะผสมกัน ถ้ามีความขุ่นเกิดขึ้นในน้ำยาเคมีรวม หลังจากเติมแอนติโมนีโปตัสเซียมทาเทรต หรือแอมโมเนียมโมลิบเดท ให้เขย่าน้ำยาเคมีรวมนี้ แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 - 3 นาที จนกระทั่งความขุ่นหายไป จึงเติมน้ำยาเคมีตัวอื่นต่อไป น้ำยารวมนี้อยู่ได้ 4 ชั่วโมง

6. สารละลายสตอคฟอสเฟต (stock phosphate solution) ละลาย KH_2PO_4 anhydrous 136.0 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

7. สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต (standard phosphate solution) นำสารละลายสตอคฟอสเฟต 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คือ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (1 มิลลิลิตร = 100 ไมโครกรัมฟอสฟอรัส) เตรียมความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการปิเปต 0, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิลิตรของสารละลายฟอสเฟตที่เตรียมไว้ ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใช้อันที่มีความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแบลงค์ (blank) เขียนกราฟความสัมพันธ์ (calibration curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร) จะได้เป็นเส้นตรงผ่านจุดเริ่มต้น

3.3 การศึกษาด้านแบคทีเรีย

1. การเพาะเชื้อแบคทีเรีย (bacteria cultures)

นำ stock culture ของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* DMS 2714 และ *Bacillus subtilis* DMS 2398 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ในอาหาร skim milk โดยการใช้ลูฟ (inoculating loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการลนเปลวไฟจนแดงร้อน แล้วทิ้งให้เย็นสักครู่ซึ่งเป็นวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ (antiseptic) แล้วทำการขีดเชื้อ (streak) ลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง tryptic soy agar (สูตรอาหารดังภาคผนวก ฌ) ที่อยู่บนจานเพาะเชื้อ (petri dish) แล้วนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปใช้ศึกษา

2. การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิด แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะดังนี้

2.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (tryptic soy broth) (สูตรอาหารดัง ภาคผนวก ฌ) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารพื้นฐาน (mineral base medium) (สูตรอาหารดังภาคผนวก ฌ) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MBM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและเติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ใช้ศึกษาแต่ละชนิด (2 ชนิด คือ Esso ultron และ Castrol GTX) ในระดับความเข้มข้น 0 (ตัวควบคุม) 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ตลอดเวลาที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เพื่อให้มีการถ่ายเทออกซิเจนจากอากาศลงสู่ตัวอย่างได้ และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28.0 - 35.5 องศาเซลเซียส) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต (growth) และระยะเวลาแบ่งตัวต่อรุ่น (generation time) (ภาคผนวก ช) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยการนับจำนวนเซลล์หรือโคโลนีของแบคทีเรีย ด้วยวิธี total plate count เทคนิค spread plate (ดังภาคผนวก ช) ในชั่วโมงที่

3.การศึกษาการสลายทางชีวภาพของน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MBM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวMBMที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและเติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ใช้ศึกษาแต่ละชนิดจำนวน 2 ชนิด ชนิดแรก คือ Esso ultron ซึ่งเป็นน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ ที่ประกอบด้วยน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานจำพวกเอสเทอร์สังเคราะห์ และสารเติมแต่งต่าง ๆ มีคุณสมบัติทางกายภาพดีมาก คือ มีจุดไหลเทต่ำ เนื่องจากเอสเทอร์ปราศจากไข ดังนั้นจึงเป็นของไหลที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ ได้ มีความหนืด หรือความข้นใสที่เหมาะสมกับการใช้งาน (optimum viscosity) มีค่าดัชนีความข้นใสสูง (high viscosity index) สามารถใช้งานได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน มีการระเหยตัวต่ำ (low volatility) มีจุดวาบไฟสูง และทนต่อความร้อนสูงได้ มีเปอร์เซนต์การกลั่นตัวที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียสต่ำ สามารถละลายสารเติมแต่งทุกชนิดได้ดี และช่วยป้องกันการพอกพูนของสารต่าง ๆ ในระบบหล่อลื่นได้ จึงถือได้ว่าน้ำมันหล่อลื่นชนิดนี้มีประสิทธภาพในการหล่อลื่นสูง และ ชนิดที่สอง คือ Castrol GTX ซึ่งเป็นน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ ที่ประกอบด้วยน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานจำพวกไฮโดรคาร์บอนสังเคราะห์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ผลิตจากวัสดุที่ได้จากน้ำมันดิบ ไฮโดรคาร์บอนที่นิยมใช้นั้น มีอยู่ 3 ชนิด คือ อัลคิลเลเทด อะโรมาติก, โอลิฟิน โอลิโกเมอร์ และโพลิบิวทีน และสารเติมแต่งต่าง ๆ ซึ่งเป็นของไหลดีเลิศที่อุณหภูมิต่ำ มีสภาพการระเหยน้อยกว่าน้ำมันหล่อลื่นที่ได้จากแหล่งปิโตรเลียม ที่ความหนืดใกล้เคียงกัน มีจุดไหลเทต่ำ มีความทนต่อแรงเฉือนดีมาก และทนต่อการสลายตัว นอกจากนี้ยังทนต่อความร้อน และทนต่อการถูกออกซิไดซ์ดี และมีค่าดัชนีความข้นใสสูงกว่าน้ำมันหล่อลื่นที่มาจากแหล่งปิโตรเลียมเล็กน้อย (โสภณ เริงสำราญ และคณะ, 2539) ในระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิดอย่างเหมาะสม ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 2.3 แล้วเติมแบคทีเรียแต่ละชนิด และทั้งสองชนิดร่วมกันลงในตัวอย่าง ดังกล่าว โดยมีตัวควบคุมที่ไม่เติมน้ำมัน และตัวควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมัน ที่ละลายในตัวอย่าง โดยวิธีการสกัดด้วยกรวยสำหรับแยก (separatory funnel extraction) และชนิดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยเทคนิค ไฮ เปอร์ฟอร์เมนท์ ลิคควิด โครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography) (HPLC) ในวันที่ 0 (เริ่มต้น), 7, 4, 21 และ 28 ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

0 (เริ่มต้น) 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 48, 72, 96,120, 144, 168, 192, 216, 240, 288, 336, 408, 504, 672, 912, 1,152 และ 1,440 (60 วัน) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ดังนี้

1.การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (TSB) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ใช้ลูฟที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาแต่ละชนิด (2ชนิด) ที่ขึ้นบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง TSA จำนวน 1 loop ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (tryptic soy broth) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียสามารถปรับตัว และผสมเข้ากันในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวดังกล่าว หลังจากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่มีอยู่ในอาหารชนิดเหลว TSB โดยใช้ปิเปตดูดมาในอัตราส่วน 10 เปอร์เซนต์ (1:10) (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารชนิดเหลว TSB ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขวดใหม่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรตัวอย่างละ 100 มิลลิลิตร หลังปิดปากขวดด้วยสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนได้อัตราส่วนที่เจือจางต่าง ๆ ของแบคทีเรียแต่ละชนิด (dillution) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แล้วนำมาศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และระยะเวลาแบ่งตัวต่อรุ่นของแบคทีเรียแต่ละชนิด (สมการดังภาคผนวก ช) ดังวิธีการข้างต้น ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารพื้นฐาน MBM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ทำการศึกษาดังเช่นข้อ 1 เพียงแต่เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MBM แทน TSB แล้วนำมาศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและระยะเวลาแบ่งตัวต่อรุ่นของแบคทีเรียแต่ละชนิดเช่นเดียวกัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่สารอาหารพื้นฐาน (MBM) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเติมน้ำมันผสมหล่อลื่นสังเคราะห์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

ใช้ปิเปตดูดน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ใช้ศึกษาแต่ละชนิดซึ่งมีอยู่ 2 ชนิด หยดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MBM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ(sterilization)โดยมีปริมาตรตัวอย่างละ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 5 ความเข้มข้น คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร หรือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซนต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ แล้วปิดปากขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียม เพื่อป้องกันการปนเปื้อน และปล่อยทิ้งไว้ให้น้ำมันระเหยจนอยู่ตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (28.0 - 35.5 องศาเซลเซียส) แล้วเติมแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงไปในอัตราส่วน 10 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วเอาสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วปิดปากขวดแทนกระดาษอลูมิเนียม แล้วดำเนินการทดลองต่อไป ดังเช่นข้อ 1 และ 2 โดยมีตัวอย่างในข้อ 2 ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่ไม่เติมน้ำมัน และเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และระยะเวลาแบ่งตัวต่อรุ่นของแบคทีเรียแต่ละชนิดเช่นเดียวกัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารไฮโดรคาร์บอน

การวิเคราะห์ปริมาณสารไฮโดรคาร์บอน (APHA, 1992 อ้างใน ธงชัย พรรณสวัสดิ์, บรรณาธิการ, 2535)

วิธีการสกัดด้วยกรวยสำหรับแยก (separatory funnel extraction)

หลักการ ทำตัวอย่างให้มีค่า พี - เอช (pH) น้อยกว่า 2 แล้วสกัดน้ำมันด้วยนอร์มัลเฮกเซน (n - hexane) ในกรวยสำหรับแยก ระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง นำส่วนที่เหลือไปอบแห้ง แล้วทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนัก (เป็นวิธีการที่ใช้หาปริมาณสารไฮโดรคาร์บอน)

1. เมื่อครบกำหนดวันที่ 0 (เริ่มต้น), 7, 14, 21 และ 28 นำตัวอย่างไปฆ่าเชื้อในตู้อบแบบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองแบคทีเรีย โดยใช้กระดาษกรองขนาดรูพรุนเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร ก็จะได้ตัวอย่างที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์เท่านั้น ทำการถ่ายเทลงในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก 1 : 1 ลงไป เพื่อทำให้ตัวอย่างมีค่า พี - เอช (pH) เท่ากับ 2 หรือต่ำกว่า และเติมนอร์มัลเฮกเซน (n - C_6H_{14}) 50 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้สักครู่ เพื่อให้ชั้นน้ำมันซึ่งละลายในนอร์มัลเฮกเซน แยกออกจากตัวอย่าง แล้วไขเอาชั้นนอร์มัลเฮกเซนนี้ เก็บไว้ในขวดก้นกลม

2. ชั่งหาน้ำหนักของขวดก้นกลม ที่จะใช้ในการระเหยนอร์มัลเฮกเซน (ผ่านการอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และปล่อยให้เย็นลงในเดสิเคเตอร์ นาน 30 นาที)

3. สกัดตัวอย่างเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยการเติมนอร์มัลเฮกเซนครั้งละ 50 มิลลิลิตร แล้วไขแยกเอาชั้นนอร์มัลเฮกเซน มารวมกันเป็น 150 มิลลิลิตร ใส่ในขวดก้นกลม

4 ใส่โซเดียมซัลเฟตแห้ง (Na_2SO_4 anhydrous) (ผ่านการเผา ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) ทุกครั้ง ปริมาณ 0.5 กรัม ลงในสารละลายที่สกัดได้ เพื่อกำจัดน้ำที่อาจปนอยู่ ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วกรองเอาโซเดียมซัลเฟตออก โดยใช้กระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 42

5. นำสารละลายที่สกัดได้ไปลดปริมาตร และระเหยนอร์มัลเฮกเซนออก โดยใช้เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และระเหยต่อ โดยผ่านแก๊สไนโตรเจน (nitrogen flow) จนแห้ง

6. นำขวดก้นกลมที่มีสารไฮโดรคาร์บอนอยู่ ไปทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักรวม

7. ทำแบลงค์โดยใช้ปริมาตรทั้งหมดของนอร์มัลเฮกเซน ที่ใช้สกัดตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมัน} = \frac{R - B \times 1,000}{V}$$

เมื่อ R = น้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของน้ำมัน หาได้จาก น้ำหนักขวดก้นกลมรวมกับส่วนที่เหลือ (ในข้อ 6) ลบด้วยน้ำหนักขวดก้นกลม (ในข้อ 2)

B = แบลงค์ คือ น้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของส่วนที่เหลือของนอร์มัลเฮกเซน (ในข้อ 7)

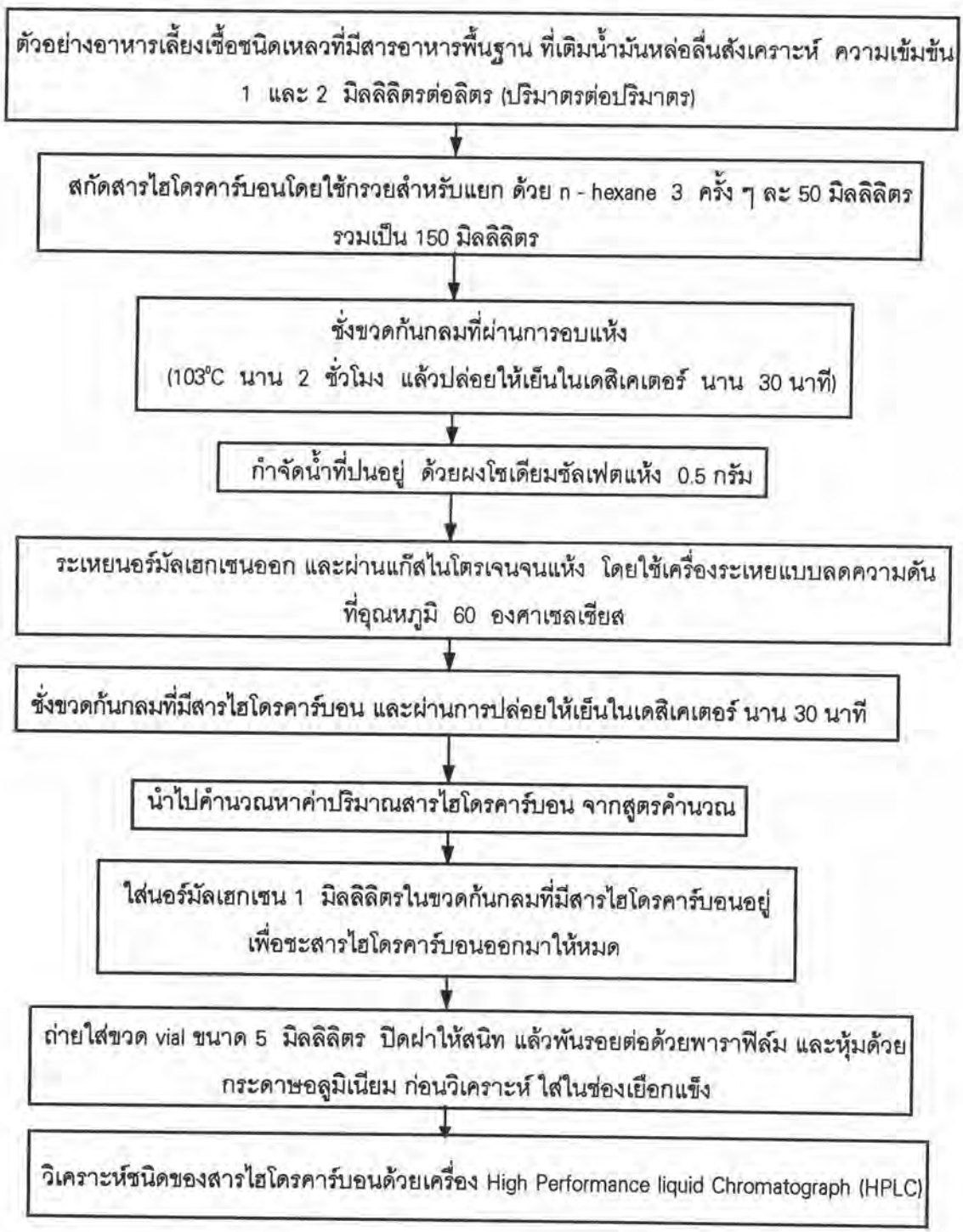
V = ปริมาตร เป็นมิลลิลิตรของตัวอย่าง

การวิเคราะห์ชนิดสารไฮโดรคาร์บอน

เครื่องมือที่ใช้ คือ ไฮ เปอร์ฟอร์เมนท์ ลิควิด โครมาโตกราฟ (high performance lliquid chromatograph) (HPLC) ของ Gilson รุ่น 107 โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบ UV detector รุ่น 112 UV/ VIS ที่ความยาวคลื่น 254.0 นาโนเมตร, คอลัมน์ Si - 60 ของ Merck ความยาว 244 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ใช้นอร์มัล-เฮกเซน (n - hexane) เป็นตัวพา (mobile phase) อัตราการไหลของตัวพา (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีสารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform) เป็นสารล้างคอลัมน์ และใช้ขนาดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร

เมื่อครบกำหนดวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ก็ทำการสกัด และหาปริมาณสารไฮโดรคาร์บอน แล้วนำตัวอย่างน้ำมันหล่อลื่นฯ ที่อยู่ก้นขวด มาเติมนอร์มัลเฮกเซน 1 มิลลิลิตร และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาโปรไฟล์ (profile) ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

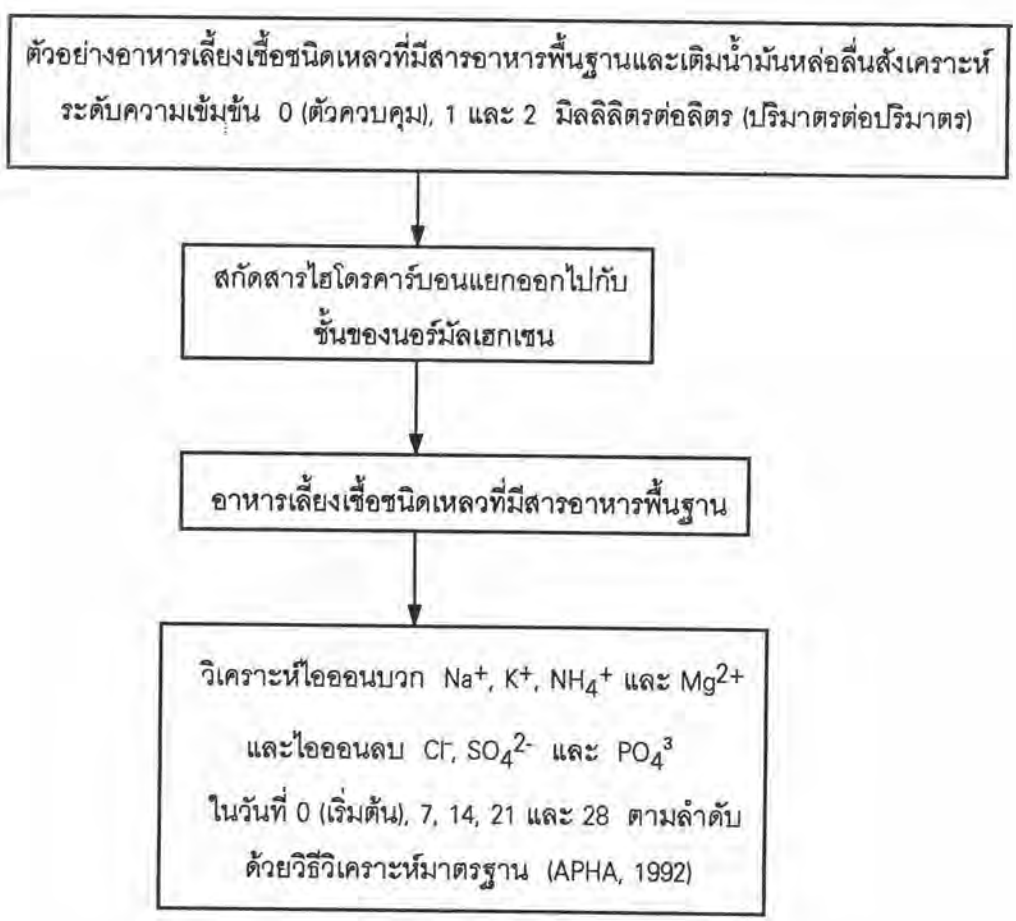
วิธีวิเคราะห์ปริมาณ และชนิดสารไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างอาหารชนิดเหลว MBM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ Esso ultron และ Castrol GTX ในระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร



3.5 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารอาหารพื้นฐานในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MBM (mineral base medium) ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ (APHA, 1992)

1. การสกัดสารอาหารพื้นฐาน

เมื่อครบกำหนดวันที่ 0 (เริ่มต้น), 7, 14, 21 และ 28 นำตัวอย่างไปทำการฆ่าเชื้อในตู้อบแบบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และสกัดแยกเอาตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารพื้นฐาน ออกจากชั้นน้ำมันที่ละลายอยู่ในชั้นนอร์มัลเฮกเซน ซึ่งมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ และปิดปากขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียม ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์สารอาหารพื้นฐาน ซึ่งประกอบด้วย ไอออนบวก ได้แก่ Na^+, K^+, NH_4^+ และ Mg^{2+} และไอออนลบ ได้แก่ Cl^-, SO_4^{2-} และ PO_4^{3-} ด้วยวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน โดยได้แสดงวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารพื้นฐานในตัวอย่าง ไว้ดังข้างล่าง



1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโซเดียม (Na^+)

1.1 ปิเปตตัวอย่างมา 500 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.2 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 330.3 นาโนเมตร ของตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานโซเดียม ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปตัสเซียม(K^+)

2.1 ปิเปตตัวอย่างมา 15 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 769.9 นาโนเมตรของตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานโปตัสเซียม ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียม (NH_4^+)

วิธีฟีเนท (phenate)

หลักการ จากปฏิกิริยาของแอมโมเนีย ไฮโปคลอไรด์ และฟีนอล มีเกลือมังกานีสเป็นตัวเร่ง จะได้สีน้ำเงินเข้ม ซึ่งวัดได้ที่ความยาวคลื่น 630.0 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาแอมโมเนียม

3.1 ปิเปตตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร และดูดตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายมังกานีสซัลเฟต 1 หยด (0.05 มิลลิลิตร) นำไปตั้งบนเครื่องคนแม่เหล็ก

3.2 เติมสารละลายกรดไฮโปคลอรัส 0.5 มิลลิลิตรทันที

3.3 เติมน้ำยาฟีเนท 0.6 มิลลิลิตร โดยเติมที่ละหยด คนอย่างแรงในขณะที่เติมน้ำยาเคมี เนื่องจากอายุของน้ำยามีผลต่อความเข้มของสี

3.4 ทำแบลงค์ (blank) และสารละลายมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.5 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 630 นาโนเมตร โดยใช้ reagent blank ในการปรับสเกลเป็นศูนย์ สีจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ภายในเวลา 10 นาที และอยู่ตัวอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การคำนวณ

$$\text{มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียม - ไนโตรเจน} = \frac{A \times B}{C \times S}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B = ไมโครกรัมแอมโมเนียไนโตรเจน ในสารมาตรฐานที่นำมา

C = ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

S = มิลลิลิตรของตัวอย่างที่ใช้

4. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณมักนีเซียม (Mg^{2+})

4.1 ปิเปตตัวอย่างมา 120 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 285.6 นาโนเมตรของตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานมักนีเซียมทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชัน

5. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอไรด์ (Cl^-)

วิธีวิเคราะห์เมอร์คิวริคไนเตรท (mercuric nitrate method)

หลักการ วิธีนี้ใช้หาคลอไรด์ได้ทั้งในปริมาณที่สูงและต่ำ โดยการเลือกใช้อินดิเคเตอร์ให้เหมาะสม diphenyl carbazone เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งจะให้สีม่วงกับ Hg^{2+} ที่เกินพอในช่วงพี-เอช 2.3 - 2.8 โดยการเกิดเป็น purple complex สำหรับตัวอย่างน้ำที่มีคลอไรด์ (Cl^-)สูง จะใช้อินดิเคเตอร์ผสมของ diphenyl carbazone และ bromphenol blue ซึ่งจะให้สีม่วง เมื่อเติมลงในตัวอย่าง แล้วจึงปรับพี - เอช ด้วย HNO_3 จนได้เป็นสีเหลือง

การหาปริมาณคลอไรด์

5.1 ปิเปตตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

5.2 เติม 0.5 มิลลิลิตรของ mixed indicator reagen ผสมให้เข้ากันกับตัวอย่าง จะได้ตัวอย่างน้ำ เป็นสีม่วง

5.3 เติม 0.141 โมลาร์ HNO_3 ที่ละหยด จนกระทั่งเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

5.4 ทิเทรตด้วย 0.141 โมลาร์ $Hg(NO_3)_2$ จนกระทั่งสีเปลี่ยนกลับเป็นสีม่วงอย่างถาวร

5.5 หาค่าของ blank โดยการทิเทรตน้ำกลั่นด้วย 0.141 โมลาร์ $Hg(NO_3)_2$ และเติมสารเคมีต่าง ๆ ดังเช่นตัวอย่าง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การคำนวณ

$$\text{มิลลิกรัมต่อลิตร } Cl^- = \frac{(A - B) \times N \times 3,450}{\text{มิลลิลิตรของสารตัวอย่าง}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของ $Hg(NO_3)_2$ ที่ใช้ในการทิเทรตตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของ $Hg(NO_3)_2$ ที่ใช้ในการทิเทรต blank

N = นอร์มัลลิตี้ของ $Hg(NO_3)_2$

6. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต (SO_4^{2-})

วิธีวิเคราะห์ความขุ่น (turbidimetric method)

หลักการ $BaSO_4$ จะตกตะกอนและอยู่ในรูปคอลลอยด์ ซึ่งทำได้โดยเติม $BaCl_2$ ใน acid medium (HCl) ซึ่งมี glycerol อยู่ วัดค่าการดูดกลืนแสงของ $BaSO_4$ suspension เพื่ออ่านค่าซัลเฟตของตัวอย่าง เป็นวิธีที่ไว และใช้กันมาก

การวิเคราะห์หาซัลเฟต

1. การทำให้เกิด $BaSO_4$

นำตัวอย่างมา 25 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร เติม $BaCl_2$ crystal 1 ช้อน จับเวลาพอได้ 1 นาที ให้หยุดคนทันที

2. การวัดความขุ่นของ $BaSO_4$

เทสารละลายที่หยุดคน ลงใน absorption cell ของสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 422 นาโนเมตร วัดค่าความขุ่นทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 4 นาที ทั้งนี้เพราะ ความขุ่นสูงสุดจะเกิดขึ้นทันที 2 นาที และจะอยู่ตัวไปถึง 10 นาที ให้เอาค่าที่อ่านได้มากที่สุดภายใน 4 นาที และทำกับสารละลายมาตรฐานซัลเฟตทุกอย่างเหมือนตัวอย่าง พร้อมทั้งทำแบลงค์ (blank) เหมือนตัวอย่าง แต่ไม่ต้องเติม $BaCl_2$ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การคำนวณ

$$\text{มิลลิกรัมต่อลิตร } SO_4^{2-} = \frac{\text{มิลลิลิตร } SO_4^{2-} \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตรของสารตัวอย่าง}}$$

7. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต (PO_4^{3-})

วิธีแอสคอร์บิค แอซิด (ascorbic acid method)

หลักการ แอมโมเนียม โมลิบเดท (ammonium molybdate) และโปตัสเซียม แอนติโมนิลทาเทรท (potassium antimonyltatrate) จะทำปฏิกิริยาในสารละลายที่เป็นกรด กับสารละลายออโธฟอสเฟต เกิดเป็น เฮทเทอร์โร แอซิด โฟโตโมลิบดิค แอซิด (hetero acid - photomolybdic acid) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ (reduce) โดยแอสคอร์บิค แอซิด (ascorbic acid) ได้สี molybdenum blue

การวิเคราะห์หาฟอสเฟต

7.1 ดูดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวย

ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคตอร์ 1 หยด ถ้าได้สีแดงให้หยด 5 โมลาร์ H_2SO_4 ลงไปทีละหยด จนกระทั่งสีแดงหายไป เติมน้ำยารวม 8.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่ให้เกิน 30 นาที เพื่อให้เกิดสี แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 880.0 นาโนเมตร และใช้ reagent blank เป็นสารละลายอ้างอิง (referance solution) พร้อมทั้ง อ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต ที่เตรียมไว้ด้วยทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การคำนวณ

$$\text{มิลลิกรัมต่อลิตร } P = \frac{\text{มิลลิกรัม } P \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตรของสารตัวอย่าง}}$$

ถ้าต้องการผลในรูปฟอสเฟตให้ใช้สูตร

$$\text{มิลลิกรัมต่อลิตร } PO_4^{3-} = \text{มิลลิกรัมต่อลิตร } P \times 3.06$$

3.6 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของค่า พี - เอช (pH) และอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารพื้นฐาน และเติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์

เครื่องมือที่ใช้ คือ pH meter (Horiba F - 11) ซึ่งสามารถวัดได้ทั้งค่า พี - เอช (pH) และอุณหภูมิ เมื่อครบกำหนดวันที่ 0 (เริ่มต้น), 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ นำตัวอย่างไปทำการฆ่าเชื้อแล้วตั้งไว้ให้เย็นลง ที่อุณหภูมิห้อง และกรองเอาแบคทีเรียออกไป ด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุนเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงวัดค่า พี - เอช (pH) และอุณหภูมิของตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารอาหารพื้นฐาน ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ ความเข้มข้น 0 (ตัวควบคุม), 1 และ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.7 การวิเคราะห์และสรุปผลการศึกษา

ใช้การวิเคราะห์หาค่าสถิติ โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for window (statistical Package for the Social Sciences) ดังนี้

1. เปรียบเทียบการเจริญเติบโต โดยใช้ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนี้

1.1 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิด (2 ชนิดคือ *Pseudomonas putida* และ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 2 ชนิด คือ MBM และTSB ที่ 0 (เริ่มต้น) ถึงชั่วโมงที่ 1,440

1.2 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แต่ละชนิดที่มีทั้งไม่เติม และเติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ใช้ศึกษา แต่ละชนิด (2 ชนิด คือ Esso ultron และ Castrol GTX) แต่ละความเข้มข้น (0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน

1.3 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แต่ละชนิดที่มีทั้งไม่เติม และเติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ในน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ใช้ศึกษาทั้ง 2 ชนิด

โดยใช้การทดลอง T - Test (student - t) ซึ่งเป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างกลุ่มเดียว หรือสองกลุ่มตัวอย่าง

1.4 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TSB และ MBM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์แต่ละชนิด (2 ชนิดคือ Esso ultron และ Castrol GTX) ในระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว (one way analysis of variance)

1.5 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลแบคทีเรียแต่ละชนิด และทั้งสองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TSB และ MBM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกันกับน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ทั้งสองชนิดกับแบคทีเรียแต่ละชนิด และน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์แต่ละชนิดกับแบคทีเรียทั้งสองชนิด โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบหลายทาง (Analysis of variance)

2. ความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของปริมาณน้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์ที่ใช้ศึกษา แต่ละชนิด (2 ชนิด) ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MBM ในระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นกับการเจริญเติบโต โดยใช้ค่า logarithm ของจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดและทั้งสองชนิด และชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย ในวันที่ 0 (เริ่มต้น), 7, 14, 21 และ 28 โดยใช้การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปร คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation)