บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *Bacillus subtilis* MUV4 ซึ่งเก็บรักษาไว้ในอาหาร Nutrient Agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินและทำให้กลายพันธุ์ โดยภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2537)

เชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC11778 ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้น และการเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 คือ Nutrient Broth และ Nutrient Agar (Prommachan, 2002)

อาหารสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4 คือ Modified Mckeen Medium (Prommachan, 2002) ประกอบด้วย กลูโคส 10, monosodium glutamate 10, yeast extract 3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.02, K_2HPO_4 1.0, KCl 0.5 g/L และ trace element 1.0 ml/L ($MgSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.5, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.16, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015 g ในน้ำกลั่น 100 mL)

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง ได้แก่ คือ Trypticase soy broth และ Trypticase soy agar

อาหารสำหรับการเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากดินเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้แก่ Mineral Salt Yeast extract Medium (MSYM) ประกอบด้วย Na_2NO_3 4, Na_2HPO_4 0.5, KH_2PO_4 1.5, $CaCl_2$ 0.01, $MgSO_4$ 0.2, $FeCl_3$ 0.0005 และ Yeast extract 0.1 g/L

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การแยกสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ และการประยุกต์ใช้ต่างๆ เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์

แผ่น Thin-layer chromatography (TLC) aluminium sheets silica gel 60 F_{254} ขนาด 20x20 cm layer thickness 0.2 mm (MERCK)

4. อุปกรณ์

- เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง รุ่น 420A บริษัท Orion Research, Inc
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น M.3525 - 1 บริษัท LAB - Line Instruments, Inc
- เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5403 บริษัท Eppendorf
- เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR 20 B บริษัท Hitachi
- เครื่องอบอากาศร้อน (Hot air oven) รุ่น MOV. 212 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd
- ตู้อบ (Universal oven) รุ่น UM 200 - 800 บริษัท Memmert
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS - 325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd
- เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) รุ่น SB - 651 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd
- เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น U - 2000 บริษัท Technical Cooperation
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210 s บริษัท Sartorius
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น HF - 1200 บริษัท A&D Company, Ltd
- เครื่องเขย่าหลอดทดลอง รุ่น GFL บริษัท Gesellschaft fur Labortechnik mbH
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc
- ตู้เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น S - 616 D
- โถดูดความชื้น (Desicator)
- เครื่อง IATRONSCAN TLC/FID Analyzer รุ่น Iatroscan, TH-10 Mark 5 บริษัท Iatron Laboratories, Inc
- Ring tensiometer รุ่น OS บริษัท Torsion balance supplier
- อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ

1.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

ปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสออกแล้วนำตะกอนเซลล์ไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) ใช้น้ำกลั่นเป็น blank และทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง (Kim *et al*., 1997)

1.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสออกแล้วนำตะกอนเซลล์อบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (Cooper and Goldenberg, 1987)

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

สารเคมี

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

   เตรียมโดยละลาย Sodium Potassium Tartate 12 g Na_2CO_3 anhydrous 24 g $NaHCO_3$ 16 g และ Na_2SO_4 (anhydrous) 144 g ในน้ำกลั่น 800 mL และเติมสารละลายที่มี $CuSO_4.5H_2O$ 4 g และ Na_2SO_4 36 g (ละลายในน้ำกลั่น 200 mL ก่อน) ผสมให้เข้ากัน ปริมาตร 200 mL ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันก่อนนำไปใช้กรอง (หากมีตะกอน) และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

   เตรียมโดยละลาย $(NH_4)MoO_4.4H_2O$ 50 g ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตรเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 42 mL คนให้เข้ากัน เติม $Na_2HAs_2O_4.7H_2O$ 3 g ที่ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กรอง (หากมีตะกอน) และเก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ 0.5 mL ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันที เติมสารละลายเนลสัน 0.5 mL ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 0.5 mL แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

3. การทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว

ทำการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก (cell free broth) โดยนำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว ดังต่อไปนี้

3.1 การวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว (surface tension) และค่า critical micelle concentration

การวัดค่าแรงตึงผิว นำส่วนใสของตัวอย่างที่ต้องการทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทดสอบด้วยเครื่อง ring tensiometer (Cooper *et al*., 1981) โดยมีหน่วยเป็น mN/m การหาค่า critical micelle concentration (CMC) หรือความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์หรือลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุด ในหน่วยกรัมต่อลิตร (g/L) โดยการนำสารลดแรงตึงผิวที่ได้ ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนถึงความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทำให้ไม่สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้อีกต่อไป ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง (Yakimov *et al*., 1995)

3.2 การวิเคราะห์ค่า emulsification activity (%EA) และ emulsion index (E24)

วิเคราะห์ค่า emulsification activity (%EA) และ emulsion index (E24) ตามวิธีการของ Cooper และ Goldenberg (1987) โดยการนำสาร hexadecane ปริมาตร 5 mL ผสมกับส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกตามวิธีการขั้นต้นหรือตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ปริมาตร 5 mL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ความเร็วสูงเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และ 24

ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาค่า emulsification activity (%EA) และ emulsion index (E24) ตามลำดับ ดังสมการ

$$\%EA \text{ หรือ } E24 = \frac{\text{ความสูงของ emulsion ที่เกิดขึ้น x100}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}}$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันดิบด้วยวิธี TLC/FID

ทำการสกัดน้ำมันดิบในตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์ม แยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีน้ำมันดิบละลายอยู่ นำมา spot บน silica gel rod SIII จากนั้นแยกในตัวทำละลายเคลื่อนที่ 3 ระบบ คือ ระบบที่ 1 คือ 100% n-hexane จนกระทั่งความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 10 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น ต่อด้วยระบบที่ 2 คือ 100% toluene ความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 5 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น และระบบที่ 3 คือ 95%dichloromethane : 5%methanol ความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 2 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น จากนั้นอบ silica gel rod SIII ที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการวิเคราะห์ปริมาณขององค์ประกอบในน้ำมันดิบด้วยเครื่อง TLC/FID ที่มีอัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที อากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระดับความเร็วในการสแกน 30 วินาทีต่อหนึ่งครั้งของการสแกน และทำการอินทิเกรตหาพื้นที่ใต้กราฟ (Sharma *et al*., 1998)

วิธีการทดลอง

1. การผลิตสารลดแรงตึงผิว

1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เขี่ยเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 จากหลอดอาหารวุ้นเอียง 1 ลูป ลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Prommachan, 2002)

1.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิว

การผลิตสารลดแรงตึงผิว ตามวิธีการของ Prommachan (2002) โดยการปิเปตเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 1.1 หน้า 27 ปริมาตร 10% ลงในอาหาร Modified Mckeen Medium 250 mL ในฟลาสก์ขนาด 500 mL เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือใน

ถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 1 ลิตร มีอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

2. การแยกสารลดแรงตึงผิวให้บริสุทธิ์บางส่วน

2.1 การตกตะกอนและการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในสภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการทดลองข้อ 1 หน้า 27 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีนำสารละลายส่วนใส (supernatant) ที่ได้ ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 หน้า 26 นำส่วนใสที่เหลือปรับพีเอชเป็น 2.0 ด้วย 6 N HCl เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เก็บเฉพาะตะกอน นำไปล้างด้วย 100 mM HCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 2 N NaOH และทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization โดยส่วนสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งนี้เรียกว่า ส่วนสกัดหยาบ (crude BS) และทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 หน้า 26 (Yakimov *et al.,* 1995)

เมื่อนำส่วนสกัดหยาบที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาละลายด้วยเมธานอล ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator และหาน้ำหนักที่แน่นอน จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบเมธานอล (crude MeOH)

2.2 การตรวจสอบองค์ประกอบในส่วนสกัดหยาบด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

ตรวจสอบส่วนสกัดหยาบเมธานอลจากข้อ 2.1 หน้า 28 โดย Thin Layer Chromatography (TLC) ที่มี silica gel 60 F_{254} เป็นตัวอยู่กับที่โดยนำไปแช่ในตัวเคลื่อนที่ คือ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ (65:15:1) โดยปริมาตร จุ่มด้วยสารละลาย Ehrich's reagent (ภาคผนวก ก) เป่าให้แห้ง สามารถสังเกตเห็นวงสารลิโปเปปไทด์เป็นสีขาว (Miller and Wright, 1982)

2.3 การแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ

เตรียมคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.4 เซนติเมตร โดยเติม silica gel 60 (70-230 mesh) ลงไปให้มีความสูงของ silica gel 36.5 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยคลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ (65:15:1) โดยปริมาตร นำส่วนสกัดหยาบเมธานอลจากข้อที่ 2.1 หน้า 28 มาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม

:เมธานอล:น้ำ (65:15:1) ปริมาตรเล็กน้อยและใส่ในส่วนบนสุดของคอลัมน์ชะด้วยตัวเคลื่อนที่ โดยเริ่มจาก คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ (65:15:1) ปริมาตร 1,000 mL และเพิ่มความมีขั้วของตัวเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ เป็น 70:30:1 60:40:1 20:80:1 ปริมาตรที่ใช้ในการชะคอลัมน์ความเข้มข้นละ 500 mL จนกระทั่งถึง เมธานอล:น้ำ 100:1 ปริมาตร 700 mL จากนั้นนำส่วนที่แยกได้ด้วยคอลัมน์แบบดูดซับแต่ละส่วนตรวจสอบองค์ประกอบด้วยวิธี TLC ดังข้อ 2.2 หน้า 28นำส่วนที่มีโครมาโตแกรมเหมือนกันรวมเข้าด้วยกันหาน้ำหนักที่แน่นอนของสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต้น ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 หน้า 26 และเก็บเฉพาะส่วนที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวสูงที่สุดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการประยุกต์ใช้ต่อไป

3. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิว

นำสารลดแรงตึงผิวที่ตกตะกอนด้วยกรด และส่วนสกัดหยาบเมธานอลจากข้อ 2.1 หน้า 28 ศึกษาสมบัติเบื้องต้นดังต่อไปนี้

3.1 ความคงตัวต่อความเป็นกรดด่าง (pH stability)

นำตัวอย่าง ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 2-12 และเก็บไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 หน้า 26

3.2 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ (Thermal stability)

นำตัวอย่าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 4 อุณหภูมิห้อง (30±2) 50 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 หน้า 26

3.3 ความทนเกลือ (Resistance to salt)

นำตัวอย่าง เติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-30% และทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 หน้า 26

4. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.1 การยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Alamar Blue Assay (Kanjana-Opas, 2002)

4.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิด คือ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่

30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เจือจางให้มีเซลล์อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม ตั้งแต่ $1.0x10^{4}$-$1.0x10^{8}$ CFU/mL ในอาหาร TSB ที่ผสมกับ Alamar blue ในอัตราส่วน 10 µl/mL ปิเปตสารละลายจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมไว้หลุมละ 100 µL ใส่ในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar blue ในหลุม ทุกๆ 2 ชั่วโมง จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เหมาะสมพิจารณาจากความเข้มข้นเชื้อจุลินทรีย์ที่น้อยที่สุดที่สามารถเปลี่ยน Alamar blue จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูได้ ภายในระยะเวลา 8-12 ชั่วโมง

4.1.2 การหาชนิดและปริมาณของสารต้านแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

นำสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากวิธีการทดลองข้อ 4.1.1 หน้า 29 ปริมาตร 100 µL ใส่ในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ยกเว้นในแถวที่ 1 ที่มีการเติมสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 190 µL จากนั้นเติมสารต้านแบคทีเรียมาตรฐาน ได้แก่ Ampicillin, Tetracyclin, Kanamycin และ Vancomycin ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 20 µg/mL ปริมาตร 10 µL ลงในแถวที่ 1 จากนั้นเจือจางสารต้านแบคทีเรียมาตรฐานลงครึ่งหนึ่งในแถวถัดไป โดยปิเปตสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบจากแถวที่ 1 ปริมาตร 100 µL ใส่ลงในแถวที่ 2 ซึ่งมีสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบ 100 µL ทำการเจือจางต่อไปจนถึงหลุมสุดท้ายที่จะต้องมีการเจือจาง และปิเปตสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบที่ผสมสารต้านแบคทีเรียแล้วทิ้งไป 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar blue ในหลุม ทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ปริมาณและชนิดของสารต้านแบคทีเรียมาตรฐานที่มากที่สุดที่ไม่สามารถเปลี่ยนสี Alamar blue ได้ นั่นคือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

4.1.3 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

นำสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากวิธีการทดลองข้อ 4.1.1 หน้า 29 เติมสารละลาย Alamar blue ในอัตราส่วน 10 µl/mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตมาปริมาตร 100 µL ใส่ในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ยกเว้นในแถวที่ 1 ที่มีการเติมสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 200 µL จากนั้นเติมสารที่ต้องการทดสอบ คือ ส่วนสกัดหยาบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

บางส่วนจากข้อ 2.3 หน้า 28 ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 1,250 μg/mL สำหรับเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และความเข้มข้นของสารทดสอบเริ่มต้นคือ 300 μg/ml สำหรับเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC11778 ปริมาตร 100 μL ลงไปในแต่ละหลุม เจือจางสารละลายทั้งหมดลงครึ่งหนึ่งในแถวถัดไป โดยปิเปตสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบจากแถวที่ 1 ปริมาตร 100 μL ใส่ลงในแถวที่ 2 ซึ่งมีสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบ 100 μL ทำการเจือจางต่อไปจนถึงหลุมสุดท้ายที่จะต้องมีการเจือจาง และปิเปตสารแขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบที่ผสมสารทดสอบส่วนเกินทิ้งไป 100 μL บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 8-12 ชั่วโมง บันทึกผลทุก 2 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี Alamar blue สังเกตหลุมที่มีสีน้ำเงินเข้มหลุมสุดท้ายของแต่ละคอลัมน์ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คำนวณหาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ทดสอบในหลุมนั้น ค่าความเข้มข้นที่ได้นี้คือค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เปรียบเทียบผลการทดลองกับสารต้านแบคทีเรียมาตรฐานที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1.2 หน้า 30

เมื่อบ่มครบระยะเวลาที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแล้ว นำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจาก 96 well plate มา streak บนอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) เพื่อดูว่าสารทดสอบนั้นมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบถูกยับยั้งการเจริญเติบโตแบบใดระหว่าง Bacteriostatic และ Bacteriocidal

4.2 การละลายสาร Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)

เพื่อวิเคราะห์จลนศาสตร์ของการละลายของสาร PAHs เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิว โดยละลายสาร naphthalene หรือ phenanthrene ใน 95% เอธานอล เป็น stock solution ความเข้มข้น 1,000 μg/mL จากนั้นปิเปตสารละลายจาก stock solution ลงในหลอดทดลองให้มีปริมาณสาร naphthalene หรือ phenanthrene 100 μg จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก และเติมสารลดแรงตึงผิวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆลงไป ได้แก่ 100 200 300 และ 400 μg/mL deionized water ปริมาตร 1 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปิเปตดูดเฉพาะส่วนที่ละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 และ 205 สำหรับ phenanthrene และ naphthalene ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Barkay *et al*., 1999)

4.3 การเก็บเกี่ยวน้ำมันโดยใช้ Sand Pack Column

วิธี Sand pack technique เป็นวิธีการทดสอบความสามารถของสารลดแรงตึงผิวในการเก็บเกี่ยวน้ำมันในระดับห้องปฏิบัติการ มีวิธีการคือ บรรจุทรายที่ผ่านการล้างด้วยกรด (acid-washed sand) 1 กรัม ลงในคอลัมน์แก้ว ขนาด 13.0x0.5 ซม. และแช่ด้วย weathered crude oil ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วปล่อยน้ำมันส่วนเกินไหลออกจากคอลัมน์ จากนั้นเติมส่วนใส ส่วนสกัดหยาบ หรือส่วนสกัดหยาบเมธานอล ความเข้มข้น 1 mg/mL ลงไป 3 มิลลิลิตร จากวิธีการทดลองข้อ 2.1 หน้า 28 โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นและsodium dodecyl sulfate (SDS) (1 mg/mL) วัดปริมาณของน้ำมันที่ถูกปล่อยออกมา

การวัดปริมาณของน้ำมัน weathered crude oil ที่ถูกชะออกมานั้น ทำได้โดยการสกัดน้ำมันออกมาด้วยตัวทำละลายคือ คลอโรฟอร์ม ถ่ายลงขวด vial ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก ชั่งน้ำหนักของ vial อีกครั้งหนึ่งเพื่อหาน้ำหนักของน้ำมันที่เพิ่มขึ้นโดยแต่ละชุดการทดลองให้ทำการเปรียบเทียบกับความสามารถในการชะด้วย SDS (Makkar and Cameotra, 1998)

4.4 การเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

โดยการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ผสมสำหรับทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยนำตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง 10 กรัม เติมลงในอาหาร MSYM ที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 0.3 จากนั้นเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ทำการถ่ายเชื้อต่ออีก 3 ครั้งบนอาหารสูตรเดิม เก็บเชื้อใน 20%glycerol เพื่อนำไปใช้ในการทดลองครั้งต่อไปเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium ทั้งหมด 2 สูตรอาหาร คือ

สูตรที่ 1 เติมน้ำมันดิบร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งคาร์บอน

สูตรที่ 2 เติมน้ำมันดิบร้อยละ 0.3 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* MUV4 ในอาหาร Modified Mckeen Medium 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมลงไปร้อยละ 10 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างเชื้อเพื่อวิเคราะห์การย่อยสลายน้ำมันดิบโดยวิธี TLC/FID ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 4 หน้า 27

$$\text{ร้อยละการย่อยสลายน้ำมันดิบ} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ-พื้นที่ใต้กราฟเริ่มต้น x 100}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟเริ่มต้น}}$$