

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Modified Mckeen Medium

กลูโคส	10.0	กรัม
monosodium glutamate	10.0	กรัม
yeast extract	3.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.02	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
trace element	1.0	มิลลิลิตร

นำน้ำตาลกลูโคสละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และละลายส่วนผสมอื่นๆที่เหลือในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อทำการนึ่งฆ่าเชื้อของทั้งสองส่วนแล้วจึงนำมาผสมเข้าด้วยกัน

หมายเหตุ : trace element ประกอบด้วย (กรัม ต่อ น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)

MgSO ₄ ·4H ₂ O	0.5	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.015	กรัม

2. Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

Agar	15.0	กรัม
------	------	------

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Trypticase soy broth

Tryptone	15.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
NaCl	1.5	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. Trypticase soy agar

Tryptone	15.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
NaCl	1.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. Mineral Salt Yeast extract Medium (MSYM)

Na_2NO_3	4.0	กรัม
Na_2HPO_4	0.5	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
CaCl_2	0.01	กรัม
MgSO_4	0.2	กรัม
FeCl_3	0.0005	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Crude oil	3.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. สารละลาย Ehrich's reagent

เตรียมโดยนำสาร 4-dimethylamino benzaldehyde 1 กรัม ละลายในเมทานอล 75 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (36%) ลงไป 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ ซึ่งจะปรากฏเป็นจุดสีขาบบนแผ่น TLC

8. สารละลาย Ammonium molybdate-perchloric acid (Lee *et al.*, 2006)

เตรียมโดยนำสาร ammonium molybdate 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 60% ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ ซึ่งจะปรากฏเป็นจุดสีขาบบนแผ่น TLC

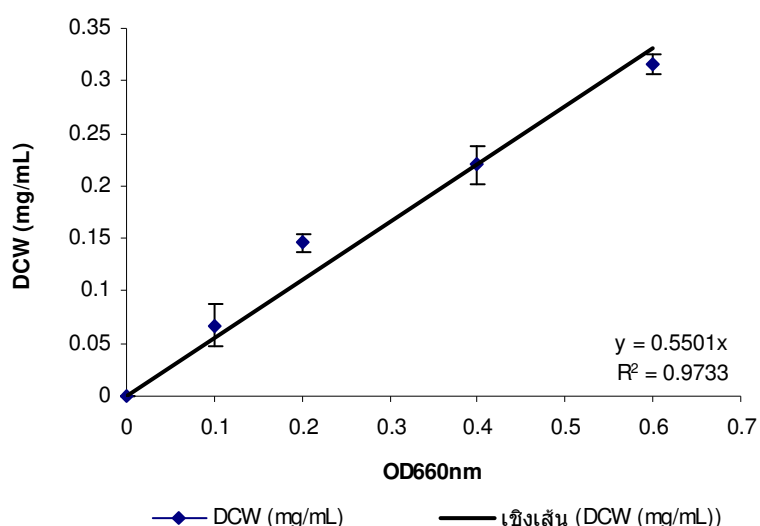
ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานเชื้อจุลินทรีย์ และสารเคมี

1. การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4

เตรียมกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 โดยนำเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในช่วง mid-log phase มาทำการปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.6 และปิเปตเซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ด้วยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนในออกแล้วนำตะกอนเซลล์อบให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้ง

วิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* MUV4 ที่ชั่วโมงต่างๆ ในความเจือจางที่เหมาะสม 3 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งกับกราฟมาตรฐานของการเจริญเติบโต

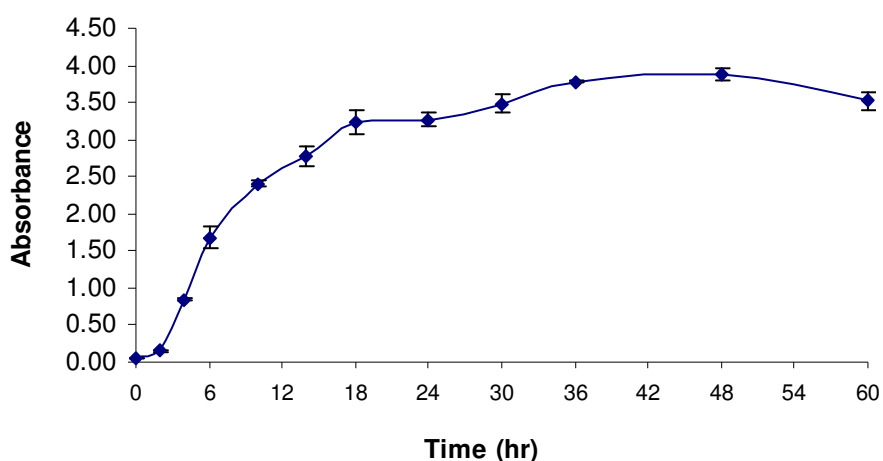


ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* MUV4

Figure 28. Standard growth curve of *Bacillus subtilis* MUV4.

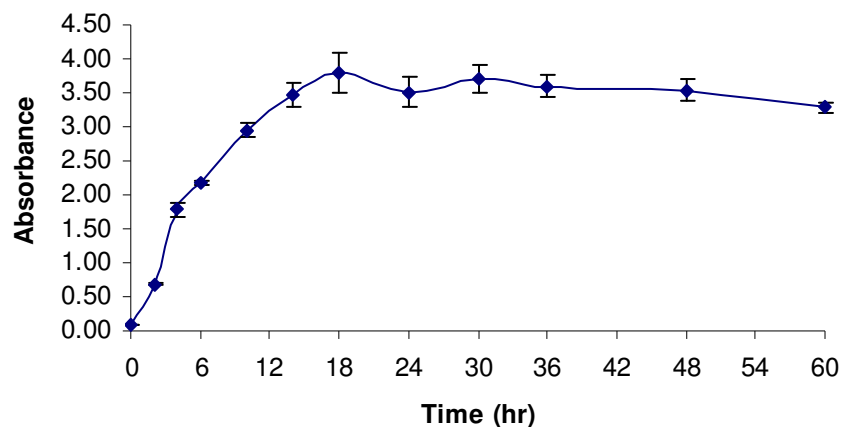
2. การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เตรียมกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยเก็บตัวอย่างของเซลล์ที่ชั่วโมงต่างๆ และเขียนกราฟการเจริญเติบโตระหว่างเวลาและค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ เพื่อนำเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในช่วง mid-log phase ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 และนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยวิธีการ spread plate พบว่า *B. cereus* ATCC11778 มีช่วง mid-log phase ที่ 10 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเป็น 8.46×10^9 CFU/mL เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มีช่วง mid-log phase ที่ 10 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเป็น 3.65×10^9 CFU/mL และ *S. aureus* ATCC 25923 มีช่วง mid-log phase ที่ 20 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเป็น 1.19×10^9 CFU/mL



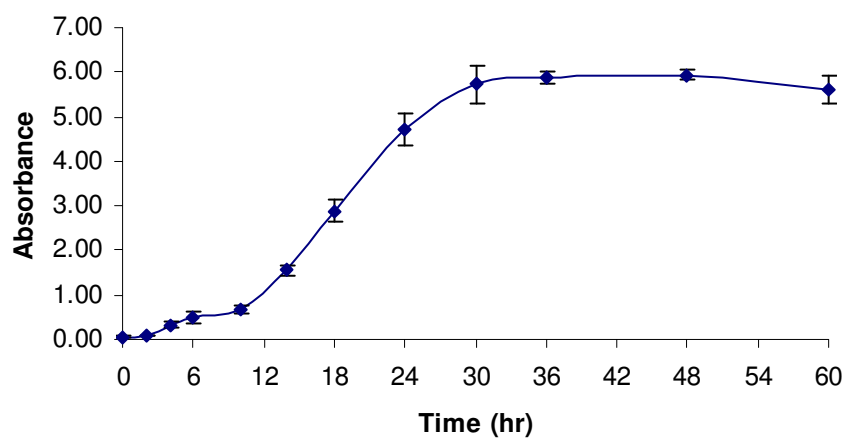
ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของ *Bacillus cereus* ATCC11778

Figure 29. Standard growth curve of *Bacillus cereus* ATCC11778.



ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* ATCC 25922

Figure 30. Standard growth curve of *Escherichia coli* ATCC 25922.



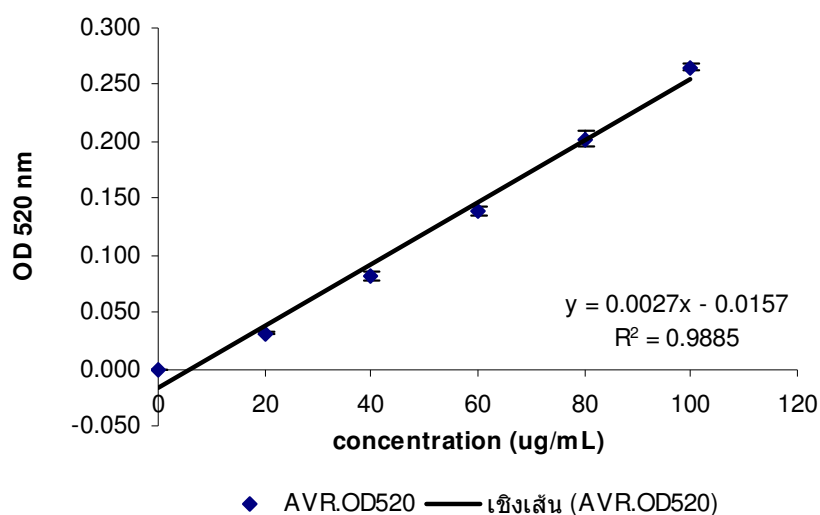
ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Figure 31. Standard growth curve of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2 หน้า

25

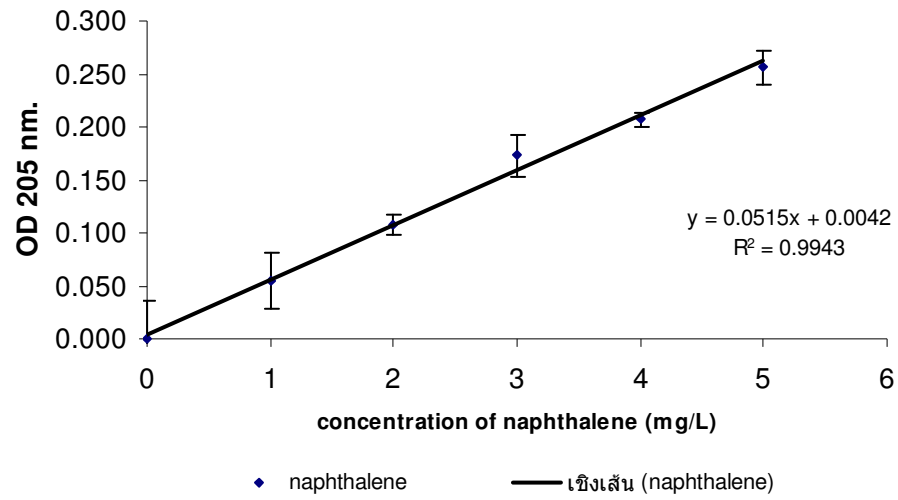


ภาพที่ 32 กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์

Figure 32. Standard curve of reducing sugar.

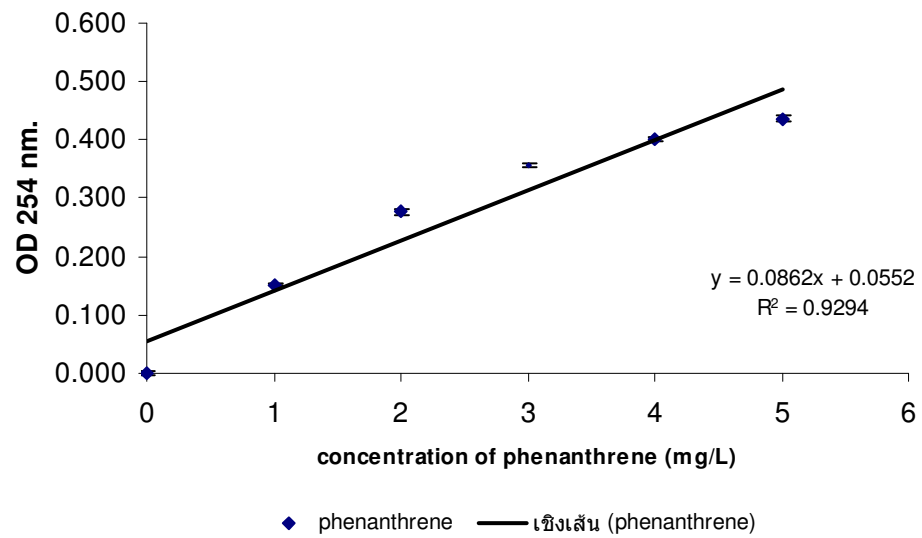
4. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbons

เตรียม stock solution ของ naphthalene และ phenanthrene ในตัวทำละลาย 95%Ethanol จากนั้นนำ stock solution ของสารทั้งสองละลายในน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 mg/L เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน นำไปวัดค่าการละลายด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 และ 254 nm. สำหรับ naphthalene และ phenanthrene ตามลำดับ



ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานสาร Naphthalene

Figure 33. Standard curve of naphthalene.



ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานสาร Phenanthrene

Figure 34. Standard curve of phenanthrene.

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางที่ 16 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2.5% ในระดับขวดเขย่า

Table 16. Growth and biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen medium with 2.5%(w/v) glucose in shaken-flask condition.

Hr	pH	DCW (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)	Surface tension [†] (mN/m)
0	7.08±0.02 ^b	0.22±0.01 ^a	24.34±1.21 ^f	54.00±1.32 ^c
6	6.63±0.02 ^a	2.45±0.03 ^b	22.54±1.51 ^{ef}	50.17±0.37 ^b
12	6.58±0.11 ^a	5.75±0.08 ^d	19.39±1.16 ^{de}	34.83±0.58 ^a
18	7.25±0.11 ^c	9.00±0.45 ^e	16.06±1.53 ^{cd}	33.67±0.29 ^a
24	7.34±0.07 ^c	9.92±0.40 ^f	14.20±1.01 ^c	33.50±0.87 ^a
36	7.98±0.06 ^e	10.15±0.12 ^f	13.83±1.36 ^{bc}	33.50±0.50 ^a
48	8.12±0.05 ^f	8.54±0.07 ^d	12.17±1.89 ^{abc}	33.17±0.29 ^a
60	8.12±0.06 ^f	5.91±0.22 ^d	11.49±1.18 ^{abc}	33.67±0.29 ^a
72	7.96±0.07 ^e	3.57±0.25 ^c	9.27±1.60 ^{ab}	33.07±0.12 ^a
84	7.85±0.03 ^d	3.09±0.11 ^{bc}	8.71 ±1.80 ^a	33.33±0.29 ^a
96	7.80±0.02 ^d	2.97±0.04 ^{bc}	8.96 ±1.66 ^a	33.60±0.17 ^a

* ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

[†] ทดสอบกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวโดยการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1.0% ในระดับขวดเขย่า

Table 17. Growth and biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen medium with 1.0%(w/v) glucose in shaken-flask condition.

hr	pH	DCW (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)	Surface tension [†] (mN/m)
0	7.31±0.00 ^c	0.22±0.01 ^a	9.98±0.25 ^f	53.50±0.50 ^g
6	6.52±0.20 ^a	3.18±0.01 ^c	9.40±1.62 ^c	45.00±0.30 ^f
12	6.61±0.05 ^b	7.33±0.01 ^h	3.10±0.72 ^d	38.50±0.50 ^e
18	6.87±0.20 ^c	8.80±0.01 ⁱ	1.45±0.21 ^c	36.80±0.29 ^d
24	6.96±0.08 ^d	8.80±0.03 ⁱ	1.43±0.54 ^c	36.80±0.50 ^d
36	7.65±0.08 ^f	5.33±0.01 ^g	1.07±0.75 ^{ab}	34.00±0.40 ^{bc}
48	7.89±0.10 ^g	4.73±0.01 ^f	1.27±0.50 ^{ab}	33.50±0.50 ^{ab}
60	7.91±0.02 ^g	4.05±0.02 ^e	1.05±0.66 ^{ab}	33.80±0.40 ^{ab}
72	8.08±0.03 ^j	3.70±0.01 ^d	1.30±0.50 ^{ab}	33.80±0.50 ^{ab}
84	8.06±0.05 ⁱ	3.61±0.01 ^d	0.95±0.25 ^a	33.00±0.50 ^a
96	8.03±0.08 ^h	2.61±0.01 ^b	0.87±1.48 ^a	34.50±0.30 ^c

* ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(p<0.05)

[†] ทดสอบกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวโดยการใช้น้ำส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 18 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium (1.0%w/v glucose) ในถังหมักที่ไม่มีการควบคุมพีเอช และให้อากาศ 1.0 vvm

Table 18. Growth and biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen medium (1.0%w/v glucose) in fermenter with uncontrolled pH and 1.0 vvm of aeration rate.

hr	pH	DCW (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)	Surface tension [†] (mN/m)
0	7.43±0.03 ^c	0.22±0.00 ^a	9.97±0.10 ⁱ	54.67±0.29 ^e
6	6.36±0.01 ^a	4.91±0.01 ^d	7.58±0.35 ^h	50.67±1.15 ^{cd}
12	7.20±0.01 ^b	7.31±0.01 ^f	5.39±0.06 ^g	50.33±0.58 ^{bcd}
18	8.09±0.03 ^c	7.71±0.04 ^g	4.51±0.25 ^f	49.00±0.00 ^b
24	8.08±0.04 ^c	8.41±0.02 ^h	4.54±0.25 ^e	45.83±0.29 ^a
36	8.02±0.02 ^d	9.37±0.02 ⁱ	2.42±0.13 ^e	49.33±0.29 ^{bc}
48	8.17±0.02 ^f	9.88±0.02 ^j	1.22±0.03 ^d	51.67±1.89 ^d
60	8.44±0.02 ^g	9.88±0.02 ^j	0.89±0.00 ^c	54.67±1.44 ^e
72	8.72±0.01 ⁱ	6.40±0.02 ^e	0.59±0.38 ^b	55.50±0.00 ^e
84	8.84±0.02 ^j	2.39±0.01 ^c	0.52±0.05 ^{ab}	60.17±0.29 ^f
96	8.62±0.01 ^h	2.13±0.01 ^b	0.45±0.05 ^a	60.00±0.00 ^f

* ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

[†] ทดสอบกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวโดยการใช้ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 19 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Modified Mckeen Medium ในถังหมักที่ไม่มีการควบคุมพีเอช และให้อากาศ 0.5 vvm

Table 19. Growth and biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen medium (1.0%w/v glucose) in fermenter with uncontrolled pH and 0.5 vvm of aeration rate.

Hr	pH	DCW (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)	Surface tension [†] (mN/m)
0	7.18±0.02 ^g	0.16±0.00 ^a	9.97±0.31 ^e	55.67±0.29 ⁱ
6	6.88±0.02 ^f	3.47±0.01 ^c	9.30±0.72 ^f	57.00±0.50 ^h
12	6.07±0.03 ^a	5.39±0.01 ^e	3.75±0.15 ^c	51.83±0.29 ^g
18	6.77±0.04 ^d	6.25±0.02 ^f	2.78±0.50 ^b	50.83±0.29 ^f
24	6.30±0.04 ^b	6.71±0.01 ^g	1.97±0.40 ^f	87.00±0.50 ^e
36	6.51±0.02 ^c	7.68±0.12 ^h	0.92±0.13 ^c	52.00±0.50 ^d
48	6.73±0.04 ^d	8.02±0.07 ⁱ	0.51±0.21 ^f	57.17±0.29 ^c
60	6.83±0.02 ^e	6.11±0.03 ^f	0.44±0.08 ^e	55.83±0.76 ^{bc}
72	6.91±0.03 ^f	5.25±0.11 ^e	0.38±0.04 ^a	46.83±0.76 ^{abc}
84	6.82±0.03 ^e	3.70±0.06 ^d	0.24±0.05 ^b	50.67±0.29 ^{ab}
96	6.74±0.03 ^d	2.32±0.16 ^b	0.20±0.01 ^d	54.17±1.04 ^a

* ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

[†] ทดสอบกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวโดยการใช้น้ำส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 20 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Modified Mckeen Medium ในถังหมักที่ไม่มีการควบคุมพีเอช และไม่ให้อากาศ

Table 20. Growth and biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen medium (1.0%w/v glucose) in fermenter with uncontrolled pH and no aeration rate.

hr	pH	DCW (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)	Surface tension [†] (mN/m)
0	7.20±0.04 ^h	0.12±0.15 ^a	9.97±0.12 ^h	53.00±0.50 ^g
6	6.86±0.01 ^{fg}	1.12±0.20 ^d	9.38±0.50 ^g	52.33±0.29 ^f
12	6.05±0.03 ^a	1.85±0.13 ^e	3.62±0.15 ^f	52.00±0.45 ^f
18	6.81±0.00 ^e	5.00±0.11 ^g	2.54±0.35 ^d	48.83±0.29 ^c
24	6.32±0.01 ^b	5.22±0.29 ^h	2.04±0.10 ^c	39.67±0.29 ^d
36	6.54±0.01 ^c	2.21±0.34 ^f	0.90±0.25 ^b	37.17±0.29 ^c
48	6.75±0.03 ^d	1.08±0.21 ^c	0.47±0.05 ^{ab}	36.50±0.31 ^b
60	6.83±0.02 ^{ef}	1.00±0.23 ^b	0.37±0.03 ^{ab}	36.80±0.58 ^{bc}
72	6.89±0.06 ^g	1.00±0.18 ^b	0.35±0.03 ^{ab}	35.33±0.29 ^a
84	6.83±0.03 ^{ef}	1.00±0.19 ^b	0.22±0.04 ^a	35.17±0.29 ^a
96	6.75±0.03 ^d	1.00±0.22 ^b	0.20±0.01 ^a	35.00±0.34 ^a

* ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

[†] ทดสอบกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวโดยการใช้ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 21 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Modified Mckeen Medium ในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอช และไม่ให้อากาศ

Table 21. Growth and biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen medium (1.0%w/v glucose) in fermenter with controlled pH and no aeration rate.

hr	pH	DCW (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)	Surface tension [†] (mN/m)
0	7.09±0.01 ^c	0.30±0.06 ^a	9.51±0.45 ^g	55.83±0.76 ^c
6	7.00±0.00 ^a	1.56±0.16 ^b	8.49±0.40 ^f	46.00±1.80 ^d
12	7.02±0.02 ^{ab}	1.93±0.18 ^d	6.67±0.10 ^c	38.50±0.50 ^c
18	7.03±0.01 ^b	3.13±0.08 ^f	5.56±0.50 ^d	35.50±0.00 ^b
24	7.01±0.00 ^{ab}	3.47±0.11 ^h	3.86±0.30 ^c	35.33±0.29 ^b
36	7.03±0.01 ^b	4.79±0.21 ⁱ	3.15±0.50 ^b	34.00±0.50 ^a
48	7.07±0.00 ^c	3.25±0.14 ^g	1.00±0.03 ^a	33.83±0.29 ^a
60	7.07±0.02 ^c	2.28±0.18 ^e	0.98±0.03 ^a	34.00±0.23 ^a
72	7.07±0.03 ^c	1.68±0.20 ^c	0.99±0.05 ^a	34.00±0.50 ^a
84	7.01±0.02 ^{ab}	1.67±0.11 ^c	0.95±0.10 ^a	33.83±0.29 ^a
96	7.06±0.01 ^c	1.69±0.12 ^c	0.93±0.12 ^a	33.67±0.29 ^a

* ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

[†] ทดสอบกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวโดยการใช้ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 22 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวของเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4

Table 22. Effect of pH to biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4.

ก. ค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

pH	Surface Tension (mN/m)				
	supernatant	Crude BS	crude MeOH	SDS	DW
2	56.83±0.29	48.50±0.00	35.17±0.29	32.83±0.29	70.67±0.76
4	50.17±0.00	44.83±0.29	32.33±0.29	30.17±0.29	70.50±0.00
6	37.50±0.00	42.17±0.29	32.50±0.29	30.00±0.29	71.00±0.00
7	35.00±0.29	35.17±0.29	33.17±0.29	29.33±0.00	71.00±1.00
8	35.00±0.29	35.33±0.29	33.50±0.29	30.00±0.00	70.50±0.00
10	35.00±0.29	35.00±0.29	33.50±0.00	30.67±0.29	70.67±0.76
12	35.50±0.29	40.17±0.29	37.67±0.29	32.83±0.29	70.67±0.76

ข. ค่า %Emulsification activity (%EA)

pH	%EA				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
2	16.67±0.00	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06
4	33.33±0.06	42.86±0.10	0.00±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00
6	66.67±0.06	50.00±0.00	33.33±0.06	66.67±0.06	0.00±0.00
7	66.67±0.06	67.00±0.06	53.33±0.06	71.43±0.06	0.00±0.06
8	50.00±0.10	33.33±0.06	33.33±0.06	66.67±0.06	0.00±0.06
10	50.00±0.10	16.67±0.06	16.67±0.06	66.67±0.06	0.00±0.06
12	42.86±0.06	14.29±0.06	0.00±0.06	66.67±0.06	0.00±0.06

ค. ค่า Emulsion Index (E24)

pH	E24				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
2	0.00±0.00	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06
4	0.00±0.10	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00
6	66.67±0.10	33.33±0.00	0.00±0.06	66.67±0.06	0.00±0.00
7	66.67±0.06	33.33±0.06	33.33±0.06	71.43±0.06	0.00±0.06
8	33.33±0.10	0.00±0.06	0.00±0.06	66.67±0.06	0.00±0.06
10	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.06	66.67±0.06	0.00±0.06
12	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.06	66.67±0.06	0.00±0.06

ตารางที่ 23 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวของเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4

Table 23. Effect of temperature to biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4.

ก. ค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

Temperature (°C)	Surface Tension (mN/m)				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
4	35.00±0.00	34.50±0.29	34.67±0.29	32.33±0.00	71.17±0.58
RT (30±2)	35.00±0.00	35.00±0.00	34.00±0.29	31.83±0.00	70.50±0.00
50	35.00±0.58	35.00±0.87	33.83±0.29	31.67±0.29	70.00±1.15
100	40.50±0.50	40.00±0.29	34.83±0.29	35.33±0.29	70.00±0.00

ข. ค่า %Emulsification activity (%EA)

Temperature (°C)	%EA				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
4	71.43±0.06	66.67±0.10	54.50±0.10	71.43±0.06	0.00±0.06
RT (30±2)	66.67±0.10	66.67±0.06	54.50±0.06	71.43±0.06	0.00±0.06
50	61.54±0.06	0.00±0.10	33.33±0.10	71.43±0.10	0.00±0.10
100	57.14±0.06	0.00±0.00	16.67±0.00	71.43±0.06	0.00±0.10

ค. ค่า Emulsion Index (E24)

Temperature	E24				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
4	14.29±0.10	50.00±0.06	50.00±0.06	71.43±0.10	0.00±0.06
RT (30±2)	66.67±0.06	33.33±0.06	16.67±0.06	71.43±0.06	0.00±0.06
50	61.54±0.06	0.00±0.10	0.00±0.06	71.43±0.06	0.00±0.10
100	57.14±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	71.43±0.06	0.00±0.10

ตารางที่ 24 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวของเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4

Table 24. Effect of NaCl to biosurfactant activity from *Bacillus subtilis* MUV4.

ก. ค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

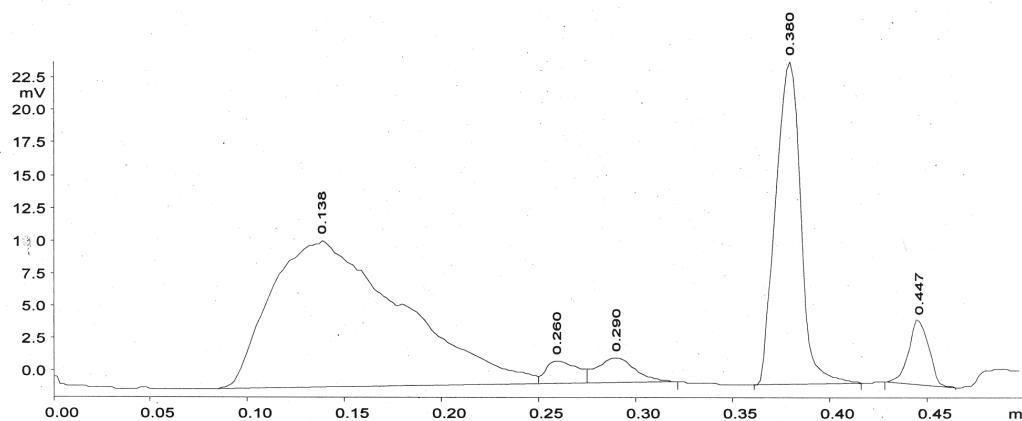
% (w/v) NaCl	Surface Tension (mN/m)				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
0	35.00±0.00	40.00±0.00	34.20±0.29	31.50±0.00	72.17±0.00
1	35.00±0.00	39.50±0.29	34.00±0.29	31.50±0.00	72.00±0.58
3	33.50±0.29	30.50±0.29	30.50±0.00	31.67±0.29	72.17±0.76
5	32.50±0.29	30.50±0.29	30.50±0.29	31.67±0.29	72.17±0.76
10	32.00±0.29	30.67±0.00	30.50±0.29	31.67±0.29	72.00±0.76
20	36.50±0.58	36.00±0.87	30.50±0.29	38.67±0.29	72.17±1.15
30	49.50±0.50	48.17±0.29	41.00±0.29	41.83±0.29	72.00±0.00

ข. ค่า %Emulsification activity (%EA)

% (w/v) NaCl	%EA				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
0	66.67±0.10	66.67±0.06	54.55±0.06	71.43±0.06	0.00±0.06
1	66.67±0.10	66.67±0.06	50.00±0.06	72.00±0.06	0.00±0.06
3	50.00±0.06	33.33±0.10	50.00±0.06	71.43±0.10	0.00±0.10
5	33.33±0.10	33.33±0.06	16.67±0.06	50.00±0.10	0.00±0.06
10	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06
20	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.10
30	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.06

ค. ค่า Emulsion Index (E24)

% (w/v) NaCl	E24				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
0	66.67±0.06	33.33±0.10	16.67±0.06	71.43±0.10	0.00±0.06
1	33.33±0.06	16.67±0.00	16.67±0.06	50.00±0.06	0.00±0.06
3	16.67±0.10	16.67±0.06	0.00±0.06	33.33±0.10	0.00±0.10
5	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.06
10	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06
20	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.10
30	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.06



ภาพที่ 35 ลักษณะ TLC/FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันดิบในชุดควบคุม

Figure 35. TLC/FID chromatogram of crude oil components.

Note : Saturated hydrocarbon (RT=0.147±0.01), Aromatic hydrocarbon (RT=0.289±0.01)

Resin (RT=0.394±0.01) and Asphaltene (RT=0.464±0.01) analyzed by TLC/FID method.

ตารางที่ 25 ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน

Table 25. Effect of biosurfactant to crude oil degradation by microorganisms from soil contaminated oil.

- a. cultured in MSYM and no biosurfactant
b. cultured in MSYM and supplemented with biosurfactant

a.

Peak	%decreasing or increasing of crude oil components		
	in MSYM		
	0 day	3 day	7 day
SA	0.00	-3.91%	-19.96%
AR	0.00	-27.54%	-27.54%
RE	0.00	1.72%	-8.62%
AS	0.00	30.60%	28.36%

b.

Peak	%decreasing or increasing of crude oil components		
	in MSYM + BS		
	0 day	3 day	7 day
SA	0.00	-66.43%	-96.63%
AR	0.00	8.64%	-33.78%
RE	0.00	8.45%	25.82%
AS	0.00	-33.71%	-29.75%

Note : SA = saturated hydrocarbon AR = aromatic hydrocarbon

RE = resin AS = asphaltene

- refer to decrease of the components compared to 0 day