บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

(1.) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch&Lomb,U.S.A.

(2.) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 ของบริษัท Bausch&Lomb,U.S.A.

(3.) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น R – 88 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc, U.S.A.

(4.) กระดาษกรอง (Millipore membrane) รุ่น GF/A pore size 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation , U.S.A.

(5.) กระดาษกรอง Whatman No. 40

(6.) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutechcyberscan, Singapore.

(7.) เครื่องถ่ายเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply, Thailand.

(8.) หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autocave) รุ่น SS-35 ของบริษัท Tomy SeikoCo.,Ltd.,Tokyo,Japan.

(9.) เครื่องชั่งรุ่น L2200p และ A200s ของบริษัท Sartorius, U.S.A.

(10.) ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freeze) อุณหภูมิ –20 °C รุ่น FO535 ของบริษัท Sanyo Electric.Co.,Ltd.,Japan.

(11.) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น VSM – 3 ของบริษัท Shelton scientific, U.S.A.

(12.) กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH-CO1-764604 ของบริษัท Olympus,Japan.

(13.) ก๊าซโครมาโทกราฟี (Hewlett Packard Gas Chromatography model 5890 series II)

(14.) Hewlett Packard vectra VL2 4/50 microcomputer

(15.) Hewlett Packard deskjet 500 inkjet printer

(16.) คอลัมน์ชนิด Capillary column model J&W DB-5 (เส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์เท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร) ความหนาของ film thickness เท่ากับ 0.25 ไมโครเมตร

(17.) เครื่องอัดอากาศ (Air compressor)

(18.) เครื่องสูบน้ำแบบรีดสาย (Peristatic pump)

(19.) กรวยแยก (Separating funnel)

(20.) เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Vacuum rotary evaporator) ของบริษัท Eyela, Japan.

(21.) ขวดแก้ว (Vial) ที่มีฝาเกลียวปิดสนิท

(22.) ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 3 ลิตร

(23.) ขวดแก้วรูปทรงกรวย ขนาด 250 ml

(24.) ขวดแก้วรูปทรงกรวย ขนาด 500 ml

(25.) ขวดแก้วรูปทรงกรวย ขนาด 1,000 ml

(26.) จานเลี้ยงเชื้อ (Petridish) ขนาด 16 x 150 mm.

(27.) ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 mm.

(28.) ปิเปต (Pipette) ขนาด 5 mm.

(29.) ปิเปต (Pipette) ขนาด 10 mm.

(30.) Spreader glass

(31.) Parafilm M

(32.) กรวยกรอง

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

(1.) แอมโมเนียมไนเตรท (Ammonium nitrate) NH_4NO_3 ของบริษัท E.Merck, Germany.

(2.) แบคโต – เปปโตน (Bacto – Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

(3.) แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) $CaCl_2$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

(4.) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) $CHCl_3$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

(5.) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate) K_2HPO_4 ของบริษัท E. Merck, Germany.

(6.) เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E. Merck, Germany.

(7.) กลีเซอรอล (Glycerol) $C_3H_8O_3$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

(8.) ก๊าซฮีเลียม (Helium) (99.99%) He ของบริษัท TIG.,Thailand.

(9.) ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen) (99.99%) H_2 ของบริษัท TIG.,Thailand.

(10.) ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen) (99.99%) N_2 ของบริษัท TIG.,Thailand.

(11.) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Hydrochloric acid) HCl ของบริษัท E. Merck, Germany.

(12.) เฟอริกคลอไรด์ (Iron(III) chloride) FeCl3 ของบริษัท Fluka chemical, Switzerland.

(13.) แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate) $MgSO_4$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

(14.) เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E. Merck, Germany.

(15.) อาหารเหลวนิเตรียนท์ (Nutrient broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

(16.) วุ้นผง

(17.) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) KH_2PO_4 ของบริษัท E. Merck, Germany.

(18.) โพแทสเซียมไนเตรท (Potassium nitrate) KNO_3 ของบริษัท E. Merck, Germany.

(19.) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) NaCl ของบริษัท E. Merck, Germany.

(20.) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) NaOH ของบริษัท E. Merck, Germany.

(21.) โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate anhydrous) Na_2SO_4 ของบริษัท E. Merck, Germany.

(22.) น้ำมันดิบ Tapis (Tapis crude oil) จาก Bangchak oil refinery, Thailand.

(23.) 1 – อิโคซีน (1 – Eicosene) $C_{20}H_{42}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

(24.) นอร์มัลเฮกเซน (n – Hexane) C_6H_{14} ของบริษัท E. Merck, Germany.

(25.) นอร์มอลเตตระเดกเคน (n – Tetradecane) $C_{14}H_{30}$ ของบริษัท Sigma, U.S.A.

(26.) นอร์มอลโดคอนเซน (n – Docosane) $C_{22}H_{46}$

(27.) นอร์มอลไตรคอนเซน (n – Tricosane) $C_{23}H_{48}$

(28.) นอร์มอลเตตระคอนเซน (n – Tetracosane) $C_{24}H_{50}$

(29.) นอร์มอลเพนตระคอนเซน (n – Pentacosane) $C_{25}H_{52}$

(30.) นอร์มอลออกตระคอนเซน (n – Octacosane) $C_{28}H_{58}$ ของบริษัท alltech Associates Inc.

(31.) น้ำกลั่น

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย ดังรูปที่ 3.1

(1.) *Bacillus sp.* B 3 – 1

(2.) *Pseudomonas sp.* C 1 – 2

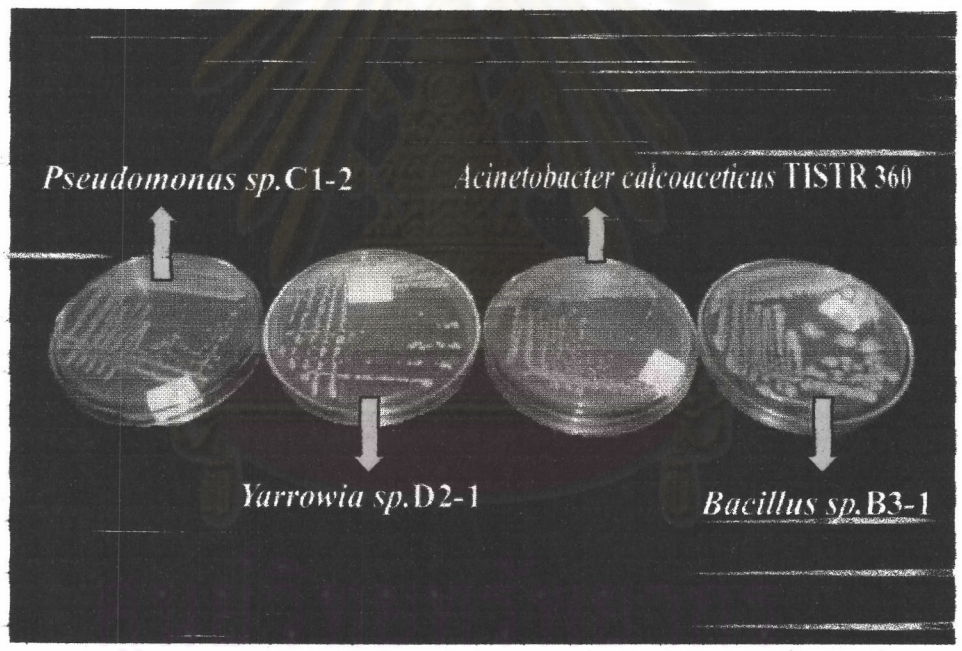
(3.) *Yarrowia sp.* D 2 – 1

หมายเหตุ : *Bacillus sp.* B 3 – 1, *Pseudomonas sp.* C 1 – 2,และ *Yarrowia sp.* D 2 – 1 ได้จากตามวิธีของ ปัญจพล ชิโนดม (2543)

(4.) *Acinetobacter calcoaceticus* TISTR 360 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

โดย *Bacillus sp.* B 3 – 1 , *Pseudomonas sp.* C 1 – 2 , *Yarrowia sp.* D 2 – 1 เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ (Tapis crude oil) ส่วน *Acinetobacter calcoaceticus* TISTR 360 ใช้เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

3.4 น้ำมันดิบ (Tapis crude oil) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทบางจากมหาชน (จำกัด) (Bangchak oil refinery) ถนนสุขุมวิท ซอย 64 กรุงเทพฯ มีองค์ประกอบของน้ำมันดิบดังตารางที่ 1 - จ ในภาคผนวก จ

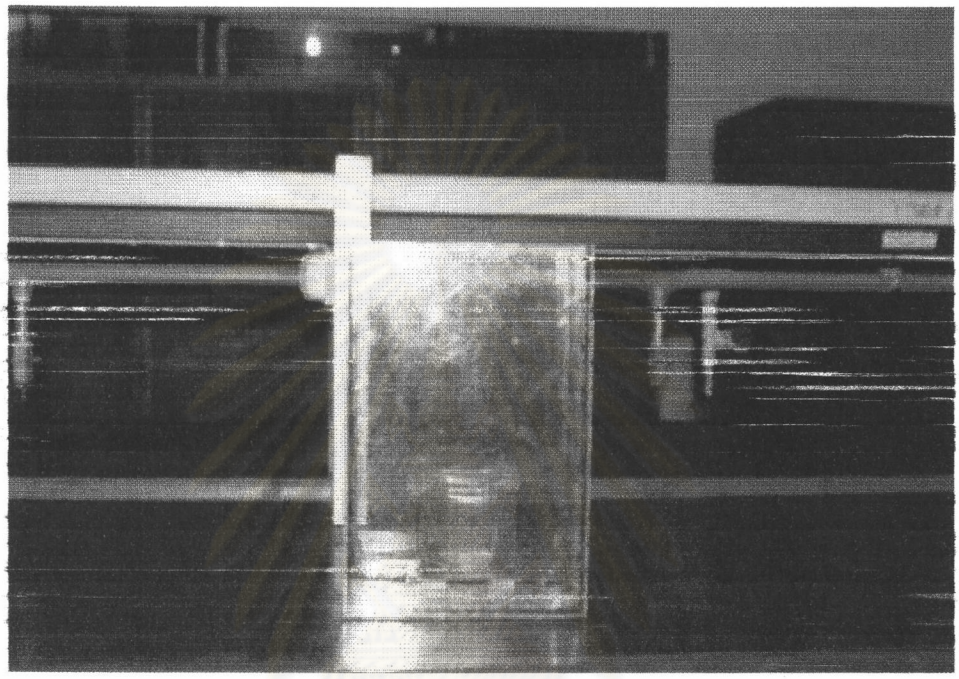


รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.5 ส่วนประกอบของระบบถังหมักที่ใช้

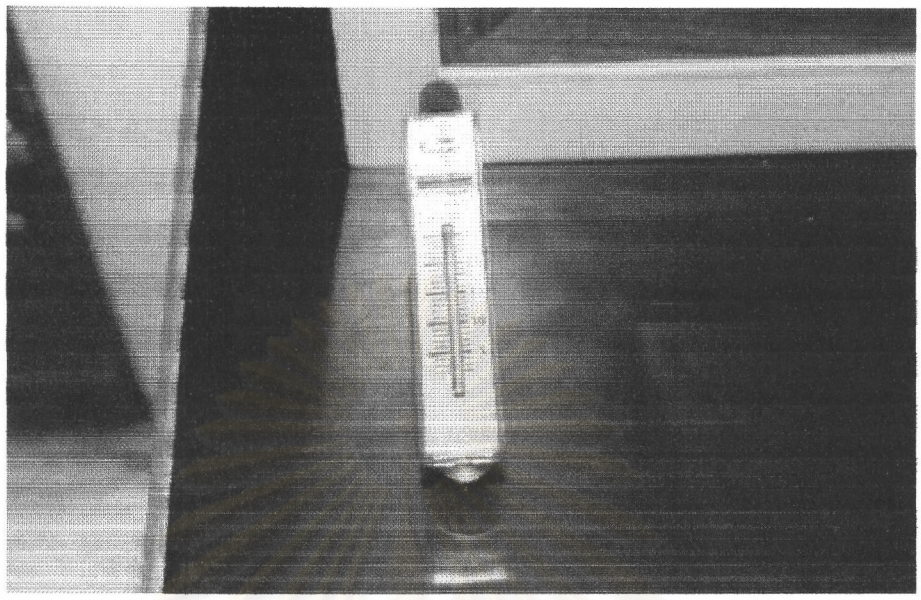
ถังหมักเป็นถังอะคริลิกใสหนาขนาด 0.3 เซนติเมตร เมื่อต่อเป็นถังหมักมีขนาดความจุประมาณ 5 ลิตร ดังรูปที่ 3.2 ซึ่งภายในถังใช้กระบอกพลาสติกตัดหัวและท้ายกระบอกแล้ว ตรึงกระบอกพลาสติกด้วยเอ็นให้อยู่ตรงกลางถังปฏิกิริยา และบรรจุหัวกระจายอากาศให้อยู่ตรงกลางภายในกระบอกเพื่อให้น้ำในถังปฏิกิริยาเกิดการหมุนวนและผสมกัน โดยอากาศจะมาจากเครื่องปั๊มอากาศ

ปล่อยผ่านสายยางซึ่งมีวาล์วปรับและใช้ Rota meter ดังรูปที่ 3.4 ปรับอัตราการให้อากาศตามที่ต้องการก่อนเข้าถังปฏิกิริยา ในการทดลองถังปฏิกิริยาจะถูกควบคุมอุณหภูมิตามที่ต้องการ โดยอุณหภูมิจากเครื่องควบคุมจะถูกส่งผ่านคอล์ย และจะมีการถ่ายเทอุณหภูมิจากคอล์ยผ่านน้ำที่หล่อเลี้ยงอยู่ในกล่องโฟมซึ่งบรรจุถังปฏิกิริยาเอาไว้ ดังรูปที่ 3.3

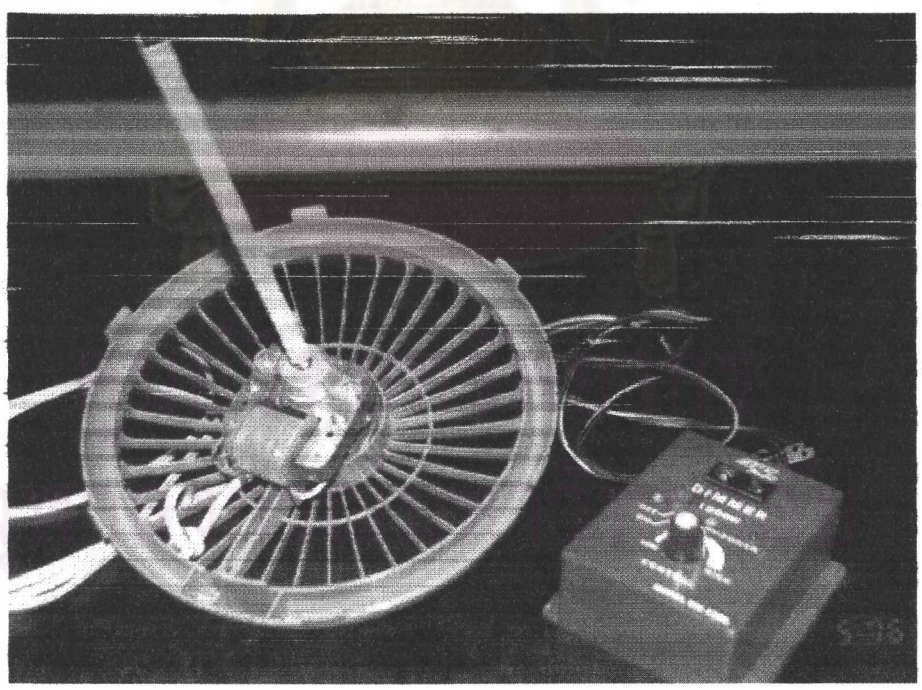


รูปที่ 3.2 ถังหมักที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3.3 ระบบถังหมักที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 3.4 โรตามิเตอร์ (Rota meter)



รูปที่ 3.5 เครื่องมือที่สร้างขึ้นเพื่อช่วยทำให้ตัวอย่างผสมกันดีขึ้นก่อนการเก็บตัวอย่าง

3.6 การเก็บตัวอย่างจากระบบถังหมัก

ในการเก็บตัวอย่างจากถังหมักจะทำการเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0 , 1 , 3 , 5 , 7 ซึ่งมีขั้นตอนการเก็บตัวอย่างดังต่อไปนี้

(1.) ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะต้องใช้ไมโครปิเปตชะคราบน้ำมันบางส่วนที่ติดอยู่ข้างถังหมักลงมาให้หมด

(2.) จากนั้นใช้เครื่องกวนที่ดัดแปลงขึ้นมา ดังรูปที่ 3.5 เพื่อกวนให้เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึงและทำให้อนุภาคของน้ำมันที่จับเป็นก้อนแตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เป็นเวลานานประมาณ 2 – 3 นาที

(3.) เก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อเพื่อวิเคราะห์วัดค่า optical density (OD_{600}) และวัดปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable Cell Count)

(4.) เก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 20 มิลลิลิตรวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรคาร์บอนของน้ำมันดิบที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่ในขวดแก้วรูปทรงกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตร ชะตัวอย่างที่เหลือติดกับอุปกรณ์เก็บตัวอย่างอีกครั้งด้วยตัวทำละลาย ซึ่งในที่นี้ใช้เฮกเซน เป็นตัวทำละลาย และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการสกัดน้ำมันดิบออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

3.7 การเตรียมหัวเชื้อ

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับขวดเขย่า

เตรียมหัวเชื้อของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิด โดยเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์จากหลอดอาหารเอียง (Nutrient agar slant) อายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว BH broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จนได้ความหนาแน่นของเชื้อที่ต้องการ โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้ได้อยู่ในช่วง 1 – 2 จึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

3.7.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับถังหมัก

เตรียมหัวเชื้อของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดทำโดยเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ จากหลอดอาหารเอียง (Nutrient agar slant) อายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว BH broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จนได้ความหนาแน่นของเชื้อที่ต้องการ โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้ได้อยู่ในช่วง 1 – 2 จากนั้นนำเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ผสมกันตามอัตราส่วนที่ต้องการใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วนำหัวเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเหลว BH brothในถังหมักปริมาตร 3 ลิตร ที่ผสมน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

3.8 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.8.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับขวดเขย่า

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell - Haas (BH broth) ซึ่งแสดงในภาคผนวก ก มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง เริ่มต้นตามที่ต้องการนี้ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCL นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 °ซ เป็นเวลานาน 15 – 20 นาที

3.8.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับถังหมัก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell - Haas (BH broth) ซึ่งแสดงในภาคผนวก ก ให้ได้ปริมาตรรวม 2,700 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง เริ่มต้นตามที่ต้องการด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCL และบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 1,000 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 5 ขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 °ซ เป็นเวลานาน 15 – 20 นาที และใช้หัวเชื้อในการทดลอง 10 % โดยปริมาตร (เท่ากับ 300 มิลลิลิตร) ซึ่งใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 3.7.2 ดังนั้นในถังหมักนี้จะมีปริมาตรทั้งหมดรวม 3 ลิตร ส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองในการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่อง จะต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell - Haas (BH broth) ไว้ให้มีความเข้มข้นเดียวกันตลอดระยะเวลาที่ทดลอง โดยเตรียมในรูปของสารละลายเข้มข้น (Stock solution) แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรที่ต้องการ

3.9 การเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบระหว่างในขวดเขย่ากับถังหมัก และศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบในถังหมัก

3.9.1 การเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ในขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.7.1 ปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BH broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ผสมน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีกรองด้วยเครื่อง Millipore filter เป็นแหล่งคาร์บอนอีกครั้ง ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มาผสมกันโดยที่ให้อัตราส่วนระหว่างเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น เท่ากับ 2:1 ใช้ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 °ซ ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 0 – 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 3, 5, 7 จากนั้นนำมาวิเคราะห์วัดค่า optical density (OD_{600}) และวัดปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable Cell Count) ตามวิธีข้อ 3.10.2 และวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรคาร์บอนของน้ำมันดิบที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีข้อ 3.10.1 โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบในระดับถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งใช้ภาวะที่เหมาะสมเดียวกันกับในระดับขวดเขย่าข้างต้น แต่ใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 v.v.m. (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที) ซึ่งในระดับถังหมักจะเตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 3.7.2

3.9.2 การเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ในถังหมัก

เลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ตามวิธีข้อ 3.7.2 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) และมีการเปลี่ยนแปลงภาวะในการเลี้ยงเชื้อดังนี้

3.9.2.1 หาอัตราส่วนหัวเชื้อที่ทำงานได้ดีและเหมาะสมสำหรับการย่อยสลายน้ำมันดิบ

นำหัวเชื้อของจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticus* T ISTR 360 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ และ *Bacillus sp.* B 3 – 1 , *Pseudomonas sp.* C 1 – 2 , *Yarrowia sp.* D 2 – 1 ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น ในอัตราส่วน 1 : 1 และ 2 : 1 ผสมรวมกันในอาหาร BH broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 เป็นระยะเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 1, 3, 5, 7 จากนั้นนำมาวิเคราะห์วัดค่า optical density (OD_{600}) และวัดปริมาณ

จุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable Cell Count) ตามวิธีข้อ 3.10.2 และวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรคาร์บอนของน้ำมันดิบที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีข้อ 3.10.1

3.9.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบสำหรับเชื้อผสม (Mixed Culture)

หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อผสม โดยทำการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ผสมกันตามวิธีข้อ 3.7.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth ในสภาวะตามข้อวิธีข้อ 3.9.2.1 แต่เปลี่ยนแปลงสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

(1.) การแปรผันความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้น ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็น 6.0 , 7.0,และ 8.0 โดยเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมและใช้ภาวะเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ตามข้อ 3.9.2.1

(2.) การแปรผันอุณหภูมิเป็น 25 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส , และ 35 องศาเซลเซียส โดยจะทำการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth โดยเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมตามข้อ 3.9.2.1 และค่าความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมตามข้อ (1.) โดยใช้ภาวะเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ตามข้อ 3.9.2.1

(3.) การแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.1 v.v.m, 0.5 v.v.m และ 1.0 v.v.m (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที) จะทำการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BH broth โดยเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมตามข้อ 3.9.2.1 และและค่าความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ (1.) และข้อ (2.) ตามลำดับ โดยใช้ภาวะเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ตามข้อ 3.9.2.1

(4.) เปรียบเทียบการเติมอาหารแบบ Batch และแบบต่อเนื่อง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell and Haas ตามภาคผนวก ก และน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเตรียมหัวเชื้อและใช้สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมที่หาได้ข้างต้น และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ตามข้อ 3.9.2.1

โดยการทดลองแบบต่อเนื่อง จะใช้ค่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่เหลือจากการทดลองแบบ Batch ที่ภาวะที่เหมาะสม มาหาค่าอัตราการไหล (Flow Rate) และค่าเวลากักเก็บ (Detention Time) สำหรับใช้กับระบบแบบต่อเนื่อง และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลองที่ภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้อัตราส่วนของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้กับกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ เท่ากับ 2 : 1 ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 8.0 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 °ซ และอัตราการให้อากาศ เท่ากับ 1.0 v.v.m. (โดยปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่เหลือที่ภาวะที่เหมาะสมแบบ Batch ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลา(วัน)	THC (%)	THC (mg/l)	THC (mg/3l)	% Removed
0	100	3,997	11,991	0
1	9.12	364.53	1,093.58	90.88
3	6.26	250.21	750.64	93.74
5	2.18	87.14	261.40	97.82
7	1.83	73.15	219.44	98.17

หมายเหตุ THC หมายถึง ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่เหลือ

จากตารางที่ 3.1 จะเห็นว่าในวันที่ 0 มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 3,997 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน (หรือ 24 ชั่วโมง) พบว่ามีปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่เหลืออยู่ในระบบเท่ากับ 364.53 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นเมื่อใช้เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดหายไปจากระบบ เท่ากับ 3,997 – 364.53 = 3,632.47 มิลลิกรัมต่อลิตร และถ้าใช้เวลา 1 ชั่วโมง จะมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดหายไปจากระบบ เท่ากับ 151.47 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นจะต้องให้สารอาหารแก่ระบบด้วยอัตราการไหล เท่ากับ 151.35 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (mg/L/h) หรือ เท่ากับ 454.05 มิลลิกรัมต่อ 3 ลิตรต่อชั่วโมง (mg/ 3L/h)

หาเวลากักเก็บจากสูตร

$$DT = \frac{V}{F}$$

เมื่อ DT คือ เวลากักเก็บ (Detention Time) หน่วยเป็น ชั่วโมง

V คือ ปริมาตรของน้ำเสีย (Volume) หน่วยเป็น มิลลิลิตร

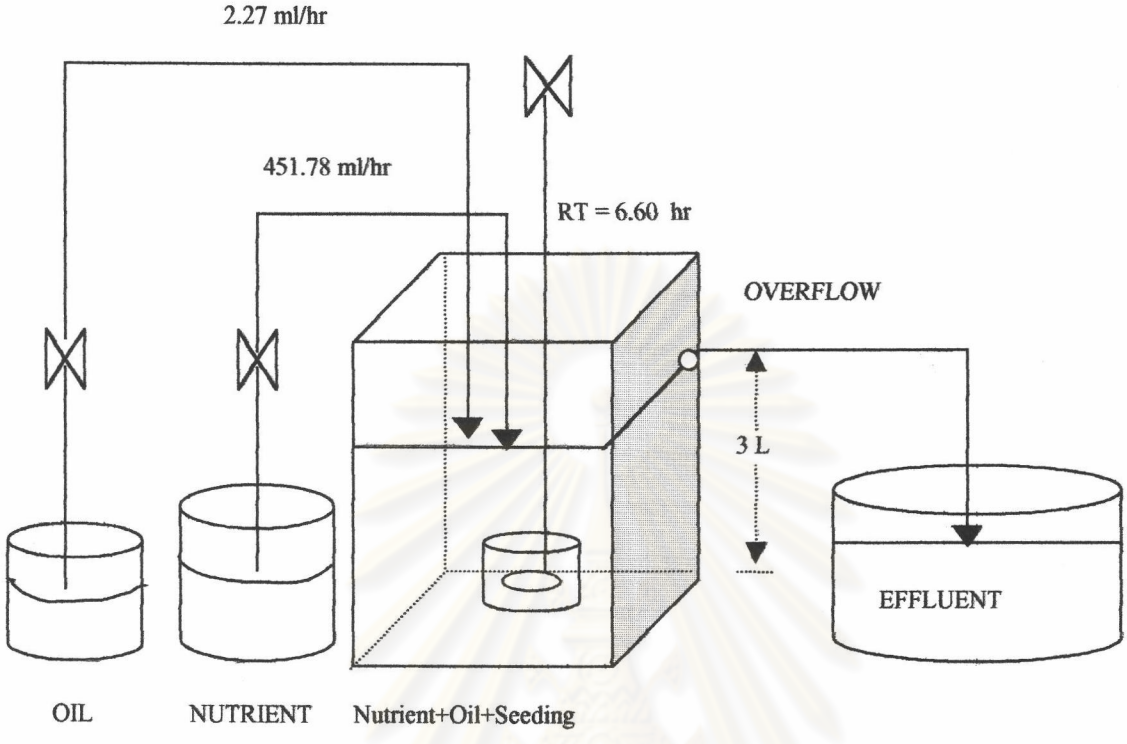
F คือ อัตราการไหล (Flow Rate) หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

แทนค่า จะได้

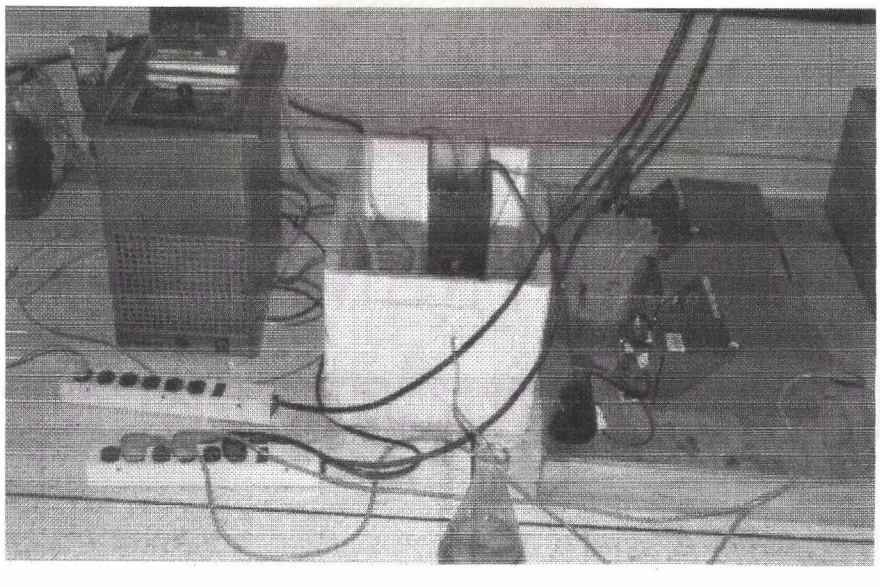
$$DT = \frac{3{,}000}{454.05}$$

$$DT = 6.60 \text{ ชั่วโมง}$$

ดังนั้นเวลากักเก็บของระบบจะเท่ากับ 6 ชั่วโมง 36 นาที



รูปที่3.6 การติดตั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลองการเติมสารอาหารแบบต่อเนื่อง (Continuous)



รูปที่ 3.7 การทดลองการเติมสารอาหารแบบต่อเนื่อง (Continuous)

3.10 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนและจำนวนจุลินทรีย์

3.10.1 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอน

3.10.1.1 การสกัดน้ำมันดิบออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ปัญจพล ชิโนดม , 2543)

นำตัวอย่างสารละลายปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เลี้ยงเชื้อจนได้เวลาตามต้องการ เติมสารละลาย 1 – อิโคเซน (Eicosane) ในคลอโรฟอร์ม ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร(w/v) จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารก่อนสกัดเพื่อเป็น Internal Standard (IS) จากนั้นจึงใส่อาหารลงในกรวยแยก (Separating funnel) เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเป็นเวลานาน 2 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น โดยแยกคลอโรฟอร์มที่มีน้ำมันอยู่ในชั้นล่างลงในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายน้ำมันในคลอโรฟอร์มที่สกัดได้ผ่านโซเดียมซัลเฟต 20 กรัม บนกระดาษกรอง Whatman No.40 เพื่อดูดน้ำออกจากสารละลาย แล้วสกัดน้ำมันที่เหลืออยู่อีกครั้งโดยใช้คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการเขย่าและตั้งทิ้งไว้และกรองด้วยกระดาษกรองเช่นเดิมจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยแยกคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ ความดันอากาศ 160 mmHg ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 35 °ซ จนกระทั่งคลอโรฟอร์มระเหยหมด จากนั้นนำน้ำมันดิบที่ได้มาเติมเฮกเซน 5 มิลลิลิตร เพื่อละลายน้ำมันดิบ แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง GF/A บรรจุเก็บไว้ในขวดที่มีฝาเกลียวปิดสนิท (Vial) นำไปเก็บไว้ที่ –20 °ซ เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่เหลือด้วยก๊าซโครมาโทกราฟี

3.10.1.2 การวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบที่สกัดได้โดยใช้ Capillary Gas Chromatography

นำสารละลายน้ำมันดิบในเฮกเซนที่ผ่านการสกัดแล้วจากข้อ 3.10.1.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ฉีดลงในเครื่อง Gas Chromatography ยี่ห้อ Hewlett Packard รุ่น 5890 serie 2 ซึ่งมี Flame Ionization Detector (FID) เป็นตัวตรวจวัดและบันทึกคำนวณผลด้วย Hewlett Packard Vectra VL2 4/50 Microcomputer คอลัมน์ใช้ Capillary column J&W DB – 5 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์เท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร มีความหนาของ film thickness เท่ากับ 0.25 ไมโครเมตร และความยาวเท่ากับ 30 เมตร โดยมีการตั้งค่าโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิของ Injector เท่ากับ 280 °ซ และอุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 310 °ซ โดยที่อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์เท่ากับ 100 °ซ และรักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิให้ได้ 250 °ซ โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 8 °ซ ต่อนาที และรักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 270 °ซ โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 2 °ซ ต่อนาที และรักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 5 นาที ใช้ฮีเลียม (He) เป็น Carrier gas โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที มีโปรแกรมเวลาทั้งหมดเท่ากับ 36.75 นาที

3.10.2 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ (อรรถวุฒิ อิ่มพูลทรัพย์ , 2537)

3.10.2.1 การวิเคราะห์วัดค่า Optical density (OD)

นำตัวอย่างสารละลายเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนมาวัดค่า Optical density ใน Cuvette ที่มีขนาดทางเดินแสง 10 มิลลิเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร เทียบกับน้ำกลั่น

3.10.2.2 การวิเคราะห์วัดปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable Cell Count)

นำตัวอย่างสารละลายเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน 1 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ค่าที่เหมาะสมในน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว นำ 0.1 มิลลิลิตรของสารละลายที่ทำการเจือจางเหมาะสมแล้วไปเกลี่ยบนอาหารวุ้นนิวเทรียนท์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 °ซ จนกระทั่งเห็นโคโลนีขึ้นอย่างชัดเจน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นโดยในแต่ละเพลท (Plate) ทำซ้ำ 3 ซ้ำ จะต้องมีค่าอยู่ในช่วง 30 – 300 โคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อตามสูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณเชื้อ (Viable Cell Count ; CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ X ค่าการเจือจาง}}{\text{ปริมาตรที่เกลี่ยบนอาหาร}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย