



รายงานการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการ
บำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน

Isolation of biosurfactant producing bacteria from enhance
oil pollution remediation

ฉานิกา แซ่แง่ ชุกลิน Chanika Saenge Chooklin
กัตตินาฏ สกุสวัสติพันธ์ Kattinat Sakulsawasdipan
วรรณกร กิจจะ Wannakon Kitja

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
ประจำปี พ.ศ. 2564

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันใน ครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ในปีงบประมาณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม 2564

การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาศักยภาพในการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียในการย่อยสลายคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การแก้ปัญหาโดยส่วนใหญ่ยังคงใช้สารเคมีซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้ผลิต ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม การศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อราก่อโรคโดยชีววิธีซึ่งเป็น มิตรกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อม รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ ทีมวิจัย ที่ปรึกษาการวิจัย ที่ได้ให้วิชาการความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้ทำรายงานขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้

ฉานิกา แซ่แง ซุกลิน
สิงหาคม 2565



การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการบำบัดสภาพแวดล้อม ที่ปนเปื้อนน้ำมัน

มานิกา แซ่แง¹ ชุกกลิ่น¹ กัตตินาฏ สกุลสวัสดิพันธ์¹ วรรณกร กิจจา²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างดิน และน้ำทะเลในจังหวัดตรัง การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตะกอนดินทะเลและน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน บริเวณท่าเรือปากเมง ท่าเรือเกาะลิบง และท่าเรือหาดยาว จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM) ซึ่งมี น้ำมันก๊าด 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาสามารถแยกเชื้อ แบคทีเรียได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อทั้ง 31 ไอโซเลท มาทดสอบการติดสีแกรมพบว่า ทั้ง 31 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 25 ไอโซเลท เป็นแกรมบวก 6 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PM 08 ไปเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนส่วน 16S rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus oceanisediminis* 100% จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM 08 พบว่า สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำมันปาล์มใช้แล้ว โดยสามารถเจริญได้สูงสุด 3.12 กรัมต่อลิตรและเจริญเติบโตได้สูงสุด 3.72 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนจากการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วของ *Bacillus oceanisediminis* PM08 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.5% ได้ดีที่สุดและ *Bacillus oceanisediminis* PM08 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดด้วย

คำสำคัญ: สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คราบน้ำมัน แบคทีเรีย

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

² คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอ เจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนา กรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์

Isolation of biosurfactant producing bacteria from enhance oil pollution remadiation

Chanika Saenge Chooklin¹ Kattinat Sakulsawasdipan¹ Wannakon Kitja²

Abstract

This study isolated bacteria capable of producing biosurfactants from soil samples and sea water in Trang Province Isolation of biosurfactant-producing bacteria from marine sediments and oil-contaminated seawater. Pak Meng Pier Koh Libong Pier and Hat Yao Pier Bacteria were isolated in a mineral salt medium (MSM) containing 2 percent of kerosene (volume by volume) as a carbon source. The study was able to isolate the infection. A total of 31 isolates of bacteria were obtained. When all 31 isolates were tested for gram staining, it was found that all 31 isolates were gram-negative 25 isolates were gram-positive 6 isolates. The isolates of PM 08 bacteria were compared by sequencing analysis on 16S rRNA segments. They were found to be 100% close to *Bacillus oceanisediminis*. Optimal conditions for biosurfactant production were studied from *Bacillus oceanisediminis* PM 08 found that can grow in spent palm oil. The maximum growth was 3.12 g/l and 3.72 g/l when peptone was used as nitrogen source from the spent oil degradation study of *Bacillus oceanisediminis* PM08. Used at 0.5% concentration best and *Bacillus oceanisediminis* PM08 showed the highest growth.

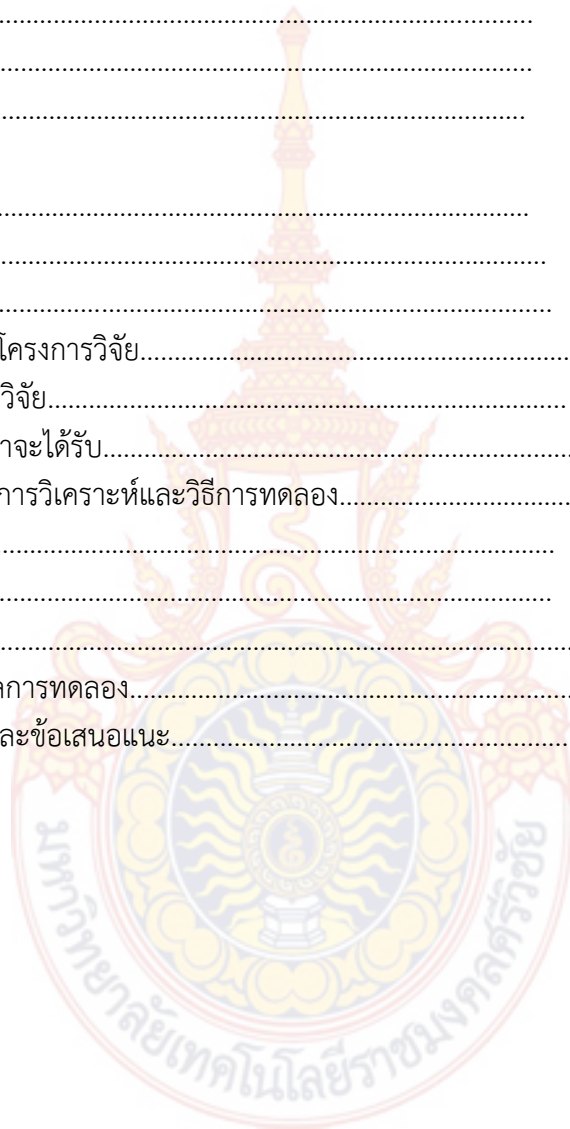
Keyword: Biosurfactant, Use oil, Bacteria

¹ Department of Environmental, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang.

² Faculty of Agricultural Technology, Rhatchapat Banjaopraya University

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
ตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	12
ขอบเขตโครงการวิจัย.....	12
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	13
2 วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง.....	14
วัสดุและอุปกรณ์.....	14
วิธีการวิเคราะห์.....	14
วิธีการทดลอง.....	15
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	17
4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	26
5 เอกสารอ้างอิง.....	28



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะแกรมของไอโซเลทต่างๆ	18
2	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยง (surface tension reduction: SR) และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA)	19
3	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	21
4	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ <i>Bacillus oceanisediminis PM08</i>	21
5	กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (%EA) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ	23
6	กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (%EI) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ	23



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	Fourier transform infrared spectroscopy spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากเชื้อ <i>PM08</i>	24
2	ไดอะแกรม Thermogravimetric ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ <i>PM08</i>	25



บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การขยายตัวทางเศรษฐกิจอย่างรวดเร็ว ทำให้ความต้องการพลังงานของประเทศมีเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะน้ำมันซึ่งเป็นพลังงานหลักที่สำคัญ แหล่งน้ำมันของประเทศไทยส่วนใหญ่มาจากภายนอกประเทศ โดยเฉพาะจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ น้ำมันที่นำเข้ามาประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นน้ำมันดิบ ซึ่งเป็นสินค้านำเข้าสูงสุดอันดับที่ 1 และ รองลงมาเป็นน้ำมันเชื้อเพลิง และน้ำมันสำเร็จรูปอื่นๆ ซึ่งปริมาณการนำเข้าน้ำมันดิบมีแนวโน้มสูงมากขึ้นทุกปี การนำเข้าน้ำมันส่วนใหญ่โดยการขนส่งทางเรือ เมื่อมีการขนส่งน้ำมันผ่านทะเล มหาสมุทรจำนวนบ่อยครั้งขึ้น จำนวนเรือบรรทุกน้ำมัน, เรือสินค้า การดำเนินกิจกรรมต่างๆในทะเลและชายฝั่งจึงเพิ่มสูงตามไปด้วย สิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุที่อาจก่อให้เกิดคราบน้ำมัน (oil spill) ในทะเลขึ้น ซึ่งเป็นปัญหามลภาวะต่อระบบนิเวศ ทรัพยากรธรรมชาติ สถานที่ท่องเที่ยว อันส่งผลถึงความเสียหายทางเศรษฐกิจ และความมั่นคงของประเทศ คราบน้ำมันที่รั่วไหลนี้บางส่วนจะเลือนหายไปจากผิวน้ำด้วยกระบวนการแปรสภาพต่างๆ ตามธรรมชาติ (weathering process) อาทิ เช่น การละลาย (dissolution) การระเหย (evaporation) การกระจายตัว (dispersion) การรวมตัว (emulsion) การตกตะกอน (sedimentation) การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (biodegradation) เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งเป็นสารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เพื่อใช้ทดแทนสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน เนื่องจากมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตต่างๆ น้อยกว่าการใช้สารเคมี (Banat, 1995 ; Ron และ Rozenberg, 2002) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active substance) ซึ่งสร้างโดยสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย และยีสต์บางชนิด สารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ละลายในไขมัน (lipophilic portion) และส่วนที่ละลายน้ำ (hydrophilic portion) (Fiechter, 1992) จะเห็นได้ว่ามีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่หลากหลาย เพื่อใช้ในการขจัดคราบน้ำมันทดแทนการใช้สารเคมี ทั้งนี้เนื่องจากสามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradability) ได้ง่าย ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำ และยังสามารถส่งเสริมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (biodegradation) ให้รวดเร็วยิ่งขึ้น (Edward และคณะ, 2003) โดยเฉพาะการย่อยสลายสารที่ โมเลกุลใหญ่ไม่ละลายน้ำมีความหนืดสูง เช่น น้ำมันดิบ (Crude oil หรือ petroleum) ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีสลับซับซ้อน ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนดินทะเล น้ำทะเล ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและศึกษาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ตรวจเอกสาร

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประกอบ amphipathic ที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขี้ (hydrophilic head group) และส่วนที่ไม่มีขี้ (lipophilic tail) มีสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active agent) หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsifying agent) สามารถพบได้ในธรรมชาติ ทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Banat et al., 2010)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งส่วนที่ชอบน้ำจะมีทั้งที่เป็นประจุ และไร้ประจุ และประกอบไปด้วยหมู่ของ โมโน (mono-), ได (di-), หรือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), หมู่คาร์บอกซิลิก, กรดอะมิโน และเปปไทด์ ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และกรดไขมันแอลกอฮอล์ (Lang, 2002) โดยคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ความสมดุลระหว่างส่วนที่มีขี้และส่วนที่ไม่มีขี้ และจากสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน จึงสามารถช่วยให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ง่ายขึ้น เนื่องจากจะไปช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้

1.1 การจัดกลุ่มสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มต่างๆ โดยอาศัยความแตกต่างของโครงสร้างโมเลกุลโดยทั่วไปจะแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีส่วนที่ชอบน้ำ ประกอบด้วย กรดอะมิโน หรือ เปปไทด์, หมู่โมโน-, ได-, หรือโพลีแซคคาไรด์ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

ไกลโคลิปิด (Glycolipid)

เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับ long-chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids โดยการเชื่อมหมู่เอเทอร์และเอสเทอร์ ไกลโคลิปิดที่รู้จักกันดี คือ rhamnolipids, trehalolipids and sophorolipids

ลิโปเปปไทด์และลิโปโปรตีน (Lipopeptides and lipoproteins)

เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประกอบด้วยเปปไทด์หรือกรดอะมิโน ส่วนใหญ่พบในกลุ่มของ cyclic lipopeptides ประกอบด้วย decapeptide antibiotics (Gramicidins) และ lipopeptides antibiotics (Polymyxins) สารในกลุ่มนี้จะมีไขมันจับอยู่กับสายโพลีเปปไทด์

ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids)

ฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยลิปิดและฟอสเฟตเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดกรดไขมันและฟอสโฟลิปิด เมื่อใช้ *n*-alkanes เช่น phosphatidylethanolamine จาก *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N สามารถทำให้เกิดอิมัลชันของ alkanes ในน้ำ phosphatidylethanolamine ผลิตได้จาก *Rhodococcus erythropolis* ที่เจริญในอาหารที่มี *n*-alkanes สามารถลดแรงตึงระหว่างผิวน้ำและ *n*-hexadecane ให้มีค่าน้อยกว่า 1 มิลลินิวตันต่อเมตร และ CMC เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (Singer et al., 1985)

โพลีเมอริก (Polymeric biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริกที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย คือ emulsan, liposan, alasan, lipomanan และ polysaccharide protein complex ชนิดอื่น ๆ *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวออกภายนอกเซลล์เป็นสารประกอบของ polyanionic amphipathics heteropolysaccharide ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี Emulsan สามารถเกิดอิมัลซิไฟด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในกรณีกับไฮโดรคาร์บอนในน้ำเมื่อใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.001 ถึง 0.01% Liposan เกิดภายนอกเซลล์ โดย *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนร้อยละ 83 และ 17 ตามลำดับ

1.2 สมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน เช่น โกลโคลิปิด ฟอสโฟลิปิด กรดไขมัน และ นิวทรัลลิปิด สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์ ลิโปโปรตีน และลิโปเปปไทด์ ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละกลุ่มมีสมบัติและหน้าที่ที่หลากหลายแตกต่างกัน

สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวัดค่าแรงตึงผิวเป็นวิธีการเบื้องต้น สำหรับการวัดกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยที่น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะมีค่าแรงตึงผิวน้อยลงเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบผลของกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวค่อนข้างยาก ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์และสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ทั้งชนิดและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอช การให้อากาศ เป็นต้น (Banat et al., 2010)

กิจกรรมการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเกลือในส่วนของ aqueous phase ตัวอย่างเช่น สารโกลโคลิปิด จาก *Torulopsis apicola* ไม่สามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวได้เมื่อมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูงในขณะที่น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* JF-2 สามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวได้ เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ซึ่งให้ค่าที่ดีกว่าการเติมเกลือแคลเซียม (Folmsbee et al., 2006)

หน้าที่ทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติที่สำคัญต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่ผลิตทั้งการนำสารเข้าสู่เซลล์หรือการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างจุลินทรีย์และผู้ให้อาศัย (microbe-host interaction) หรือการเป็น biocide ซึ่งหน้าที่ดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องกับ การเป็นสาร amphipathic ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การที่จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาจะทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการสลายเพิ่มขึ้น และมีการเกิดอิมัลชันเพิ่มขึ้น เพิ่มการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตบนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ง่าย โดยการลดแรงตึงผิวรอบๆบริเวณเซลล์ กระบวนการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์นั้นโดยการทำให้สารประกอบเข้าสู่เซลล์และ กระบวนการเกิดเมทาบอลิซึมได้ง่ายขึ้น

นอกจากนี้กระบวนการหรือหน้าที่ทางกายภาพอื่นๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ การมีสมบัติของการเป็นสาร antibiotic ต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรีย และเชื้อรา (Shekhar et al., 2015)

1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารที่เหมาะสมแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นพลังงานในกิจกรรมต่างๆและใช้ผลิตสารตั้งต้นในกระบวนการสลายพลังงานเพื่อนำไปผลิตสารประกอบที่เซลล์ต้องการในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สูตรอาหารส่วนใหญ่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ นอกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วยังมีสภาวะอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศ เป็นต้น

1.3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source) แหล่งคาร์บอนสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แหล่งคาร์บอนที่ใช้มีทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ชนิดที่ละลายน้ำ เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอลและเอทานอล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น *n*-alkanes และน้ำมันมะกอก แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตจึงมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอย่างมาก (Abouseoud et al., 2008)

- แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ

Das และคณะ (2009) ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ กลีเซอรอล แป้ง กลูโคสและซูโครส ที่มีผลในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล คือ *B. circulans* พบว่าการใช้ กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุดในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 1.16 กรัมต่อลิตรและ 0.94 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนเต็มยูเรีย ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

Hayder และคณะ (2014) ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ *Streptomyces* sp. SS20 ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ โซโลส แมนนิทอล กลูโคส มอลโตส ซูโครส กลีเซอรอลและแป้ง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. SS20 สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนทุกชนิดและเจริญได้ดีที่สุด 19 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Streptomyces* sp. SS20 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในทุกแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองและให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดหลังจากการวัดที่เวลา 48 ชั่วโมงเมื่อใช้ซูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

Noparat และคณะ (2014) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Ochrobactrum anthropi* 2/3 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำได้ชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลทราย กลูโคส กลีเซอรอล กากน้ำตาล และกากดีแคนเตอร์ พบว่าการใช้กากดีแคนเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *O. athropi* 2/3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุด 4.25 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

- แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ

Fagade และคณะ (2009) ศึกษาการใช้ไขมันดิบ น้ำมันปาล์ม น้ำมันดีเซลและน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus* สปีชีส์ต่างๆ ได้แก่ *B. sphaericus* BS 01, *B. subtilis* BS 03, *B. sphaericus* BS 04, *B. subtilis* BS 58, *B. pumilus* BS 66, *B. licheniformis* BS 69, *B. subtilis* BS 73 และ *B. licheniformis* BS 102 ที่แยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน โดยใช้อาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *B. sphaericus* BS 01, *B. subtilis* BS 03, *B. sphaericus* BS 04, *B. pumilus* BS 66, *B. licheniformis* BS 69, *B. subtilis* BS 73 และ *B. licheniformis* BS 102 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้ไขมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า E_{24} อยู่ที่ร้อยละ 30-55 และเชื้อ *B. subtilis* BS 58 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้ไขมันดิบหรือน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า E_{24} เท่ากับร้อยละ 50

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนเต็ม ยูเรีย ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

Saimmai และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral salt medium ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำได้แก่ น้ำมันปาล์มใช้แล้ว น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว และน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 0.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

Silva และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Pseudomonas* 4 สปีชีส์ ได้แก่ *P. cepacia*, *P. acidovorans*, *P. picketti* และ *P. fluorescens* เลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันพืชใช้แล้วและของเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตร ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *P. cepacia* CCT6659 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ร่วมกับ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม โดยสามารถลดแรงตึงผิวจากอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 58 เป็น 27.57 มิลลินิวตันต่อเมตร และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 5.2 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง

ปัจจุบันมีการตระหนักถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีเพราะสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีสามารถทำลายสิ่งแวดล้อมได้ ถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่ถูกต้อง และมีการนำสารลดแรงตึงผิวผิดประเภทมาใช้ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากแบคทีเรียเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมส่งผลให้ความต้องการใช้เพิ่มมากขึ้นและอาจสามารถเข้ามาแทนที่สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีได้ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ด้วยเหตุนี้ผลของแหล่ง

คาร์บอนจึงเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรีย ซึ่งการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ดีจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูง รวมถึงทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเศษเหลือจะทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง ซึ่งอาจจะช่วยให้สามารถแข่งขันกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีได้

1.3.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์

- แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen)

Gnanamani และคณะ (2010) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ beef extract, ยีสต์สกัดและเปปโตเน เดิมในอาหาร mineral medium ใช้น้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากน้ำทะเลตะกอนป่าชายเลน หอยและทรายบริเวณชายหาดในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลต ESW Na12s สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นจาก 72 มิลลิวตันต่อเมตร เหลือ 25 มิลลิวตันต่อเมตร

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ ยูเรีย, เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน, beef extract, ยีสต์สกัด หรือเคซีนไฮโดรไลเซท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่มีกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chooklin และคณะ (2014) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ เนื้อวัวสกัด ยีสต์สกัด ยูเรีย ผงชูรส และเปปโตเน เดิมในอาหาร mineral medium ใช้ผงแป้งจากเมล็ดขนุน ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Deinococcus caeni* PO5 พบว่าเชื้อ *D. caeni* PO5 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 72 มิลลิวตันต่อเมตร เหลือ 43 มิลลิวตันต่อเมตร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen)

Younis และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *Bacillus subtilis* KO เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NaNO_3 , NH_4Cl หรือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก พบว่าเชื้อ *B. subtilis* KO ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 7.41 กรัมต่อลิตรเมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Aparna และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus clausii* 5B ที่แยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม เลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาล

กลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ยีสต์สกัด, เปปโตน, NH_4Cl , ยูเรียหรือ NH_4NO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อ *B. clausii* 5B สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 2.41 กรัมต่อลิตร เมื่อเติม NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนและสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 53.56 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 29.48 มิลลินิวตันต่อเมตร

Saimmai และคณะ (2013) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 และ $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 ปรับพีเอชเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเติม NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุดจาก 71.08 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 44.64 มิลลินิวตันต่อเมตร และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ 1.91 กรัมต่อลิตร

1.3.3 แร่ธาตุ (mineral source) ปกติจะมีการเติมแร่ธาตุลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการสร้างหรือเป็นองค์ประกอบของสารที่จำเป็นในการดำรงชีวิต แร่ธาตุสำคัญ เช่น ซัลเฟตและฟอสเฟต จุลินทรีย์ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน แร่ธาตุนอกจากจะเป็นปัจจัยที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโตแล้วยังมีผลในการยับยั้งหรือกระตุ้นการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

Wei และคณะ (2007) ศึกษาผลของการใช้แร่ธาตุ 5 ชนิดเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ K^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} และ Ca^{2+} ต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ NH_4NO_3 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็นอาหารที่มีแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด ทำการทดสอบผลของแร่ธาตุแต่ละตัวต่อการผลิต surfactin โดยไม่เติมแร่ธาตุที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม K^+ เชื้อมีการเจริญและการผลิต surfactin จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม Mg^{2+} เชื้อจะไม่ผลิต surfactin เลย แสดงว่า Mg^{2+} และ K^+ ส่งผลต่อการผลิตอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นศึกษาปริมาณและอัตราส่วนระหว่างแร่ธาตุทั้งสองต่อการผลิต surfactin พบว่าเมื่อใช้ปริมาณและอัตราส่วนของ Mg^{2+} ต่อ K^+ 3:1 เชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 สามารถผลิต surfactin เพิ่มเป็นสองเท่า แสดงว่าปริมาณ Mg^{2+} ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อควรเป็น 3 เท่าของปริมาณ K^+ ขณะเดียวกันเมื่อดูผลของอัตราส่วนที่เท่ากันของ Mg^{2+} และ K^+ เช่นที่อัตราส่วน 1:1, 2:2, 3:3 จะให้ผลผลิตต่างกันแสดงว่าปริมาณเป็นตัวแปรสำคัญในการผลิต surfactin โดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 เช่นกัน

1.3.4 พีเอช (pH) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมและการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลกระทบจากค่าพีเอช โดยทั่วไปค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ราและยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่มีค่าเป็นกลาง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรืออัลคาไลน์อื่นๆ ออกมาทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงขึ้น (Park and

Lee, 1998; Nagal and Jain, 2010) แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (Zhao et al., 2009) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์

Najafia และคณะ (2010) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus mycoide* ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่พีเอชในช่วง 5-9 และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่พีเอช 7.37 สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดที่ 34 มิลลินิวตันต่อเมตร

El-sersy (2012) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* N10 เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่พีเอช 5-9 ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* N10 เจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 โดยให้ค่า EA สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 86 แต่เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 6 พบว่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวจะลดลงอย่างรวดเร็ว

1.3.5 อุณหภูมิ (temperature) จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน ถ้าจุลินทรีย์เจริญในอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเจริญได้เร็วและอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย เชื้อ *Bacillus subtilis* N10 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า EA มากกว่าร้อยละ 80 (El-sersy, 2012) เป็นต้น

Abushady และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต surfactin จาก *Bacillus subtilis* BBk 1 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียสตามลำดับ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิต surfactin สูงสุดเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ผลผลิต surfactin ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึง 55 องศาเซลเซียสเชื้อจะไม่มีการผลิต surfactin

Gogotov และ Miroshnikov (2009) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* VKM B-511 ที่เลี้ยงในอาหาร mineral medium ใช้ kerosene ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักและ NaNO_3 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรและให้ค่าความสามารถในการคงตัวของอิมัลชันเท่ากับร้อยละ 41

1.3.6 การกวนและการให้อากาศ (agitation and aeration) การกวนและการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอยสามารถดูดซับปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น (Desai

and Banat, 1997) ส่วนการกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ช่วยลดขนาดของฟองอากาศให้เล็กลงทำให้มีผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับจุลินทรีย์มากขึ้น

Yeh และคณะ (2006) ศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ NH_4NO_3 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ พบว่าการกวนที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่ระดับ 1.5 vvm อัตราการผลิต surfactin สูงสุดที่ระดับ 190 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Fonseca และคณะ (2007) ศึกษาผลของการกวนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ชนิดลิโปเปปไทด์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาลทราย ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ NH_4NO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เช่าด้วยความเร็วรอบต่างกันคือ 50, 150 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 และ 150 รอบต่อนาที กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 66 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 39-40 มิลลินิวตันต่อเมตร แต่เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นเป็น 250 รอบต่อนาที สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้นจาก 66 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 35 มิลลินิวตันต่อเมตร

2. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถผลิตได้จาก 2 กระบวนการผลิต คือ กระบวนการหมักโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ และกระบวนการเปลี่ยนรูปแบบทางชีวภาพ (biotransformation) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยทั่วไปมักจะมีค่าความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นกระบวนการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิว (drownstream process) จะเป็นขั้นตอนที่มีค่าใช้จ่ายมากที่สุดของกระบวนการผลิตบางครั้งอาจสูงถึงประมาณร้อยละ 60 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด

การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักจะให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ตัวอย่างเช่น การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Corynebacter lepus* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตร้อยละ 20-25 ปัจจัยที่สำคัญในการสูญเสียผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม ถ้าเก็บเกี่ยวได้ผลผลิตร้อยละ 30-50 จะสามารถลดค่าใช้จ่ายสองหรือสามเท่าของต้นทุนทั้งหมด (Kosaric, 2001) ดังนั้นการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ จึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงราคา ความคุ้มค่า และความเหมาะสมกับลักษณะงานที่ต้องนำไปใช้ต่อไป เนื่องจากจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาในความเข้มข้นที่ไม่สูงมากนัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีหลายปัจจัยซึ่งจะมีผลต่อต้นทุนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ เช่น ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากการหมัก ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำหมัก (pH, viscosity และ complexity) ลักษณะของผลิตภัณฑ์ (น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการละลาย ประจุ สารที่อยู่ภายในเซลล์ หรือ หลั่งออกมานอกเซลล์) ผลผลิตที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ และความง่ายในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ต้นทุนในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวสามารถลดลงโดยเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์

วิธีส่วนใหญ่ที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกรณีที่เป็นการเก็บเกี่ยวแบบกะ (batch recovery) เช่น ตกตะกอนด้วยกรด (acid precipitation) สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

(solvent extraction) การตกผลึก (crystallization) ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) วิธีการเก็บเกี่ยวเหล่านี้สามารถนำคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ประโยชน์ เช่น surface activity หรือ ความสามารถในการเกิดไมเซลล์ หรือ vesicles

โดยปกติการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายที่ใช้ประกอบด้วย chloroform-methanol และ dichloromethane-methanol, butanol, ethyl acetate, pentane และ hexane

Trehalose lipid ผลิตได้หลายชนิดจาก *Mycobacterium* spp. และ *Arthrobacter paraffineus* trehalose corynomycolates และ tetraesters ผลิตจาก *Rhodococcus erythropolis*, mono-, di- และ penta-saccharide lipids ของ *A. paraffineus* และ *N.corynebacterioids*, cellobiose lipids ผลิตจาก *Ustilago* spp., sophorolipid จาก ยีสต์หลายชนิด, liposan จาก *Candida lipolytica* และ rhamnolipids ของ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เก็บเกี่ยวโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Kosaric, 2001)

สำหรับการสกัดไกลโคลิปิดที่ผลิตจาก *Torulopsis bombicola* (Cooper and Paddock, 1984) *Torulopsis petrophilum* (Cooper et al., 1983) และ *Torulopsis apicola* (Hommel et al., 1987) เป็นการสกัดด้วย ethyl acetate โดยการแช่เย็น หลังจากการดูดซับบนถ่าน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* จะมีการเก็บเกี่ยวในลักษณะที่คล้ายกัน ยกเว้น การสกัดจะใช้ acetone ไกลโคลิปิดที่ผลิตโดย *Ustilago maydis* (Hewald et al., 2005) และ mannosylerythritol lipid ผลิตจาก *Candida* spp. (Bhardwaj et al., 2013) เป็นตะกอนที่มีน้ำมันมาก เมื่อปั่นเหวี่ยงแล้วจึงต้องสกัดในอีเทอร์ เอทานอล หรือเมทานอลต่อไป

ไกลโคลิปิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Ustilago zaeae* จะมีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีการตกตะกอนด้วยกรด (acid precipitation) ที่อุณหภูมิต่ำ ไกลโค-ลิปิดจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และแรมโนลิปิดจาก *P. aeruginosa* และ *Candida lipolytica* จะมีการเก็บเกี่ยวด้วยวิธี acidification โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล เมื่อไม่นานมานี้มีการสกัด cell-bound ของ bioemulsifier จาก *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใน buffer ที่ประกอบด้วย potassium metabisulfite โดยการตกตะกอนโดยใช้ เอทานอล-อะซิติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บ่มข้ามคืน (Desai and Banat, 1997)

3. คุณสมบัติและการประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้โครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา

3.1 เพิ่มพื้นที่ผิวสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำต่ำแบบที่เรียกว่า เจริญในบริเวณที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการเจริญแบบจำกัดเนื่องจากแรงตึงระหว่างผิวของน้ำและน้ำมัน (Banat et al., 2010) ซึ่งในระบบเปิด เช่น แหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนคราบน้ำมัน มีจำนวนของจุลินทรีย์ไม่เพียงพอต่อการอิมัลซิไฟด์น้ำมันให้มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ น้ำมันที่ถูกอิมัลซิไฟด์ที่กระจายอยู่ในน้ำก็ไม่เพียงพอการนำไปใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวซึ่งมีสมบัติเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันจึงมีความจำเป็นในการย่อยสลายคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของ

น้ำมันโดยการทำให้เกิดอิมัลชัน ทำให้เซลล์สัมผัสกับน้ำมันแล้วนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น (Ron and Rosenberg, 2001)

3.2 เพิ่ม bioavailability ของสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ เหตุผลหลักที่ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนย่อยสลายได้ยาก คือ มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ และถูกดูดซับอยู่ในพื้นผิว เช่น ถูกดูดซับในดิน จึงทำให้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนำสารดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ยาก (Ron and Rosenberg, 2001) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อในสารตั้งต้นที่ถูกดูดซับโดยการชะสารออกจากพื้นผิวหรือเพิ่มความสามารถการละลายน้ำของสารดังกล่าว (Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

3.3 กำจัดโลหะหนัก สาร rhamnolipid มีความสามารถในการกำจัดแคดเมียม, ตะกั่ว และสังกะสีจากดิน (Wang and Mulligan, 2009) ซึ่งกลไกในการกำจัดโลหะหนักของ rhamnolipid คือ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ rhamnolipid และแคดเมียม และการทำปฏิกิริยาของ rhamnolipid ต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้โพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์สามารถจับกับโลหะหนักและทำให้เกิดการตกตะกอนของโลหะหนัก เช่น การจับกับยูเรเนียมของ emulsan จาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Uzoigwe et al., 2015)

3.4 บทบาทของอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีต่อฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักรวมสูงหรืออิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถถ่ายทอดสู่จุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ พบว่า alasan จาก *Acinetobacter radioresistens* KA53 สามารถจับกับพื้นผิวเซลล์ของเชื้อ *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 และ *A. calcoaceticus* RAG-1 และเปลี่ยนแปลงพื้นผิวเซลล์ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งการถ่ายทอดดังกล่าวเกิดขึ้นหลังจากบ่มเซลล์ผู้รับกับอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ นอกจากนี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. radioresistens* KA53 ร่วมกับ *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่า alasan หลั่งออกมาจาก *A. radioresistens* KA53 แล้วจับกับเซลล์ผู้รับ คือเชื้อ *A. calcoaceticus* RAG-1 (Osterreicher-Ravid et al., 2000) การถ่ายทอดอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพของแบคทีเรียจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่งแสดงให้เห็นถึงการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ การรวมกลุ่ม และการเกิดฟิล์มชีวภาพ (Ron and Rosenberg, 2001)

3.5 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์ส่วนใหญ่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น โลโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวน ได้แก่ polymyxins ที่ผลิตจาก *Bacillus polymyxa* (Balaji et al., 2011), gramicidins ที่ผลิตจาก *Bacillus brevis* (Abraham et al., 2014), circulocins ที่ผลิตจาก *Bacillus circulans* J2154 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี รวมถึงแบคทีเรียที่ทนต่อสารยาปฏิชีวนะ (He et al., 2001) และ iturin A ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ที่มีความสามารถในการเป็นสารควบคุมจุลินทรีย์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และเชื้อราก่อโรคในพืชได้ (Yu et al., 2002)

Folman และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตสารต้านเชื้อราในแตงกวาจากเชื้อ *Lysobacter enzymogenes* 3.1T8 พบว่าสารดังกล่าวคือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ซึ่งทำให้เกิดโรคยอดและรากเน่าในแตงกวา จากการทดลองพบว่าสาละสลายน้จากเชื้อ *L. enzymogenes* 3.1T8 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P.*

aphanidermatum ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อทดสอบบนอาหาร R2A หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

Joshi และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* 20B ซึ่งแยกจากอาหารหมักในประเทศอินเดีย พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporium*, *Alternaria burnsii*, *Crysosporium indicum* และ *Rhizoctonia bataticola* หลังจากการเลี้ยงเชื้อ ร่วมกันบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการศึกษา โครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นชนิดลิโปเปปไทด์

Mukherjee และคณะ (2009) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ crude biosurfactant และ purified biosurfactant ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus circulans* โดยใช้วิธี agar well diffusion พบว่า crude และ purified biosurfactant ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*Micrococcus flavus*, *Bacillus pumilis*, *Mycobacterium smegmatis*) และ แกรมลบ (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas* sp.) รวมทั้งเชื้อรา (*Aspergillus niger*, *A. flavus*) และยีสต์บางสายพันธุ์ (*Candida albicans*) ด้วย แต่ purified biosurfactant สามารถยับยั้งได้ดีกว่า

Kim และคณะ (2010) ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* CMB32 ซึ่งแยกได้จากดิน พบว่าสารลดแรงตึงผิวดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคแอนแทรคโนส (anthracnose disease) ในพริก บลูเบอร์รี่ มะม่วง และธัญพืชบางชนิด จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีโดยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF) พบว่า สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ 3 ชนิด ได้แก่ iturin A, fengycin และ surfactin

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 3.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จากทะเล
- 3.2 เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
- 3.3 เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้
- 3.4 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในการบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างตะกอนดินทะเล และน้ำทะเลบริเวณท่าเรือปากเมง และท่าเรือหาดยาว จ.ตรัง ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เชื้อแบคทีเรียและทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากตะกอนดินทะเล และน้ำทะเล ทราบองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกได้ รวมทั้งทราบประสิทธิภาพในการย่อยสลายคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม



บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างตะกอนดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างตะกอนดิน น้ำทะเล บริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณท่าเรือหาดปากเมง ท่าเรือหาดยาว โดยกระจายให้ครอบคลุมทั่วทั้งบริเวณๆ ละ 5 - 10 จุด เก็บที่ความลึก 0 - 5 ซม. จากผิวดิน ก่อนเก็บตัวอย่างดินต้องกวาดเศษพืชหรือวัสดุที่อยู่ผิวดินออกเสียก่อน นำดินทุกจุดใส่รวมกันในถุงพลาสติกหรือภาชนะที่เตรียมไว้ เก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างดินมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในห้องปฏิบัติการ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient agar (NA) และ Nutrient broth (NB) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): เนื้อวัวสกัด 3; เปปโตน 5; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ Nutrient agar เติมน้ำ agar 15 กรัม)

- Mineral salt medium (MSM) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): K_2HPO_4 0.8; KH_2PO_4 0.2; $CaCl_2$ 0.05; $MgCl_2$ 0.5; $FeCl_2$ 0.01; $(NH_4)_2SO_4$ 1.0; NaCl 5.0; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH เท่ากับ 7.0 (Noparat et al., 2014)

วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยมีชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ (Joshi et al., 2008)

2. การวัดค่าพีเอช

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตรวจวัดค่า พีเอชของสารละลายส่วนใสโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

3. การวัดค่าแรงตึงผิวโดยเครื่อง Ring tensiometer

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในกระจกนาฬิกา วางบนแท่นวาง จุ่มลวดทองคำขาวลงไปในสารละลายแล้วค่อยๆ ดึงลวดขึ้น จนถึงรอยต่อระหว่างของเหลวและอากาศ (liquid-air layer interface) ค่าแรงตึงผิวที่ทำให้ขดลวดแยกออกจากของเหลวเป็นค่าแรงตึงผิวของของเหลวที่วัดได้มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (Bodour and Maier, 1998)

4. การทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชันด้วยวิธี Emulsification activity

เติมน้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 2 นาที แล้วทิ้งไว้ 10 นาที คำนวณหาค่า emulsification activity (EA) (Cooper and Goldenberg, 1987)

$$EA = \frac{\text{ความสูงของ emulsion ที่เกิดขึ้น} \times 100}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}}$$

วิธีการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก ตัวอย่างดิน

ใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงใน NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 วินาที ปิเปตสารละลายส่วนใส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread plate บนอาหาร NA ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) 4-5 วัน สุ่มเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าวมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวๆ นำเชื้อแบคทีเรียที่เลือกได้เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อที่ได้ในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตรร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น และปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่า OD₆₆₀ เท่ากับ 0.5

3. การทำ primary screening

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 2 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันโดยแบ่งเป็น

- เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ นำไปสกัดน้ำมันออกด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

- เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ ทดสอบ drop-collapsing test ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น เลือกเชื้อที่พบกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 - 5 มิลลิเมตร เพื่อคัดเลือกในขั้นตอนต่อไป

4. การทำ secondary screening

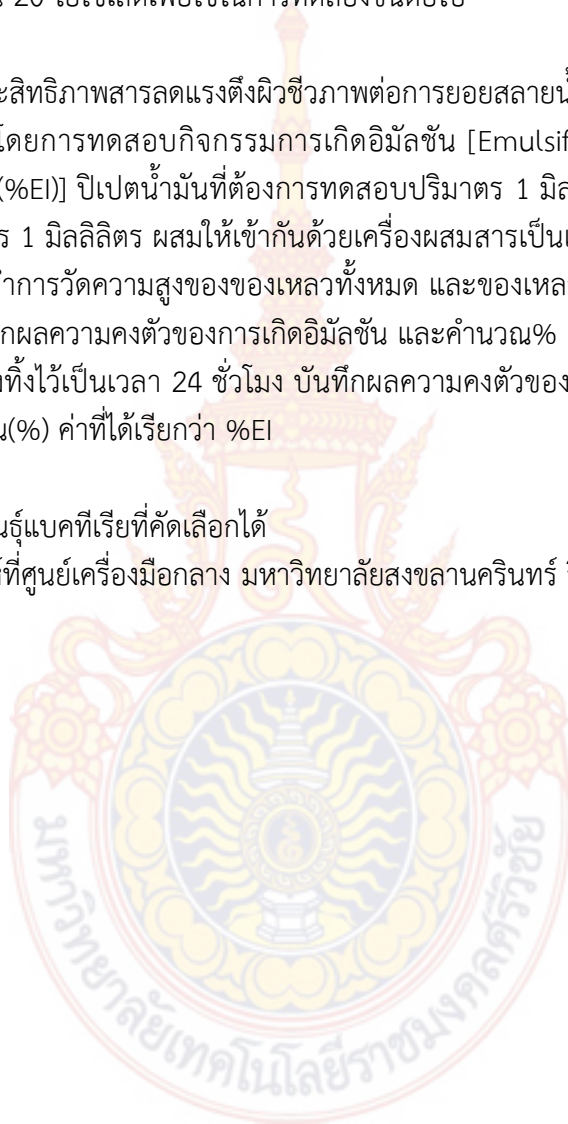
ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้างต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่า EA ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้นเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่ดีที่สุดจำนวน 20 ไอโซเลตเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5. ศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการย่อยสลายน้ำมันปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

การทดสอบโดยการทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน [Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI)] ปิเปตน้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวัดความสูงของของเหลวทั้งหมด และของเหลวที่เกิดอิมัลชันด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ทำการบันทึกผลความคงตัวของอิมัลชัน และคำนวณ% กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน ค่าที่ได้เรียกว่า %EA และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลความคงตัวของอิมัลชัน และคำนวณกิจกรรมการเกิด อิมัลชัน(%) ค่าที่ได้เรียกว่า %EI

6. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่



บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตะกอนดินทะเลและน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน บริเวณท่าเรือปากเมง ท่าเรือเกาะลิบง และท่าเรือหาดยาว จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM) ซึ่งมี น้ำมันกาด 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาสามารถแยกเชื้อ แบคทีเรียได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อทั้ง 31 ไอโซเลท มาทดสอบการติดสีแกรมพบว่า ทั้ง 31 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 25 ไอโซเลท เป็นแกรมบวก 6 ไอโซเลท ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะแกรมของไอโซเลทต่างๆ

สถานที่	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ผลการติดสีแกรมและลักษณะรูปร่าง
ท่าเรือปากเมง	PM01	โคโลนีสีขาวครีม เป็นฝ้าบางๆ	แกรมลบ รูปกลม
	PM02	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปแท่ง
	PM03	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมบวก รูปแท่ง
	PM04	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นมันเยิ้ม	แกรมลบ รูปแท่ง
	PM05	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปแท่ง
	PM06	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมลบ รูปแท่ง
	PM07	โคโลนีสีขาวครีม เป็นฝ้าบางๆ	แกรมลบ รูปแท่ง
	PM08	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นมันเยิ้ม	แกรมบวก รูปแท่ง
	PM09	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมลบ รูปกลม
	PM10	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปกลม
ท่าเรือหาดยาว	HY01	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมลบ รูปกลม
	HY02	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปแท่ง
	HY03	โคโลนีสีขาวครีม เป็นฝ้าบางๆ	แกรมลบ รูปกลม
	HY04	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นมันเยิ้ม	แกรมลบ รูปกลม
	HY05	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นมันเยิ้ม	แกรมลบ รูปกลม
	HY06	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมลบ รูปกลม
	HY07	โคโลนีสีขาวครีม เป็นฝ้าบางๆ	แกรมบวก รูปแท่ง
	HY08	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปแท่ง
	HY09	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นมันเยิ้ม	แกรมลบ รูปแท่ง
	HY10	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมลบ รูปแท่ง
	HY11	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นมันเยิ้ม	แกรมลบ รูปแท่ง

	HY12	โคโลนีสีขาวครีม เป็นฝ้าบางๆ	แกรมลบ รูปแท่ง
ท่าเรือเกาะลิบง	LB01	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปแท่ง
	LB02	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมลบ รูปแท่ง
	LB03	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นมันเยิ้ม	แกรมลบ รูปกลม
	LB04	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปกลม
	LB05	โคโลนีสีขาวครีม เป็นฝ้าบางๆ	แกรมบวก รูปแท่ง
	LB06	โคโลนีสีขาวขุ่น เป็นมันเยิ้ม	แกรมลบ รูปกลม
	LB07	โคโลนีสีส้มนูน เป็นจุดเล็กๆ	แกรมลบ รูปกลม
	LB08	โคโลนีสีขาวครีม เป็นฝ้าบางๆ	แกรมลบ รูปแท่ง
	LB09	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปแท่ง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างตะกอนดินทะเล น้ำทะเลจากท่าเรือปากเมง ท่าเรือเกาะลิบง และท่าเรือหาดยาว โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 31 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาแยกเชื้อโดยเจือจางใน NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จากนั้นปิเปตส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมา spread plate บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 3^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 3 - 5 วัน สุ่มเลือกโคโลนีมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว เลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันและสุ่มเลือกเชื้อให้มากที่สุดเพื่อเป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่าง

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทำ primary screening โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง ที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนคือน้ำมันปาล์ม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง ตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี oil displacement place test

เมื่อวัดกิจกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมทั้งหมดจำนวน 31 ไอโซเลต โดยมีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำนวน 10 ไอโซเลต

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นทั้ง 10 ไอโซเลตมาทำ secondary screening โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันปาล์มปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดค่าแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ PM05 PM06 PM08 HY02 HY03 HY05 HY08 LB03 LB05 LB09 (ตารางที่ 2) จากการย้อมแกรมพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้พบว่าเป็นส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียแกรมลบสอดคล้องกับรายงานของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านเช่น Bicca และคณะ (1999), Bodour และคณะ (2003), Batista และคณะ (2006), Saimmai และคณะ (2012) และ Saisa-ard และคณะ (2013; 2014) ที่พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์จากน้ำมันโดยส่วนใหญ่เป็น

แบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนสารอาหารได้ดีกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยเชื้อที่เจริญได้ดีที่สุดได้แก่ เชื้อไอโซเลท PM08 ที่แยกได้จากบริเวณท่าเรือปากเมง และเชื้อไอโซเลท HY05 ที่แยกได้จากท่าเรือหาดยาว โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD660) เท่ากับ 2.85 และ 2.92 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้สูงสุด คือเชื้อไอโซเลท PM08 ที่แยกได้จากตะกอนดินทะเลท่าเรือปากเมง และ HY05 ที่แยกได้จากตะกอนดินทะเลบริเวณท่าเรือหาดยาว โดยมีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 15.52 และ 22.39 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ

ตารางที่ 2 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยง (surface tension reduction: SR) และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA)

สถานที่	ไอโซเลท	ค่า OD	EA (%)	SR (mN/m)
ท่าเรือปากเมง	PM05	2.95±0.15	45.21±7.25	17.23±1.28
	PM06	3.17±0.12	52.39±8.29	19.56±1.53
	PM08	2.85±0.10	59.23±5.26	15.52±1.18
ท่าเรือหาดยาว	HY02	3.14±0.17	55.26±8.14	20.36±1.45
	HY03	2.85±0.15	50.56±9.75	25.63±1.43
	HY05	2.92±0.18	51.09±9.23	22.39±1.25
	HY08	2.95±0.14	55.36±9.42	27.58±1.26
ท่าเรือเกาะลิบง	LB03	3.14±0.18	57.23±9.52	25.69±1.56
	LB05	3.02±0.12	52.26±9.63	27.39±1.43
	LB09	2.95±0.16	55.08±9.48	25.16±1.36

*OD600 and results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

* Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

2. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลท PM08

นำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PM 08 มาศึกษาเพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol/chloroform DNA extraction (Ausubel et al., 1995) เพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primers ในช่วง 8f และ 1492r แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (QIAGEN, Inc.) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ผลของการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PM 08 กับเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank

ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PM08 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* ถึง 100% จึงสรุปว่าเชื้อ แบคทีเรียไอโซเลท PM08 คือเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* (Antunes et al., 2014) พบได้ทั่วไปในบริเวณดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Baruah et al., 2017; Dahal et al., 2017; Hamzah et al., 2017) มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งสามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันดิบทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโต (Sazykin et al., 2016) อีกทั้งยังมีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพหลายชนิดจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* อีกด้วย (Zhao and Wong, 2009; Pirog et al., 2013; Pirog et al., 2014; Hoakova et al., 2015)

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08

3.1 แหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 ในอาหาร minimal salt medium (MSM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทราย กากน้ำตาล และน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (WPO) แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก โดยมี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) จากการทดลองพบว่า เชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 สามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันปาล์ม, และ น้ำมันปาล์มใช้แล้ว โดยสามารถเจริญได้สูงสุด 3.12 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากที่สุดที่ 25.64 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าแรงตึงผิวเริ่มต้นเท่ากับ 72 มิลลินิว

ต้นต่อเมตร จากการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของสารละลายส่วนใสเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็น 48 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 26.68 (ตารางที่ 3) จึงเลือกใช้น้ำมันใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 ในขั้นตอนนี้ต่อไป

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

C-source (1%)	Dry cell weight (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)
No carbon source	0.07±0.03	3.00±0.63	0
Soybean oil	2.50±0.05	21.56±0.45	15.56±0.15
Palm oil	2.86±0.07	22.33±0.75	19.84±0.26
Used palm oil	3.12±0.06	25.64±0.82	26.68±0.27

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

3.2 แหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก โดยมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตน และยีสต์สกัด แหล่งไนโตรเจน อนินทรีย์ ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) พบว่าเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 เจริญเติบโตได้สูงสุด 3.72 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่ค่าการลดแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุดเท่ากับ มี 45.26 มิลลินิวตันต่อเมตร และร้อยละ 52.35 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) โดยมีค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 72 มิลลินิวตันต่อเมตร จึงเลือกใช้ Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08

Nitrogen source (1%, w/v)	Dry cell weight (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)
No N-source	0.05±0.01	1.65±0.14	0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.95±0.02	20.63±0.15	48.35±0.25
Peptone	3.72±0.03	45.26±0.10	52.35±0.17
Yeast extract	3.24±0.02	41.25±0.17	48.14±0.38

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

4. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันที่ใช้แล้วและประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดย *Bacillus oceanisediminis* PM08 ในอาหาร BSM ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.1% และมีชุดควบคุมคืออาหาร BSM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% แต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย *Bacillus oceanisediminis* PM08 พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus oceanisediminis* PM08 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยการหาน้ำหนักที่หายไปของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Weight loss) ในอาหาร BSM ที่ใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.1% เท่ากับ 61.30% ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม *Bacillus oceanisediminis* PM08 มีค่า weight loss เท่ากับ 9.25% ที่ผลการทดลองในชุดควบคุมเป็นเช่นนี้ น่าจะมีสาเหตุมาจากการระเหย หรือการเกิดปฏิกิริยา photochemical oxidation ที่ส่งผลให้น้ำหนักของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหายไป ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1% และมีชุดควบคุม คือ อาหาร BSM ที่ไม่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว แต่มีการเติมแบคทีเรีย *Bacillus oceanisediminis* PM08 พบว่า *Bacillus oceanisediminis* PM08 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ที่ใช้แล้ว โดยการหาน้ำหนักที่หายไปของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Weight loss) กับวัดการเจริญเติบโตของยีสต์ควบคู่กัน แสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งจากผลการศึกษานี้ก็กล่าวได้ว่า *Bacillus oceanisediminis* PM08 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.5% ได้ดีที่สุดและ *Bacillus oceanisediminis* PM08 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดด้วย ในขณะที่ชุดควบคุมทุกความเข้มข้นแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตน้อยมาก รวมถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วก็ต่ำเช่นกัน ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Mandri และ Lin ที่แยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell-Haas ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 10% พบว่าสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย สูงสุด 3 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticum*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Flavobacterium* sp. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 28 วันได้ 84, 71 และ 60% ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus oceanisediminis* PM08 โดยวัดค่า %EA และ %EI ผลการทดลอง แสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งทำการแปรผันความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร BSM ที่ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5% ผลการทดลองพบว่า *Bacillus oceanisediminis* PM08 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุดเท่ากับ 61.85 %เมื่อเลี้ยง *Bacillus oceanisediminis* PM08 ในอาหารที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 5 กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (%EA) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดน้ำมัน	%EA				
	ความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
น้ำมันถั่วเหลือง	58.72±0.11	45.36±0.01	56.30±0.48	55.26±0.41	57.86±0.28
น้ำมันปาล์ม	59.25±0.12	60.35±0.45	58.32±0.23	55.36±0.26	50.56±0.16
น้ำมันรำข้าว	61.85±0.01	58.25±0.42	50.36±0.42	55.39±0.52	55.95±0.42
ชุดควบคุม	0	0	0	0	0

หมายเหตุ ชุดควบคุม หมายถึง อาหาร BSM ที่มี *Bacillus oceanisediminis* PM08 แต่ไม่มีแหล่งคาร์บอน
%EA หมายถึง ร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 6 กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (%EI) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ

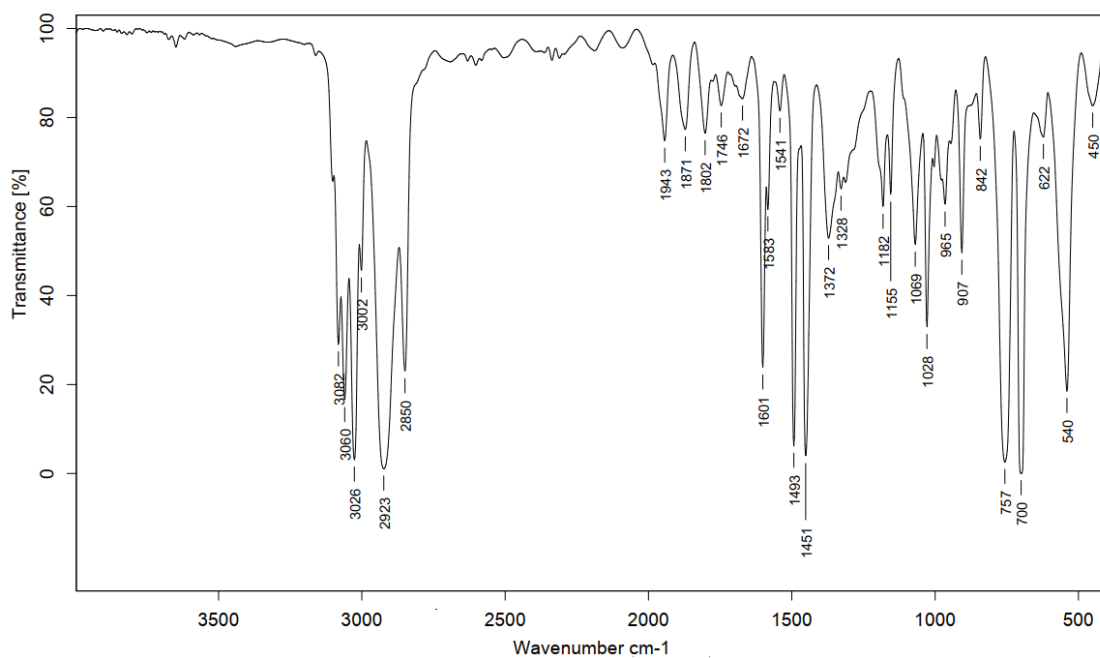
ชนิดน้ำมัน	%EA				
	ความเข้มข้นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
น้ำมันถั่วเหลือง	39.25±0.18	38.59±0.45	38.60±0.42	35.42±0.23	32.05±0.24
น้ำมันปาล์ม	48.69±0.16	47.25±0.39	47.02±0.49	45.95±0.28	45.96±0.12
น้ำมันรำข้าว	45.03±0.11	40.12±0.82	45.26±0.52	40.94±0.56	43.52±0.58
ชุดควบคุม	0	0	0	0	0

หมายเหตุ ชุดควบคุม หมายถึง อาหาร BSM ที่มีเชื้อ *I. orientalis* PO 1.2 แต่ไม่มีแหล่งคาร์บอน
%EI หมายถึง ร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

5.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

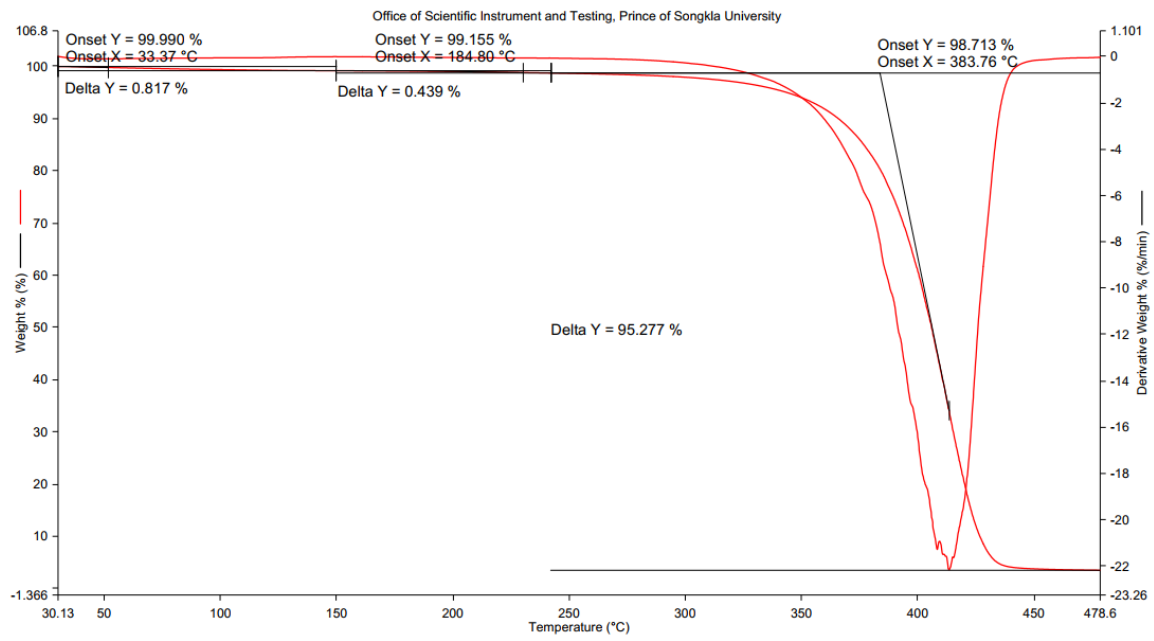
เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วย FT-IR ซึ่งใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่าง ผลจาก FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้พบสัญญาณการยืดตัว (stretching) ของ N-H ที่ 3421-3308 cm^{-1} แสดงถึงการมีเปปไทด์ในโมเลกุล สัญญาณการยืดตัวของ CO-N ที่ 1550 cm^{-1} มาจากหมู่เอมีนของกรดอะมิโน สัญญาณที่ 1652 มาจาก N ที่ต่ออยู่กับ C=O สัญญาณที่ 2928, 2958 และ 1467-1159 cm^{-1} มาจากการยืดตัวของ C-H รูปแบบโดยรวมของ FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีรูปแบบคล้ายกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* USTBa (Chandankere et al., 2014) และ *Bacillus simplex* (Mani et al., 2016)



ภาพที่ 1 Fourier transform infrared spectroscopy spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08

5.2 Thermal analysis techniques

เทคนิคการใช้ความร้อนในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สำคัญในการระบุโครงสร้างทางเคมีที่ต้องการศึกษาที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและมีราคาถูก (Fernandez et al., 2012) และเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Chandankere et al. 2014) จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 โดยใช้ thermogravimetry (TG) และ differential scanning calorimetry (DSC) ผลดังแสดงในภาพที่ 14 และ 15 ตามลำดับ จากไดอะแกรมของ TG แสดงให้เห็นการย่อยสลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 30-150 องศาเซลเซียส มีปริมาณการสลายตัว (degradation) ประมาณร้อยละ 4 เมื่อเพิ่มระดับอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 255 องศาเซลเซียส และประมาณร้อยละ 32 เมื่อเพิ่มระดับอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 314 องศาเซลเซียส จากนั้นพบว่าการสลายตัวเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ที่ระดับอุณหภูมิ 468 องศาเซลเซียส ลักษณะการสลายตัวดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Chandankere และคณะ (2014) ที่ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จากเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* USTBa โดยใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว จากไดอะแกรม DSC พบว่ามีสัญญาณที่ชัดเจนอยู่บริเวณอุณหภูมิ 268-284 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการรายงานของ Chandankere และคณะ (2014) ที่ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จาก *Bacillus methylotrophicus* USTBa ซึ่งรายงานสัญญาณไดอะแกรม DSC บริเวณ 258-262 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2 ไดอะแกรม Thermogravimetric ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ PM08



บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตะกอนดินทะเลและน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบไขมัน บริเวณท่าเรือปากเมง ท่าเรือเกาะลิบง และท่าเรือหาดยาว จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM) ซึ่งมี น้ำมันก๊าด 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาสามารถแยกเชื้อ แบคทีเรียได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อทั้ง 31 ไอโซเลต มาทดสอบการติดสีแกรมพบว่า ทั้ง 31 ไอโซเลต เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 25 ไอโซเลต เป็นแกรมบวก 6 ไอโซเลต เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเทียบเคียงลำดับของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมบริเวณ 16S rRNA พบว่าเชื้อไอโซเลต PM 08 เป็นมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* ถึง 100% องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 คือ อาหาร MSM ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ร้อยละ 4.0 และ 1.0 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง มีการลดแรงตึงผิวจากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดย *Bacillus oceanisediminis* PM08 ในอาหาร BSM ที่มีการใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่า *Bacillus oceanisediminis* PM08 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 0.5% ได้ดีที่สุด คือ 63.60% นอกจากนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 โดยวัดค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity) ผลการทดลองพบว่า *Bacillus oceanisediminis* PM08 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันรำข้าวได้ดี ที่สุดเท่ากับ 71.67% เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 ในอาหารที่มีการใส่น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน การย่อยสลายน้ำมันเกิดจาก การเมทาบอลิท์ (metabolite) สามารถเมทาบอลิท์ทั้งคาร์บอนที่เป็นโครงสร้างแบบเส้นตรง (aliphatic) และที่เป็น วงแหวน (aromatic) จากนั้นไฮโดรคาร์บอน จะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานเข้าสู่เซลล์ ซึ่งกลไกการใช้ไฮโดรคาร์บอน โดยการดูดซึมอัลเคน เข้าสู่เซลล์นั้น มีความสัมพันธ์กันกับความสามารถของจุลินทรีย์ในการปล่อยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) โดยแบคทีเรียมีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวบางชนิดที่เป็นที่น่าสนใจ เช่น โซฟอโรลิพิด (sophorolipid), ลิโปซาน (Liposan), ลิโปมานัน (Lipomanan) โดยปกติสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ส่วนใหญ่ ผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมีอย่างไรก็ตาม สารลดแรงตึงผิวอาจได้จากกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) นอกจากนี้ในปัจจุบันมลภาวะ จากน้ำมันในทะเลพบทั่วไป แบคทีเรียสามารถเมทาบอลิซ์ ไฮโดรคาร์บอนนั้น หลังจากที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันลงไปทะเล ยีสต์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากเดิมที่มี ประมาณ 30-200 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเป็น 10^4 เซลล์ต่อ มิลลิลิตรซึ่งยีสต์ที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและปล่อยสารลดแรงตึงผิว คือ *Yarrowia lipolytica* *Candida guilliermondii* *Candida tropicalis* *Candida maltose* *Debaryomyces hansenii* และ *Rhodospiridium* จากผลการศึกษาทดลองครั้งนี้ ได้แยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย สลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว อีกทั้งยัง สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้อีกด้วย

ฉะนั้นสามารถนำ *Bacillus oceanisediminis* PM08 นี้ไปใช้ ในการกำจัดหรือบำบัดน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ ใช้แล้ว ซึ่งถือเป็นการแก้ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อม ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ สกัดได้ด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และ Mass Spectroscopy (MS) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบโดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,088 m/z

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 ในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
2. ศึกษาการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus oceanisediminis* PM08 ไปประยุกต์ใช้ ในการย่อยสลายคราบน้ำมันปนเปื้อนในระดับที่ใหญ่ขึ้น



เอกสารอ้างอิง

- จิตราพรรณ พิสิท (2542) การผสมพันธุ์กล้วยไม้กระถางดอกหอมเพื่อการส่งออก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ทัศนาวพร ทศคร (2543) การควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้โดยชีววิธีด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์จากผิวพืช. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิยมรัฐ ไตรศรี. (2541) โรคที่เกิดจากเชื้อราของปทุมมาในส่วนของใบ ต้น ดอก และราก. เอกสารประกอบคำบรรยายการฝึกอบรม หลักสูตรเทคโนโลยีการผลิตหัวพันธุ์ปทุมมาเพื่อการส่งออก. วันที่ 13-14 พฤษภาคม 2541 ณ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 จังหวัด เชียงใหม่. 2 หน้า.
- ปราณี เริ่มกระโทก วรัญญู แก้วดวงตา พนิดา อริมัตสี และ วราภรณ์ สุทธิสา (2557) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล. แกนเกษตร 42 ฉบับพิเศษ 1:578-582.
- ฝ่ายกักกันพืช (2543) ข้อมูลการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร.
- พิบูลย์ มงคลสุข (2517) โรคเน่าดำของกล้วยไม้ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Phytophthora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัชนีบุญเรือง (2552) การยับยั้งราก่อโรคใบร่วงบนต้นยางพาราด้วยสารสกัดจากพืช. สารนิพนธ์การศึกษา มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2548) กล้วยไม้. ข้อมูลงานค้นคว้าวิจัย สถาบันวิจัยพืชสวน. แหล่งที่มา: <http://www.doa.go.th/data-agri/ORCHID/1stat/st01.html>, 10 พฤษภาคม 2548.
- Abbasi H., Hamed M.M., Lotfabad T.B., Zahiri H.S., Sharafi H., Masoomi F., Moosavi-Movahedi A.A., Ortiz A., Amanlou M., Noghabi K.A. (2012). Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. J. Biosci. Bioeng. 113(2):211-219.
- Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination. 223:143-151.
- Abraham T., Prenner E.J., Lewis R.N., Mant C.T., Keller S., Hodges R.S., McElhaney R.N. (2014). Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1838:1420-1429.
- Abushady H.M., Bashandy A.S., Aziz N.H., Ibrahim H.M.M. (2005). Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. Int. J. Agri. Biol. 7:337-344.

- Antunes L.C., Visca P., Towner K.J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* 71:292-301.
- AOAC International. (2000). Official methods of analysis of AOAC International. 17th edition. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.
- Aparna A., Srinikethan G., Smitha H. (2012). Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. *2B. Colloid. Surface. B.* 95:23-29.
- APHA, AWWA, WPCF. (1999). Standard methods for the examination of water and waste. (16th ed.) APHA, Washington, DC
- Asano T., Senda M., Suga H., Kageyama K. (2010). Development of multiplex PCR to detect five *Pythium* species related to turfgrass diseases. *J. Phytopathol.* 158: 609-615.
- Ausubel F.M., Brent R.E., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1995). Short protocols in molecular biology (3rd ed.) John Wiley and Sons, Inc., New York. USA.
- Balaji V., Jeremiah S.S., Baliga P.R. (2011). Polymyxins: antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. *Indian. J. Med. Microbiol.* 29:230-242.
- Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 87:427-444.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (2000). Yeast: Characterization and identification (3rd ed) London, UK: Cambridge.
- Baruah R., Mishra S.K., Kalita D.J., Silla Y., Chauhan P.S., Singh A.K., Deka Boruah H.P. (2017). Assessment of bacterial diversity associated with crude oil-contaminated soil samples from Assam. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* doi:10.1007/s13762-017-1294-2.
- Batista S.B., Mounter A.H., Amorim F.R., Totola M.R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Biores. Technol.* 97:868-875.
- Bhardwaj G., Cameotra S.S., Chopra H.K. (2013). Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. *AMB. Express.* 21:68.
- Bicca F.C., Fleck L.C., Ayub M.A.Z. (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev. Microbiol.* 30:231-236.
- Bodour A.A., Drees K.P., Raina M.M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3280-3287.

- Bodour A.A., Maier R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* 32:273-280.
- Cahill D.M., Rookes J.E., Wilson B.A., Gibson L., McDougall K.L. (2008). *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. *Australian. J. Botany.* 56:279-310.
- Chandankere R., Yao J., Cai M., Masakorala K., Jain A.K., Choi M.M.F. (2014). Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel.* 122:140-148.
- Chooklin C.C., Petmeaun S., Maneerat S., Saimmai A. (2014). Isolation and characterization of a biosurfactant from *Deinococcus caeni* PO5 by using jackfruit seed powder as a substrate. *Ann. Microbiol.* 64:1007-1020
- Cooper D.G., Goldenberg B.G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:224-229.
- Cooper D.G., Paddock D.A. (1983). *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1426-1429.
- Cooper D.G., Paddock D.A. (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ.* 47:173-176.
- Dahal R.H., Chaudhary D.K., Kim J. (2017). *Acinetobacter halotolerans* sp. nov., a novel halotolerant, alkalitolerant, and hydrocarbon degrading bacterium, isolated from soil. *Arch. Microbiol.* 199:701-710.
- Das P., Mukherjee S., Sen R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Biores. Technol.* 100:1015-1019.
- Desai J.D., Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:47-64.
- El-sersy N.A. (2012). Plackett-Burman design to optimize biosurfactant production by marine *Bacillus subtilis* N10. *Rom. Biotechnol. Lett.* 17:7049-7064.
- Ersek T., Ribeiro O.K. (1996). Mini review article: an annotated list of new *Phytophthora* species described post. *Acta. Phytopathol. Entomol. Hungar.* 45:251-266.
- Fagade O.E., Okolie B.I. Balogun S. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources on biosurfactant producing *Bacillus* species isolates. *Nig. J. Microbiol.* 23:1915-1921.
- Fernandez J.M., Plaza C., Polo A., Plante A.F. (2012). Use of thermal analysis techniques (TG-DSC) for the characterization of diverse organic municipal waste streams to predict biological stability prior to land application. *Waste. Manag.* 32(1):158-64.
- Folman L.B., Postma J., van Veen J.A. (2003). Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. *Microbiol. Res.* 158:107-15.

- Folmsbee M., Duncan K., Han S.O., Nagle D., Jennings E., McInerney M. (2006). Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojavensis* strain JF-2. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:645-649.
- Fonseca R.R., Silva A.J.R., de Franca F.P., Cardoso V.L., Servulo E.F.C. (2007). Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 471:136-140.
- Gadd C.H. (1924). *Phytophthora faberi* Maubl. *Ann. Roy. Bot. Peradeniga.* 9:47-90.
- Ghribi D., Ellouze-Chaabouni S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnol Res Int* doi:10.4061/2011/653654.
- Gnanamani A., Kavitha V., Radhakrishnan N., Mandal A.B. (2010). Bioremediation of crude oil contamination using microbial surface-active agents: isolation, production and characterization. *J. Bioremed. Biodegrad.* 1:107-115.
- Gogotov I.N., Miroshnikov A.I. (2009). The influence of growth medium composition and physicochemical factors on biosurfactant production by the bacterium *Bacillus licheniformis* VKM B-511. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45:588-592.
- Hamzah M., Manikan V., Abd Aziz N.A.F. (2017). Biodegradation of tapis crude oil using consortium of bacteria and fungi: optimization of crude oil concentration and duration of incubation by response surface methodology. *Sains. Malaysiana.* 46:43-50.
- Hayder N.H., Alaa S., Abdulmalik H. (2014). Optimized conditions for bioemulsifier production by local *Streptomyces* sp. SS 20 isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Rom. Biotechnol. Lett.* 19:8979-8993.
- He H., Shen B., Korshalla J., Carter G.T. (2001). Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus curculans* J2154. *Tetrahedron.* 57:1189-1195.
- Hewald S., Josephs K., Bolker M. (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3033-3040.
- Hoakova M., Jezdik R., Schreiberova O., Chudoba J., Sir M., Cejkova A., Masak J., Jirku V., Rezanka T. (2015). Structural and physicochemical characterization of rhamnolipids produced by *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* in single strain and mixed cultures. *J. Biotechnol.* 193:45-51.
- Hommel R.K., Stower O., Staber W., Haferburg D., Kleber H.P. (1987). Production of water soluble surface active exolipids by *Torulopsis agricola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:199-205.
- Jeffers S.N., Martin S.B. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pyrhium* species. *Plant. Disease.* 70:1038-1043.

- Joshi S., Bharucha C., Desai A.J. (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Biores. Technol.* 99:4603-4608.
- Judelson H.S., Blanco F.A. (2005). The spores of Phytophthora: weapons of the plant destroyer. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:47-58.
- Katamai W. (2009). Screening of biosurfactant-producing yeast, purification, characterization and application. Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Thailand.
- Kim P.I., Ryu J., Kim Y.H., Chi Y.T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:138-145.
- Kosaric N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food. Technol. Biotechnol.* 39:295-304.
- Lang S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* 7:12-20.
- Liu G., Zhong H., Yang X., Liu Y., Shao B., Liu Z. (2017). Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: a review. *Biotechnol. Bioeng.* 15(4):796-814.
- Liu X.Y., Yang S.Z., Mu B.Z. (2009). Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Process Biochem.* 44:1144-1151.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lukacs A., Korting H.C., Lemke O., Ruckdeschel G., Ehret W. (1995). Braun-Falco O. The influence of the pH-value on the growth of *Brevibacterium epidermidis* in continuous culture. *Acta. Derm. Venereol.* 75:280-2.
- Maneerat S., Bamba T., Harada K., Kobayashi A., Yamada H., Kawai F. (2006). A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *App. Micro. Biotechnol.* 70(2): 254-259.
- Maneerat S., Phetrong K. (2007). Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29(3):781-791.
- Mani P., Sivakumar P., Balan S.S. (2016). Economic production and oil recovery efficiency of a lipopeptide biosurfactant from a novel marine bacterium *Bacillus simplex*. *Achieve. Life. Sci.* 10:102-110.
- McInerney M.J., Javaheri M., Nagle Jr. D.N. (1990). Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *J. Ind. Microbiol.* 5:95-102.

- Mercade M.E., Monleon L., de Andres C., Rodon I., Martinez E., Espuny M.J., Manresa, A. (1996). Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *J. Appl. Bacteriol.* 81:161-166.
- Mnif I., Grau-Campistany A., Coronel-León J., Hammami I., Triki M.A., Manresa A., Ghribi D. (2016). Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23(7):6690-9.
- Mukherjee A.K., Das K. (2010). Microbial surfactants and their potential applications: an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672:54-64.
- Mukherjee S., Das P., Sivapathasekaran C., Sen R. (2009). Antimicrobial biosurfactant from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:281-288.
- Nagal S., Jain P.C. (2010). Production of feather hydrolysate by *Elizabethkingia meningoseptica* KB042 MTCC 8360 in submerged fermentation. *Indian. J. Microbiol.* 50:S41-S45.
- Najafia A.R., Rahimpoura M.R., Jahanmiria A.H., Roostaazadb R., Arabianb D., Ghobadib Z. (2010). Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *J. Chem. Eng.* 163:188-194.
- Noparat P., Maneerat S., Saimmai A. (2014). Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 30:865-877.
- Osterreicher-Ravid D., Ron E.Z., Rosenberg E. (2000). Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. *Environ. Microbiol.* 2:366-372.
- Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12:633-654.
- Park C.B., Lee S.B. (1998). Ammonia production from yeast extract and its effect on growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 3:115-118.
- Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. (2013). Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food. Bioprod. Process.* 91:149-157.
- Pirog T.P., Konon A.D., Beregovaya K.A., Shulyakova M.A. (2014). Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus*

- erythropolis* IMB Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. Mikrobiologija. 83:631-9.
- Providenti M.A., Flemming C.A., Lee H., Trevors J.T. (1995). Effect of addition of rhamnolipid biosurfactant or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. FEMS. Microbiol. Ecol. 17:15-26.
- Rahman K.S.M., Rahman T.J., Kourkoutoas Y., Petsas I., Marchant R., Banat I.M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipids and micronutrients. Biores. Technol. 90:159-168.
- Rasooli I., Abyaneh M.R. (2004). Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food. Cont. 15:479-483.
- Ristaino J.B., Gumpertz M.L. (2000). New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. Ann. Rev. Phytopathol. 38:541-576.
- Ron E.Z., Rosenberg E. (2001). Natural roles of biosurfactants. Environ. Microbiol. 3:229-236.
- Saimmai A., Rukadee O., Onlamool T., Sobhon V., Maneerat S. (2012). Characterization and phylogenetic analysis of microbial surface active compounds-producing bacteria. Appl. Biochem. Biotechnol. 168:1003-1018.
- Saimmai A., Sobhon V., Maneerat S. (2011). Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. Appl. Biochem. Biotechnol. 165:315-335.
- Saimmai A., Udomsilp S., Maneerat S. (2013). Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium of *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 grown on low-cost raw materials. Ann. Microbiol. 63:1327-1339.
- Saisard K., Maneerat S., Saimmai A. (2013) Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. Biotechnol. 94:275-284.
- Saisard K., Saimmai A., Maneerat S. (2014). Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 36:163-175.
- Sazykin I., Sazykina M., Khmelevtsova L., Khammami M., Karchava S., Zhuravleva M., Kudееvskaya E. (2016). Expression of SOD and production of reactive oxygen species in *Acinetobacter calcoaceticus* caused by hydrocarbon oxidation. Ann. Microbiol. 66:1039-1045.

- Schulz D., Pasheri A., Schmidt M., Lang S., Wagner F., Wray V., Gunkel W. (1991). Marine biosurfactants, I. screening for biosurfactant among crude oil degrading marine microorganisms from the north sea. *Z. Naturforsch.* 46:197-203.
- Shekhar S., Sundaramanickam A., Balasubramanian T. (2015). Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45:DOI:10.1080/10643389.2014.955631.
- Silva N.M.P., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. (2014). Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3:132-139.
- Singer M.E., Tyler S.M., Finnerty W.R. (1985). Growth of *Acinetobacter* sp. strain HO1-N on *n*-hexadecanol:physiological and ultrastructural characteristics. *J. Bacteriol.* 162:162-169.
- Singh P., Jain R., Srivastava N., Borthakur A., Pal D.B., Singh R., Madhav S., Srivastava P., Tiwary D., Mishra P.K. (2017). Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: a review. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 47(3):155-201.
- Uchida J.Y., Aragaki M. (1991). *Phytophthora* diseases of orchids in Hawaii. Honolulu (HI): University of Hawaii. Research Extension Series; RES-129.
- Uzoigwe C., Burgess J.G., Ennis C.J., Rahman P.K. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front. Microbiol.* 6:245.
- Varjani S.J., Upasani V.N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 232:389-397.
- Vasdinyei R., Deak T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. Food. Microbiol.* 86:123-170.
- Vaz D.A., Gudinab E.J., Alameda E.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloid. Surf.* 89:167-174.
- Wang J., Ji G., Tian J., Zhang H., Dong H., Yu L. (2011). Functional characterization of a biosurfactant-producing thermo-tolerant bacteria isolated from an oil reservoir. *Pet. Sci.* 8:353-356.
- Wang S.L., Mulligan C.N. (2009). Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. *Process. Biochem.* 44:296-301.

- Wei Y.H., Chou C.L., Chang J.S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *J Biochem Eng* 27:146-154.
- Wei Y.H., Lai C.C., Chang J.S. (2007). Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Proc. Biochem.* 42:40-45.
- Wilkinson S.G. (1972). Composition and structure of the ornithine-containing lipid from *Pseudomonas rubescens*. *Biochem. Biophys. Acta.* 270: 1-17.
- Yeh M.S., Wei Y.H., Chang J.S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Proc. Biochem.* 41:1799-1805.
- Younis M.A.M., Hezayen F.F., Nour-Eldein M.A., Shabeb M.S.A. (2010). Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *American-Eurasian. J. Agricul. Environ. Sci.* 7:31-37.
- Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L., Bertagnolli B.L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil. Biol. Biochem.* 34:955-963.
- Zhao B.G., Wang Z.S., Zhou A.G., Wang L.Z., Yu Q.L. (2009). Effect of microbial degradation lignin on fermentation characteristic of distillers grain *in vitro*. *Pakistan. J. Nutri.* 8:1411-1414.
- Zhao Z., Wong J.W. (2009). Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Technol.* 30:291-299.