

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตสาร biosurfactant โดยแบคทีเรียที่แยกจากดินและผลต่อการดูดซับ
ของน้ำมันในดิน

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL
AND ITS EFFECT ON PARTITION OF OIL INTO SOIL



นายชาคริต วังคะออม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรการเกษตร
และสิ่งแวดล้อม

พ.ศ. 2545

ลิขสิทธิ์ของโครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
 โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การจัดการทรัพยากรการเกษตรและสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

สาขาวิชา การจัดการทรัพยากรการเกษตร ภาควิชา ทรัพยากรดินและสิ่งแวดล้อม
 และสิ่งแวดล้อม

เรื่อง การผลิตสาร biosurfactant โดยแบคทีเรียที่แยกจากดินและผลต่อการดูดซับของน้ำมันในดิน
 BIOSURFACTANT PRODUCTION BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL AND ITS
 EFFECT ON PARTITION OF OIL INTO SOIL

นามผู้วิจัย นายชาคริต วังคะออม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

.....
 (อาจารย์ ดร. รูปน ชื่นบาล)

วันที่ 17 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2545

กรรมการที่ปรึกษา

.....
 (อาจารย์น้ำเพชร วินิจชัยกุล)

วันที่ 17 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2545

กรรมการที่ปรึกษา

.....
 (รองศาสตราจารย์บรรพต ตันติเสวี)

วันที่ 17 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2545

หัวหน้าภาควิชา

.....
 (รองศาสตราจารย์บรรพต ตันติเสวี)

วันที่ 17 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2545

โครงการบัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว
 แทน

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)

ประธานกรรมการโครงการบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 25 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 45

บทคัดย่อ

การผลิตสาร biosurfactant โดยแบคทีเรียที่แยกจากดินและผลต่อการดูดซับของน้ำมันในดิน

โดย

นายชาคริต วงศ์หอม

ธันวาคม 2545

ประธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร. รุจน์ ชื่นนาค

ภาควิชา/ คณะ: ภาควิชาทรัพยากรดินและสิ่งแวดล้อม คณะผลิตกรรมการเกษตร

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน 18 ตัวอย่าง ในเขตจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวนทั้งหมด 206 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิต biosurfactant เบื้องต้นจากคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar พบว่ามี 26 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัตินี้ จึงนำเชื้อดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหาร mineral salt medium ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ กลูโคส กลีเซอรอล และ เฮกซะเดคเคน หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบการทำให้เกิด emulsion โดยวิธี xylene emulsification assay ซึ่งเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สามารถใช้ในการคัดเลือกเชื้อที่ผลิต biosurfactant จากขั้นตอนนี้มีเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิด emulsion คือ $BS_{11}B_4$, $BS_{12}B_7$ และ $BS_{14}B_1$ เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน $BS_{16}B_1$ จะเกิด emulsion ได้ดีในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และ $BS_{18}B_1$ จะเกิดได้ดีในอาหารที่มีเฮกซะเดคเคนเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าแรงตึงผิวพบว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารลงได้ในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน คือ กลูโคส, กลีเซอรอล และเฮกซะเดคเคน เมื่อนำเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิต biosurfactant โดยมีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันคือ $BS_{11}B_4$, $BS_{12}B_7$ และ $BS_{14}B_1$ ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน $BS_{16}B_1$ ใช้กลีเซอรอล และ $BS_{18}B_1$ ใช้เฮกซะเดคเคนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตมีการปลดปล่อย biosurfactant ได้ดีในช่วงการเจริญก่อนระยะ stationary phase เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี คือ โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และฟอสฟอรัส พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต $BS_{11}B_4$, $BS_{12}B_7$, $BS_{16}B_1$ และ $BS_{18}B_1$ มีส่วนประกอบของน้ำตาลทั้งหมดในปริมาณสูง และส่วนไอโซเลต $BS_{14}B_1$ จะประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณสูง การทดสอบผลของ biosurfactant ต่อการดูดซับน้ำมันในดินที่มีระดับปริมาณอินทรีย์วัตถุต่างกันพบว่าน้ำเลี้ยงที่มี biosurfactant ซึ่งถูก

ผลิตโดยแบคทีเรีย $BS_{14}B_1$ ในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง มีผลต่อการดูดซับน้ำมันมากที่สุด
กล่าวคือ สามารถชะน้ำมันออกจากดินได้ดีที่สุด เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย ดังกล่าวมาจำแนกชนิด
พบว่าอยู่ในจีนัส *Serratia*



ABSTRACT

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL
AND ITS EFFECT ON PARTITION OF OIL INTO SOIL

BY

CHARKRIT WANGKAORM

DECEMBER 2002

Chairman: Dr. Tapana Cheunban

Department: Soil Resources and Environment

Faculty: Agricultural Production

This study was conducted to isolate bacteria from eighteen soil samples in Chiang Mai and Lampun Provinces. The results showed that two hundred-six bacterial isolates were obtained from the soil samples. Blood haemolysis was then used as an initial selection criterion for the primary isolation of biosurfactant-producing bacteria which yielded twenty-six bacteria isolates. These isolates were later cultured in mineral salt medium containing three different carbon source (glucose, glycerol and hexadecane) and then screened for emulsion through xylene emulsification assay. The results found three isolates ($BS_{11}B_4$, $BS_{12}B_7$ and $BS_{14}B_1$) to have a high emulsification activity in glucose, while $BS_{16}B_1$ had a high emulsification activity in glycerol and $BS_{18}B_1$ had a high emulsification activity in hexadecane. All five isolates can reduce the surface tension of mineral salt medium containing three different carbon sources. When studying the relationship between growth and biomass production using glucose in $BS_{11}B_4$, $BS_{12}B_7$ and $BS_{14}B_1$ while $BS_{16}B_1$ using glycerol and $BS_{18}B_1$ using hexadecane as carbon sources, all five isolates released biosurfactant well during early stationary phase. $BS_{11}B_4$, $BS_{12}B_7$, $BS_{16}B_1$ and $BS_{18}B_1$ produced biosurfactant composed of total sugar while $BS_{14}B_1$ produced biosurfactant composed of protein, upon analysis of the chemical components of culture broth. The experiments on oil absorption of biosurfactant in soil with different organic matter showed that the culture broth containing biosurfactant, produced by bacteria $BS_{14}B_1$ during 36-hour a culture period, mostly affected oil

absorption, i.e. oil was best removed from the soil by biosurfactant. This bacterial isolate, BS₁₄B₁ was identified to belong to the genus *Serratia*.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลงได้ด้วยความร่วมมือและความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายฝ่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.รฐปน ชื่นบาล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้สละเวลาให้คำปรึกษาในการทำวิจัย ชี้แนะแนวทางวิธีคิด การแก้ไขปัญหา ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ รวมทั้งรองศาสตราจารย์บรรพต ตันติเสรี และอาจารย์น้ำเพชร วิจิฉัยกุล กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาในงานวิจัย คอยติดตามการทำงาน ให้กำลังใจและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์จิรวัดมน์ คมเสวต กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรการเกษตร และสิ่งแวดล้อม รุ่นที่ 1 ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณน้อง ๆ นักศึกษาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ รุ่นที่ 2 ที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้มาเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในห้องปฏิบัติการ ในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อณรงค์ คุณแม่จันทราพรรณ วังคะหอม ซึ่งเป็นที่สุดของผู้ให้ เป็นผู้ที่มีพระคุณหาที่เปรียบมิได้ ท่านเป็นทั้งพ่อ – แม่ ครู และเพื่อน ที่คอยพุ่มพักทะนุถนอม คอยให้กำลังใจปลุกปลอบขวัญยามท้อแท้ ขอขอบพระคุณพี่สาว และญาติพี่น้องทุกท่านที่เคารพรัก ซึ่งคอยสนับสนุน ให้กำลังใจในการศึกษาจนสำเร็จและข้าพเจ้าขอน้อมรำลึกถึงพระคุณของคุณยาย ที่คอยอบรมเลี้ยงดูหลานชายจนประสบความสำเร็จได้ ข้าพเจ้ามีอาจลิมผู้มีพระคุณ เหล่านี้จนท้ายที่สุดของชีวิต

ชาคริต วังคะหอม

ธันวาคม 2545

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญเรื่อง	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	4
1. โครงสร้างของสาร surfactant	5
2. ประเภทของสาร biosurfactant	9
3. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิต biosurfactant	15
4. การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสาร biosurfactant ของจุลินทรีย์	18
5. การสลายทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน	21
6. การนำสาร surfactant ไปใช้ประโยชน์	26
7. การศึกษาสาร surfactant เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ ในการจัดการสิ่งแวดล้อม	28
8. คุณสมบัติทั่วไปของดินที่ใช้ในการทดลอง	34
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	35
อุปกรณ์	35
วิธีการทดลอง	38
สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง	41
ผลการทดลองและวิจารณ์	42

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน	42
2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสาร biosurfactant เบื้องต้น โดยวิธี blood haemolysis	43
3. การประเมินความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี xylene emulsification assay	44
4. การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant โดยเครื่อง Face Surface Tensiometer	46
5. การศึกษาช่วงการเจริญและการผลิต biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรีย	50
6. การตรวจชนิดของ biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตเบื้องต้น	58
7. การศึกษาผลของ biosurfactant ต่อการดูดซับน้ำมันในดิน	59
8. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant	62
สรุปผลการทดลอง	64
ข้อเสนอแนะ	66
บรรณานุกรม	68
ภาคผนวก	73
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี	74
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	78
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย	81

สารบัญตาราง

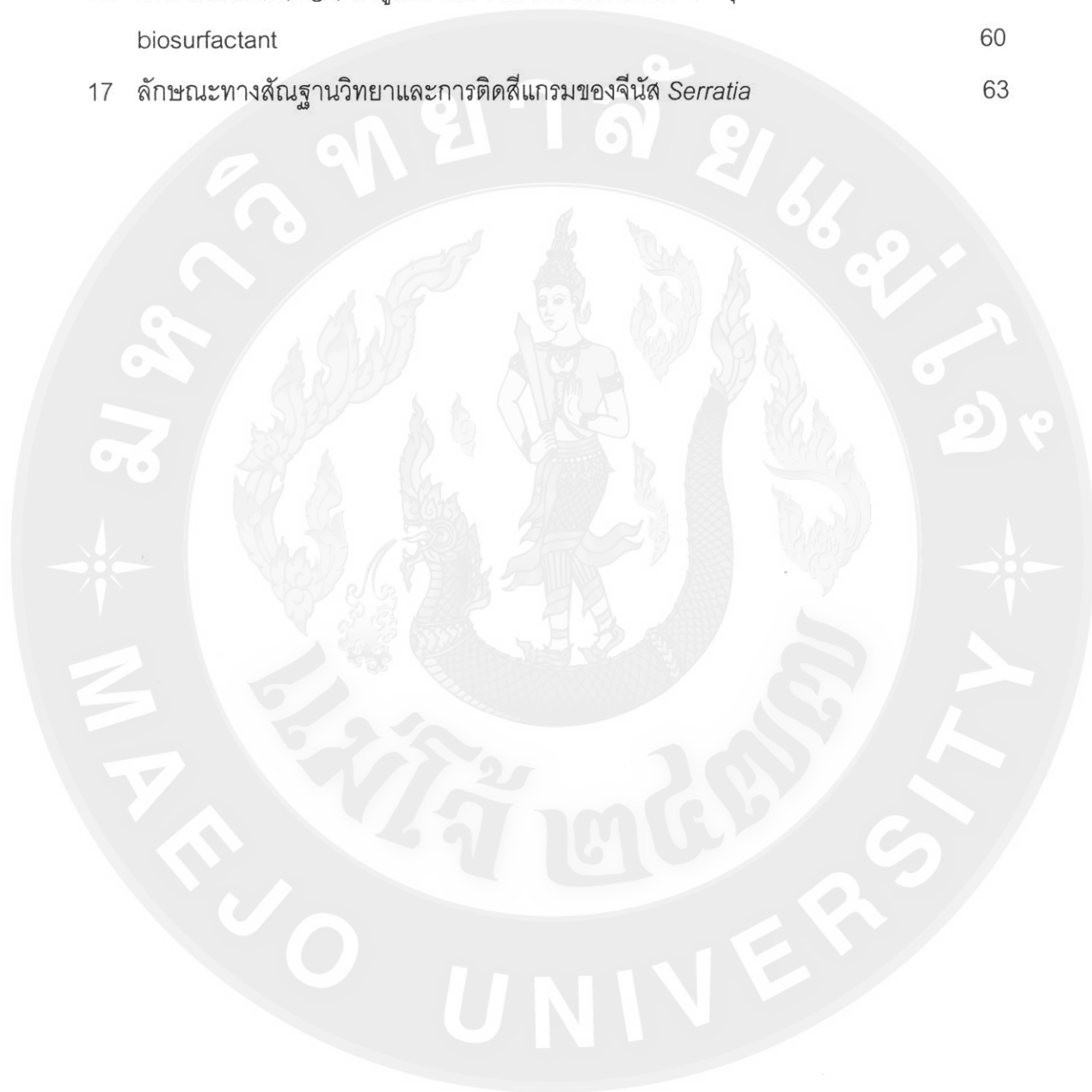
ตารางที่		หน้า
1	Biosurfactant ที่ผลิตจากจุลินทรีย์	9
2	แหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่ผลิตสาร biosurfactant ประเภทของ biosurfactant และค่าแรงตึงผิว	20
3	การใช้ surfactant ในอุตสาหกรรม	27
4	แหล่งของตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้	42
5	ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 26 ไอโซเลต เมื่อทดสอบโดยวิธี xylene emulsification assay	44
6	ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิต biosurfactant ในอาหารที่มี แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด	48
7	ค่าการดูดกลืนแสงของวิธีการวิเคราะห์ชนิด biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรีย ผลิตเบื้องต้น	58
8	ความสามารถในการชะน้ำมันออกจากดินของ biosurfactant ที่แบคทีเรียผลิต	59
9	ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย BS ₁₄ B ₁	62

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การจัดเรียงตัวของ emulsifier ที่อยู่ระหว่างน้ำกับน้ำมัน	6
2 โครงสร้างของสาร surfactant	7
3 โครงสร้างของ micelle	7
4 รูปแบบของ micelle ที่เปลี่ยนแปลงไปตามตัวแปรต่าง ๆ	8
5 โครงสร้างของ glycolipid ที่ประกอบด้วย rhamnose 1 และ 2 โมเลกุล ซึ่งผลิตโดย <i>Pseudomonas</i> sp.	11
6 โครงสร้างของสาร biosurfactant ที่ผลิตโดย <i>Bacillus subtilis</i>	12
7 โครงสร้างของ lactonic และ acidic sophorose lipid ซึ่งผลิตโดย <i>Torulopsis magnoliae</i>	13
8 โครงสร้างของ cellobioselipid ซึ่งผลิตโดย <i>Ustilago zeae</i>	14
9 วงใสที่เกิดจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบบน blood agar	43
10 เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เจริญในอาหารสูตร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอน ต่างกัน	47
11 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย BS ₁₁ B ₄ เมื่อใช้กลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอน	52
12 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย BS ₁₂ B ₇ เมื่อใช้กลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอน	53
13 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย BS ₁₄ B ₁ เมื่อใช้กลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอน	54
14 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย BS ₁₆ B ₁ เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็น แหล่งคาร์บอน	55
15 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย BS ₁₈ B ₁ เมื่อใช้เฮกซะเดคเคน เป็นแหล่งคาร์บอน	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16 ปริมาณน้ำมัน (mg/l) ซึ่งถูกชะออกจากดินที่ระดับอินทรีย์วัตถุต่างกันโดย biosurfactant	60
17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรมของจีไนต์ <i>Serratia</i>	63



บทนำ

ปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมัน ได้แก่ ของเสียจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมและพวกน้ำมันหล่อลื่นเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญและควรแก้ไข น้ำมันปิโตรเลียมประกอบด้วยสารเคมีต่าง ๆ หลายชนิด แต่องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเมื่อมีการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม ส่วนใหญ่จะดูดซับอยู่กับอนุภาคดิน และในสภาวะปกติการดึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากอนุภาคดินให้อยู่ในรูปสารละลายที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพนั้นยากมาก

จากอดีตถึงปัจจุบันมีการใช้สาร synthetic surfactant ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการดึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากดิน โดยกระบวนการดึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะมีประสิทธิภาพดีเมื่อความเข้มข้นของสาร surfactant มีค่ามากกว่าระดับ CMC (critical micelle concentration) อย่างไรก็ตามการใช้สาร surfactant ที่ความเข้มข้นในระดับนี้จะมีผลยับยั้งการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรีย เพราะแบคทีเรียสามารถใช้สาร synthetic surfactant เป็นแหล่งคาร์บอนง่ายกว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ข้อเสียของการใช้สาร synthetic surfactant มีหลายประการ เช่น 1) ในกรณีที่ surfactant อาจมีผลกระทบต่อกระบวนการย่อยสลาย 2) สาร synthetic surfactant อาจมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อม 3) กระบวนการผลิต synthetic surfactant บางชนิดเป็นแหล่งกำเนิดมลพิษ เช่น กระบวนการผลิต sodium dodecylbenzene sulfonate (SDS) จะก่อให้เกิดสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อนและสารมลพิษบางชนิด (Cooper, 1986)

จากผลข้างต้นจึงมีการนำสาร biosurfactant ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์ผลิตแล้วปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์และมีจำนวนหลายชนิด ซึ่งสารนี้สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส ยีสต์และรา สารนี้จะมีคุณสมบัติในการดึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากอนุภาคดินให้อยู่ในรูปสารละลาย ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ และจะไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และสามารถย่อยสลายได้ง่ายจึงไม่มีพิษตกค้างใน สิ่งแวดล้อม (Cooper, 1986)

แบคทีเรียเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความเหมาะสมในการที่จะนำมาใช้ เนื่องจากเป็น จุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ได้ดี เพราะมีความหลากหลาย และมีโครงสร้างของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร biosurfactant เช่น *Rhodococcus ruber* IEGM AC 219 (Ivshina et al, 1998), *Bacillus* sp. KP-2 (Niran et al., 1996) และ *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 (Robert et al., 1989) จึงได้ทำการศึกษาเพื่อคัดแยกเชื้อ แบคทีเรียจากดินที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสม ที่จะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในกระบวนการต่อไป



วัตถุประสงค์การวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสาร biosurfactant จากดิน
2. จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant
3. ศึกษาช่วงระยะเวลาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่มีผลต่อการผลิตสาร biosurfactant
4. จำแนกชนิดของสาร biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตได้
5. ทดสอบประสิทธิภาพของสาร biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตได้ต่อการดูดซับของน้ำมันในดิน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสาร biosurfactant ที่คัดแยกได้จากดิน
2. ได้ทราบถึงช่วงระยะเวลาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสาร biosurfactant ได้ดีและชนิดของสาร biosurfactant
3. ได้ทราบถึงประสิทธิภาพของสาร biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตได้ต่อการดูดซับของน้ำมันในดิน

การตรวจเอกสาร

สาร biosurfactant คือ surface – active compound ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ biomolecular ชนิดนี้มีลักษณะเป็น amphiphilic ประกอบไปด้วยส่วน hydrophilic และ hydrophobic ซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวของอาหาร (Fiechter, 1992)

จุลินทรีย์สามารถผลิต biosurfactant เมื่อเจริญในสัปดาห์ที่สามซึ่งไม่สามารถละลายได้ (เช่น ไฮโดรคาร์บอน น้ำมัน และ wax) หรือในสัปดาห์ที่ละลายน้ำได้ (คาร์โบไฮเดรต) ในอุตสาหกรรมจะใช้คาร์โบไฮเดรตมากกว่าชนิดอื่น (Guerra-Santos *et al.*, 1984) จุลินทรีย์จะสะสม biosurfactant ไว้ที่ผิวเซลล์หรือถูกขับออกเป็น extracellular สาร surfactant ที่ได้จากจุลินทรีย์มีความได้เปรียบหลายอย่างเพราะทำให้เกิดสารพิษต่ำ (Pruthi and Cameotra, 1997a)

สาร biosurfactant มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้ในกระบวนการ oil recovery ซึ่งสาร biosurfactant มีคุณสมบัติเป็นสารที่ทำให้เกิดฟอง สารที่ช่วยลดแรงตึงผิว และทำให้เกิด emulsion มีการนำสาร biosurfactant มาใช้ในเกษตรกรรม เกษตรกรรม เครื่องสำอาง และอีกมากมายในอุตสาหกรรมทางเคมี (Robert *et al.*, 1989)

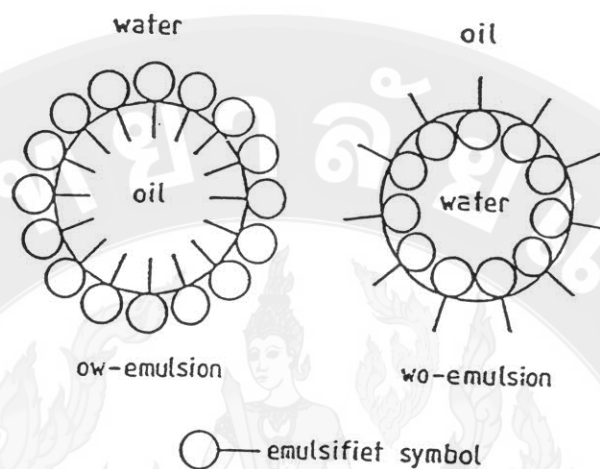
ความสนใจ biosurfactant เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะประโยชน์ในด้านการจัดการสิ่งแวดล้อม และในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม การใช้ biosurfactant ในการจัดการสิ่งแวดล้อมที่สำคัญคือ ใช้ในกระบวนการ bioremediation ของน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในดินและน้ำใต้ดิน และใช้ในการย่อยสลายสารประกอบอันตราย (Francy *et al.*, 1991) ในอุตสาหกรรมน้ำมัน มีการใช้สาร biosurfactant ในกระบวนการ enhance oil recovery ใช้ในการทำควมสะอาดท่อ และทำให้การไหลของ crude oil ในท่อสะดวกขึ้น (Ghurye *et al.*, 1994)

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิต biosurfactant ได้โดยสังเกตจากการวัดค่า surface activity ซึ่งได้แก่ surface tension, inter facial tension และความสามารถทำให้เกิด emulsion ของน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper and Zajic, 1980)

1. โครงสร้างของสาร surfactant

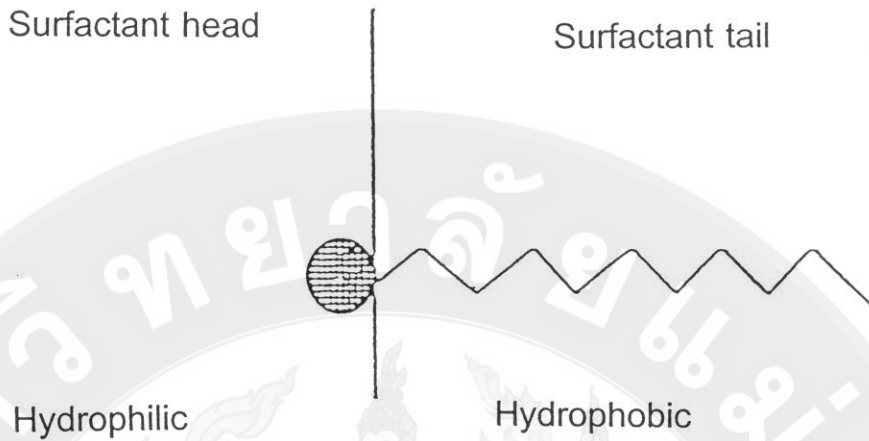
สาร “surfactant” หรือ “surface – active agent” เมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง เช่น น้ำ จะมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นไฮโดรคาร์บอนธรรมดา (สายตรง หรือมีกิ่งก้าน) ส่วนที่ชอบน้ำจะประกอบด้วยไอออนต่างๆ และส่วนที่มีขั้วสูง เช่น กลุ่ม polyglycol ether ในการแยกประเภทของสาร surfactant จะอาศัยชนิดของไอออนที่ส่วน hydrophilic group เป็นตัวจำแนก เช่น anionic, cationic, zwitterionic และ nonionic surfactant (Rosen, 1989)

เมื่อสาร surfactant กระจายตัวอยู่ในน้ำ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะหันเข้าหากันรวมกันเป็นกลุ่ม แล้วหันเอาด้านที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ออกไปสัมผัสกับสารละลาย (Rosen, 1989) โดยการรวมตัวกันของ surface – active molecule หรือ monomer เรียกว่า “micelle” โดย micelle สามารถจับกับน้ำมันซึ่งเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ เพราะบางส่วนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกลายเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำของ micelle นั้นเอง ดังนั้นสาร biosurfactant จึงมีคุณสมบัติเป็น emulsifier ด้วย (Peter *et al.*, 1992) เมื่อ emulsifier อยู่ระหว่างน้ำกับน้ำมันจะมีการจัดเรียงตัว ดังภาพที่ 1

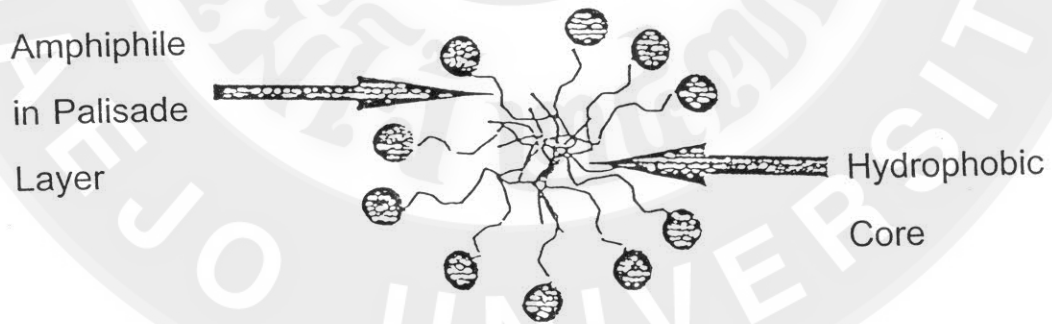


ภาพที่ 1 การจัดเรียงตัวของ emulsifier ที่อยู่ระหว่างน้ำกับน้ำมัน (Kachholz and Schlingmann, 1987)

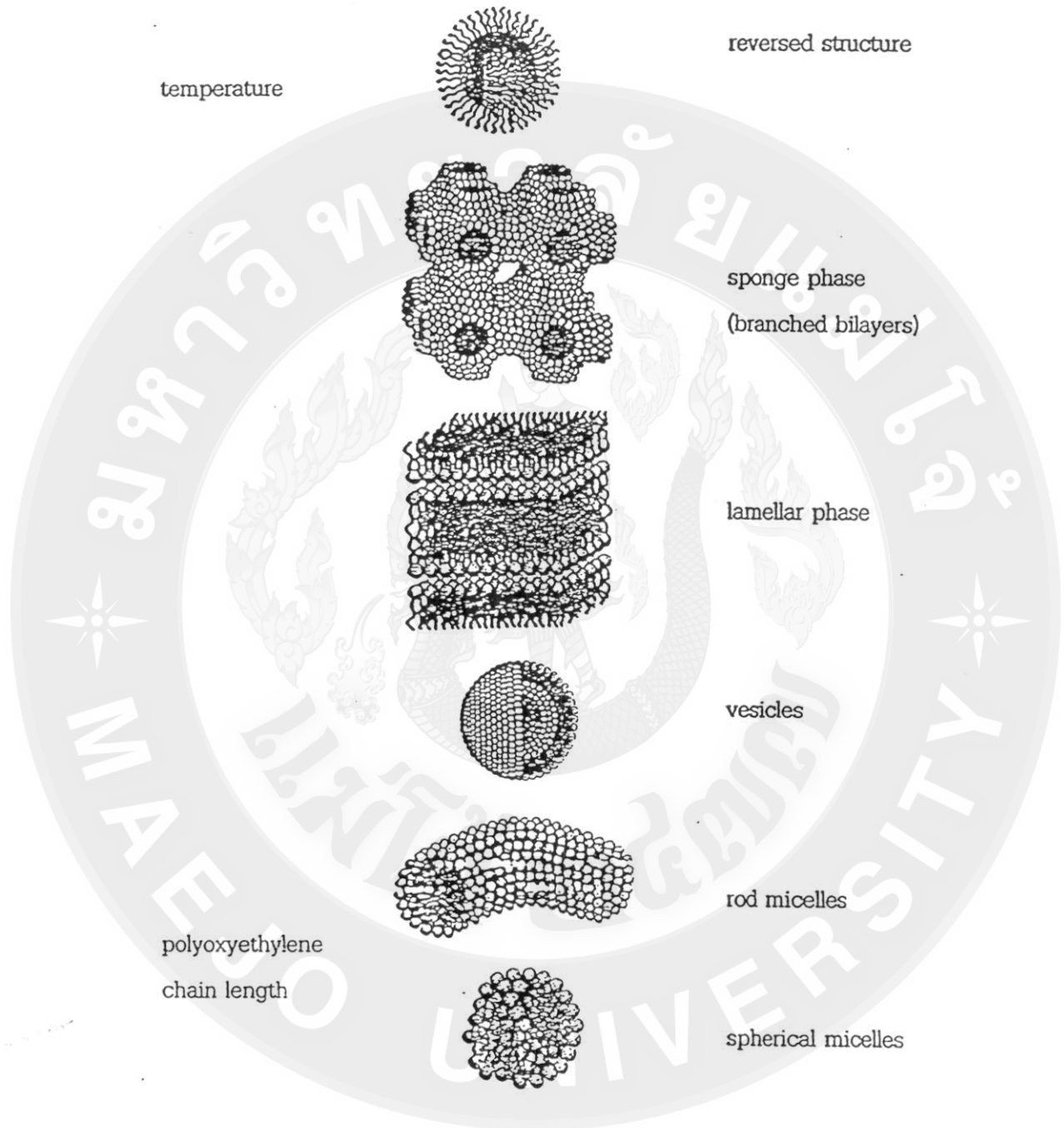
รูปแบบของ micelle มีหลายรูปแบบ เช่น กลมคล้ายท่อน หรือเป็นแผ่นบาง ๆ ซึ่งจะถูกผลิตขึ้นที่ชั้นของเหลวในสารละลาย โดยจะเป็นตัวพิจารณาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว และเป็นปัจจัยที่มีผลต่อระดับ CMC (critical micelle concentration) ตัวแปร เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสาร surfactant และจำนวน oxyethylene group ทำให้ micelle มีปริมาณและรูปร่างที่แตกต่างกัน (Rosen, 1989) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 2 โครงสร้างของสาร surfactant (Wilson and Clark, 1994)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ micelle (Wilson and Clark, 1994)



ภาพที่ 4 รูปแบบของ micelle ที่เปลี่ยนแปลงไปตามตัวแปรต่าง ๆ (Jonsson *et al.*, 1999)

2. ประเภทของสาร biosurfactant

สาร biosurfactant ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย lipids และแบ่งออกได้เป็น 5 ประเภท ดังนี้

1. glycolipids
2. lipopolysaccharides
3. lipopeptides
4. phospholipids
5. fatty acids และ neutral lipids

จากการศึกษาของ Georgiou *et al.*, (1992) พบว่าสาร biosurfactant ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นพวก glycolipids, lipopeptides และ fatty acids และจุลินทรีย์ที่ผลิตส่วนใหญ่เป็นพวก *Rhodococcus sp.*, *Nocardia sp.*, *Bacillus sp.* และ *Pseudomonas sp.* (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Biosurfactant ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Kosaric *et al.*, 1987)

จุลินทรีย์	ชนิดของ surfactant
<i>Torulopsis bombicola</i>	glycolipid (sophorose lipid)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	glycolipid (rhamnose lipid)
<i>Bacillus licheniformis</i>	lipoprotein (surfactin)
<i>Bacillus subtilis</i>	lipoprotein (surfactin)
<i>Pseudomonas sp.</i> DSM 2874	glycolipid (rhamnose lipid)
<i>Arthobacter paraffineus</i>	sucrose and fructose glycolipids
<i>Arthobacter</i>	glycolipid
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	rhamnose lipid
<i>Pseudomonas sp.</i> MUB	rhamnose lipid
<i>Torulopsis petrophilum</i>	glycolipid and / or protein
<i>Candida tropicalis</i>	polysaccharide – fatty acid complex

ตารางที่ 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	ชนิดของ surfactant
<i>Corynebacterium lepus</i>	corynomycolic acids
<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N	fatty acid, mono – and diglycerides
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	lipoheteropolysaccharide (emulsan)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2CAC	whole cell (lipopeptide)
<i>Candida lipolytica</i>	liposan (mostly carbohydrate)
<i>Candida petrophilum</i>	peptidolipid
<i>Nocardia erythropolis</i>	neutral lipids
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	trehalose dimycolate
<i>Corynebacterium salvonicum</i> SFC	neutral lipid
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	polysaccharide – protein complex

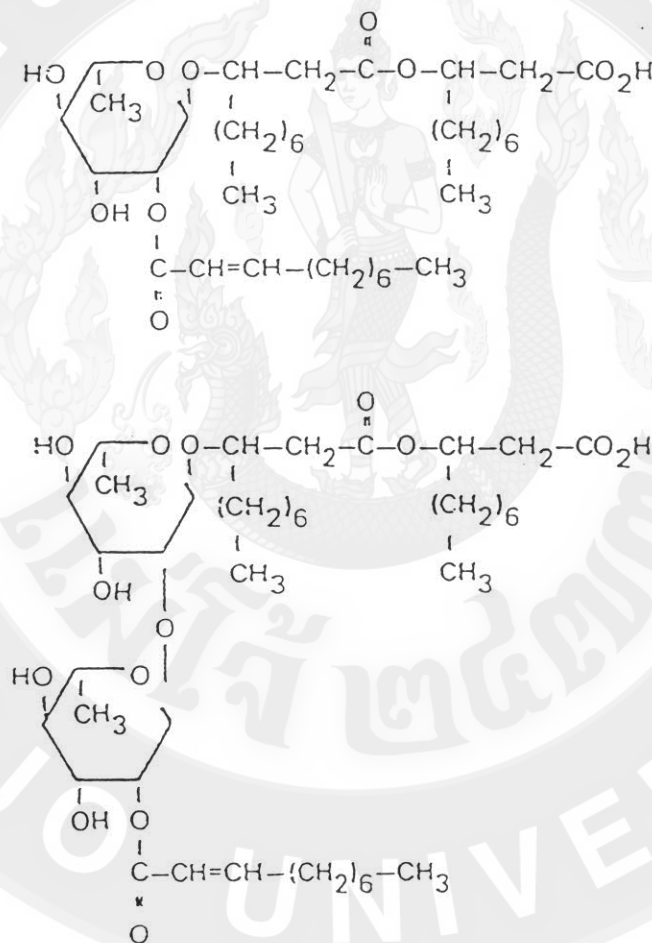
ประเภทของสาร biosurfactant จำแนกตามชนิดจุลินทรีย์ที่ผลิต (Fiechter, 1992)

สาร biosurfactant นั้นสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งชนิดสาร biosurfactant ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตขึ้นมานั้นจะแตกต่างกัน เนื่องจากโครงสร้างและส่วน hydrophilic ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหรือกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจึงใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกประเภทของสาร biosurfactant ได้ดังนี้

1. Bacterial surfactant แบ่งออกเป็น 2 ประเภท

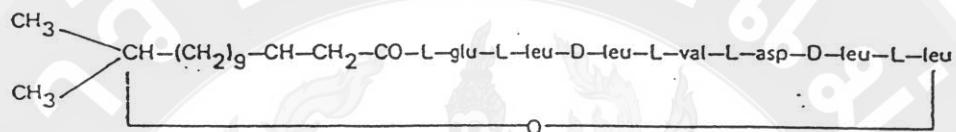
1.1 glycolipid surfactant ประกอบด้วยน้ำตาล rhamnose -, thehalose -, sucrose - และ fructose - แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต คือ *Pseudomonas* sp. และ *Rhodococcus* sp. เช่น *Pseudomonas aeruginosa* No. 141 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี peptone หรือ กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะผลิตสาร biosurfactant ที่ประกอบด้วย

rhamnose 2 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ α - 1,2 linkage และส่วน hydrophilic จะประกอบด้วย 2β - hydroxydecanoic acid และ *Pseudomonas aeruginosa* KY 4025 เจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วย n-paraffin (10 เพอร์เซ็นต์) จะผลิตสาร biosurfactant ที่ประกอบด้วย rhamnose 1 โมเลกุล และ 2β - hydroxydecanoic acid ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างของ glycolipid ที่ประกอบด้วย rhamnose 1 และ 2 โมเลกุล
ซึ่งผลิตโดย *Pseudomonas* sp. (Lang and Wagner, 1987)

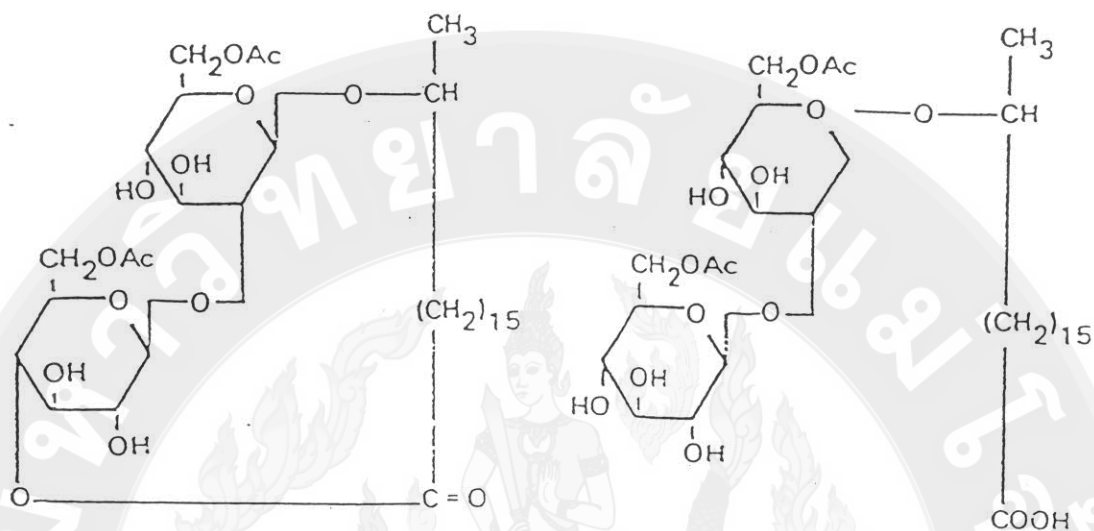
1.2 amino acid containing lipid biosurfactant ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ตัว มาต่อกัน ได้แก่ Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu พบใน *Bacillus subtilis* ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างของสาร biosurfactant ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* (Lang and Wagner, 1987)

2. Yeast surfactant

- เป็น surfactant ที่มีขนาดเล็กและมีประสิทธิภาพดี โดยส่วน hydrophobic จะอยู่ในรูป lactic หรือ acidic form พบใน *Torulopsis magnoliae* ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 โครงสร้างของ lactonic และ acidic sophorose lipid ซึ่งผลิตโดย
Torulopsis magnoliae (Lang and Wagner, 1987)

3. Fungal surfactant

- พบใน *Ustilago zaeae* จะผลิตเมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยโครงสร้างจะประกอบด้วย di-glucose กับ β -OH alkanolic acid ในส่วน hydrophobic ดังภาพที่ 8

3. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิต biosurfactant

biosurfactant ที่ถูกผลิตโดยจุลินทรีย์มีปัจจัยหลายด้านต่อการผลิตทั้งปัจจัยทางด้านอาหารและสิ่งแวดล้อม เช่น แหล่งคาร์บอน, ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอน, ธาตุอาหาร, โลหะ, pH, อุณหภูมิ และความเค็มของกล้ำเชื้อ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิต biosurfactant ในสภาวะที่แตกต่างกันไป

การศึกษาของ Cooper (1986) พบว่า biosurfactant เกือบทั้งหมดถูกปลดปล่อยออกมาโดยจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะ exponential phase เช่น glycolipids ซึ่งถูกผลิตโดย *Torulopsis bombicola* ใช้คาร์โบไฮเดรตและน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนในระยะหลังของช่วง exponential phase Hommel *et al.* (1987) พบว่า ชนิดของสับสเตรทมีอิทธิพลในการผลิต biosurfactant ส่วนช่วงระยะเวลาการผลิต biosurfactant โดยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงทันทีหลังจากเริ่มต้นการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งมีปริมาณของ biosurfactant เพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ถูกผลิตออกมาในช่วงหลังของระยะ stationary phase ในทางกลับกัน เมื่อใช้ *n* - hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน biosurfactant จะถูกปลดปล่อยออกมาในช่วงกลางของระยะ exponential phase เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase คาร์บอนที่เหลืออยู่ยังคงถูกใช้ในการผลิต biosurfactant อย่างต่อเนื่อง และ biosurfactant จะถูกผลิตในบางช่วงของการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งจะผลิต biosurfactant ออกมาสองชนิด เช่น *Corynebacterium lepus* ผลิต biosurfactant สองชนิดคือ corynomycolic acid ถูกผลิตออกมาในช่วงแรกของการเจริญและส่งผลให้มีการผลิต biosurfactant ชนิด lipopeptides ซึ่งเป็น biosurfactant ที่มีบทบาทสำคัญในการลดค่าแรงตึงผิว โดยจะถูกผลิตออกมาในช่วงท้ายของการเจริญ

ปัจจัยหลักที่สำคัญต่อการผลิต biosurfactant โดยจุลินทรีย์อีกปัจจัยหนึ่งคือ สับสเตรท โดยทั่วไปไฮโดรคาร์บอนถูกใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิต biosurfactant แต่ในบางกรณีคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส และ กลิเซอรอล ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเช่นกัน จุลินทรีย์บางชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต biosurfactant เช่น *Arthrobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, *Torulopsis bombicola* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น จุลินทรีย์หลายชนิดถูกพบว่าสามารถใช้ไฮโดรคาร์บอนและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต biosurfactant แต่ผลผลิตที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีปริมาณน้อยกว่าการผลิต biosurfactant ที่ใช้ไฮโดรคาร์บอน (Hommel *et al.*, 1987; and Cooper *et al.*, 1981) Cooper and Paddock

(1984) รายงานว่า *Torulopsis bombicola* จะผลิต glycolipids โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากลูโคสมีผลต่อการเจริญของเซลล์ที่ดี แต่การผลิต biosurfactant ลดลงสอดคล้องกับการศึกษาของ Duvnjak *et al.* (1982) พบว่า *Arthobacter paraffineus* ATCC 19558 ให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ในขณะที่ใช้เฮกซะเดคเคน เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิต biosurfactant สูง แต่เมื่อเติมกลูโคสพบว่าการผลิต biosurfactant หยุดลงทันที จากเหตุผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ ในขณะที่เฮกซะเดคเคน จุลินทรีย์จะใช้เพื่อผลิตและปลดปล่อย biosurfactant ดังนั้นการใช้ เฮกซะเดคเคนจึงสามารถผลิต biosurfactant ได้มากกว่า ในทางกลับกัน เมื่อ Cooper *et al.* (1981) ใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิต biosurfactant โดย *Bacillus subtilis* พบว่า หลังจากเติมไฮโดรคาร์บอนมีผลต่อการผลิต biosurfactant กล่าวคือเมื่อเติมเฮกซะเดคเคน มีผลต่อการเพิ่มมวลชีวภาพแต่จะมีผลในการยับยั้งการผลิต biosurfactant

Hommel *et al.* (1987) อธิบายว่าการผลิต biosurfactant ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอน การเติมแหล่งคาร์บอนในช่วงกลางของวัฏจักรการเจริญไม่สามารถเพิ่มการผลิต biosurfactant ได้ ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสสูงมีผลต่อการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง เพราะมีผลต่อการทำให้เกิดฟอง

สารอนินทรีย์มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิต biosurfactant ของจุลินทรีย์ เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ค่า C/N ratio ที่เหมาะสมมีผลต่อการผลิต biosurfactant ในระดับสูงสุด ระดับ C/N ratio ที่สูงหรือต่ำเกินไปมีผลต่อการผลิต biosurfactant ที่ลดลง สำหรับฟอสฟอรัส พบว่า C/P ratio ที่ระดับ 16 มีระดับการผลิต biosurfactant สูงสุด ค่า C/P ratio ที่ลดลงมีผลต่อการผลิต biosurfactant ที่เพิ่มสูงขึ้น (Cooper and Paddock, 1984) อธิบายได้ว่าไนเตรทไม่มีความเหมาะสมที่จะเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตมวลชีวภาพ แต่ก็ยังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าแอมโมเนียม Cooper *et al.* (1981) ใช้ *Bacillus subtilis* ในการผลิต lipopeptides โดยใช้ nutrient broth, yeast extract หรือ กรดอะมิโน Cooper and Paddock (1984) กล่าวว่า yeast extract มีความสำคัญต่อการเจริญของ *Torulopsis bombicola* แต่เมื่อมีปริมาณมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มมวลชีวภาพ รวมถึงการผลิต biosurfactant ด้วย เมื่อใช้ peptone แทน yeast extract ทำให้การผลิตมวลชีวภาพและ biosurfactant ลดลงครึ่งหนึ่ง และเมื่อใช้ยูเรียแทนพบว่า ผลผลิตมวลชีวภาพและ biosurfactant มีน้อยมาก ในทางกลับกัน

การศึกษาของ Cooper et al. (1981) โดยใช้ *Pseudomonas aeruginosa* เลี้ยงใน yeast extract พบว่าสามารถผลิต biosurfactant ได้น้อย ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนสามารถผลิต biosurfactant โดย *Bacillus licheniformis* JF2 ซึ่งถูกเลี้ยงใน glucose media กับ yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิต biosurfactant อีกปัจจัยหนึ่งคือ ปริมาณของโลหะในอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า C/Mg ratio เท่ากับ 364 เหมาะสมต่อการผลิต biosurfactant มากที่สุด หากมีการลดค่า C/Mg ratio การผลิต biosurfactant จะลดลงเช่นกัน ผลผลิตของ biosurfactant ที่ดีขึ้นพบว่า ความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยของเกลือของแคลเซียม, โพแทสเซียม, โซเดียม และธาตุอาหารรอง Cooper et al. (1981) ศึกษาถึงผลของโลหะต่อ *Bacillus subtilis* พบว่าเมื่อเติม FeSO_4 และ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ จะมีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิต biosurfactant เมื่อเติม MnSO_4 การผลิต biosurfactant จะเพิ่มขึ้น แต่การเจริญของเซลล์จะยังคงเดิม ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่ามีความต้องการเกลือของแมงกานีสเพียงเล็กน้อยเท่านั้นสำหรับการเจริญและการผลิต biosurfactant แต่ที่ความเข้มข้นเกลือของ Fe และ Mn มากเกินไปจะมีผลต่อการผลิต biosurfactant ลดลง เกลือของ MnSO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaNO_3 , ZrOCl_2 , $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ และ VOSO_4 ไม่มีผลต่อการผลิต biosurfactant ส่วน ZnSO_4 มีผลต่อการชะงักการเจริญของจุลินทรีย์ และ CuSO_4 , NiSO_4 , CoSO_4 , และ $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ปริมาณเกลือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เช่น CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ NaCl ถูกเติมลงในสารละลาย biosurfactant ทำให้ลดค่าแรงตึงผิวของสารละลายได้ (Zajic et al., 1977)

การศึกษาผลของออกซิเจนต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีอย่างกว้างขวาง (Harrison, 1973) ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการผลิต biosurfactant โดยจุลินทรีย์ แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ decane เป็นสับสเตรทสำหรับ *Pseudomonas* sp. ปริมาณของคาร์บอนที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์จะถูกผลิตเพิ่มขึ้นจาก 56 เป็น 79 เปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนที่เป็นประโยชน์ เมื่อออกซิเจนละลายมีค่าลดลงจาก 30 เป็น 1 มิลลิเมตรปรอท ในทางกลับกัน เมื่อค่าการละลายของออกซิเจนจาก 28 ถึง 110 มิลลิเมตรปรอท ไม่มีผลต่ออัตราการหายใจของจุลินทรีย์ ค่าการละลายของออกซิเจน 28 ถึง 7 มิลลิเมตรปรอท ทำให้อัตราการหายใจเพิ่มขึ้น และลดการผลิตคาร์บอนที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์ และเมื่อค่าการละลายของออกซิเจนอยู่ระหว่าง 560 ถึง 675 มิลลิเมตรปรอท มีผลทำให้การผลิต extracellular เพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากการยับยั้งของออกซิเจนในการออกซิไดส์สาร metabolic

intermediate เมื่อมีการจำกัดอัตราของออกซิเจนจะมีการผลิตเอทานอลและบิวทานอล ฉะนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าออกซิเจนมีผลต่อการยับยั้งการสร้างแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต biosurfactant

ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต biosurfactant คือ pH, อุณหภูมิ และอัตราความเงี้ยวของกล้ำเชื้อ (Cooper and Paddock, 1984; Duvnjak *et al.*, 1982; and Zajic *et al.*, 1977) จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิและ pH ที่แตกต่างกันไป ถ้าหากอุณหภูมิและ pH ต่ำหรือสูงเกินไป พบว่า การผลิต biosurfactant จะลดลง ส่วนอัตราความเงี้ยวก็มีผลต่อการผลิต biosurfactant ด้วย กลำคือ *Pseudomonas aeruginosa* ที่อัตราความเงี้ยว 0.15 h^{-1} และ 0.08 h^{-1} เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการผลิต biosurfactant ได้สูงสุดซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่อัตราความเงี้ยวต่ำจะมีความเป็นประโยชน์ต่อการผลิต biosurfactant

4. การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสาร biosurfactant ของจุลินทรีย์

Duvnjak and Kosaric (1985) พบว่า *Corynebacterium lepus* มีการผลิต extracellular surfactant ในช่วงที่เจริญในอาหาร mineral salt medium ที่มีกลูโคส แล้วเติมเฮกซะเดกเคน หลังจากการเจริญสาร surfactant จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์เมื่อมีการเติมเฮกซะเดกเคน และ เตตระเดกเคน ส่วนเดกเคนและออกเทนให้ผลไม่ดีเท่าเฮกซะเดกเคน และ เตตระเดกเคน

Robert *et al.* (1989) พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 สร้าง rhamnolipid เมื่อเจริญใน mineral salt medium ที่มี $\text{C}_{12} \text{ n} - \text{alkane}$ เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่เกิดในแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่ทดสอบโดยผลที่ดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันมะกอก เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งได้ปริมาณของ rhamnolipid 7.65 กรัมต่อลิตร

Pruthi and Cameotra (1997a) พบว่า เมื่อเลี้ยง *Serratia macescens* ใน mineral salt medium ที่เติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ (w / v) จะได้ biosurfactant ที่เป็น emulsifier

ที่ดี และสามารถลดแรงตึงผิวได้โดยการลดแรงตึงผิวและการเพิ่มของ biosurfactant จะอยู่ระหว่างช่วง late log phase ซึ่งให้เห็นว่า biosurfactant เป็นสารทุติยภูมิและ biosurfactant ทำให้เกิด emulsion คงที่ในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลายชนิดและพบว่าการผลิต biosurfactant ของ *Arthrobacter protophormiae* ระหว่างการเจริญในอาหารที่เติม n – hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน biosurfactant ที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารลงจาก 68.0 mN/m. เป็น 30.6 mN/m

แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อการผลิต biosurfactant มีหลายชนิด อาทิ เช่น กลูโคส กลิเซอรอล และเฮกซะเดคเคน ซึ่งคุณสมบัติของ biosurfactant ที่จุลินทรีย์ผลิตได้ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่นำไปใช้ด้วย (Georgiou *et al.*, 1992) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่ผลิตสาร biosurfactant ประเภทของ biosurfactant และค่าแรงตึงผิว (Georgiou *et al.*, 1992)

Biosurfactant	จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แรงตึงผิว (mN / m)
Glycolipids			
Glycolipids	<i>Rhodococcus aurantiacus</i>	n - alkanes	26
Glycolipids	<i>Torulopsis apicola</i>	alkane / carbohydrate	30
Pentasaccharide lipid	<i>Nocardia corynebacteroides</i>	n - alkane	26
Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	กลูโคส	29
Rubiowettins	<i>Serratia rubidaea</i>	กลีเซอรอล	25.5 – 25.8
Sophorolipids	<i>Torulopsis bombicola</i>	กลูโคส / oleic acid	33
Lipopeptides/ aminolipids			
Lipopeptides	<i>Bacillus licheniformis</i> JF 2	กลูโคส	27
Lipopeptides	<i>Bacillus licheniformis</i> 86	กลีเซอรอล	27
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	กลีเซอรอล	26.5
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>	กลีเซอรอล	28.8 – 33.9
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	กลีเซอรอล	27 – 32
Fatty acids/ neutral lipids			
Fatty acids	<i>Corynebacterium lepus</i>	kerosene / alkanes	< 30
Fatty acids + neutral lipid	<i>Nocardia erythropolis</i>	เฮกซะเดกเคน	32

จากการศึกษาของ Cooper (1986) พบว่า biosurfactant ที่มีประสิทธิภาพต้องสามารถทำให้แรงตึงผิวมีค่าต่ำกว่า 35 mN /m.

5. การสลายทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน (Sood,1997)

Bioremediation ของดินเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์สำหรับเปลี่ยนสารปนเปื้อนให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เฉื่อย สารปนเปื้อนประเภทสารอินทรีย์จะถูกใช้โดยจุลินทรีย์ในรูปแบบของแหล่งพลังงานและเพื่อการเติบโต เช่นเดียวกับพวกปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสามารถเกิดการสลายทางชีวภาพได้ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนพวก lighter soluble members จะถูกย่อยสลายได้รวดเร็วและเหลือคั่งน้อยกว่าพวกที่หนักกว่า ซึ่งเป็นพวกที่ไม่ละลาย (less soluble members) ดังนั้น monoaromatic compounds เช่น benzene, toluene, ethylbenzene และ xylene (BTEX compound) จะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าพวกสารประกอบที่โครงสร้างเป็นวงแหวน 2 วง เช่น naphthalene ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงไปได้ง่ายกว่าพวกที่โครงสร้างเป็นวงแหวน 3, 4 และ 5 วง พวก polyaromatic hydrocarbons (PAH) เหล่านี้ถูกเรียกว่า ringed compounds ซึ่งมักพบใน heavier petroleum hydrocarbon blends สารประกอบเป็น nonpolar hydrophobic molecules ซึ่งจำกัดความสามารถการละลายในน้ำ สารประกอบเหล่านี้จะถูกปลดปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมโดยกระบวนการต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน เช่น ของเสียจากการรักษาสภาพไม้, ของเสียทางเคมี, ของเสียจากขบวนการที่เกี่ยวข้องกับถ่านหิน และตะกอนจากโรงกลั่นปิโตรเลียม PAHs จะถูกดูดซึมเข้าสู่ดินที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง เพราะมี octanol/water partition coefficient (K_{ow}) สูงนั่นเอง ระบบน้ำดิน (soil/water system) สารประกอบเหล่านี้จะถูกพบในความเข้มข้นสูงในดินมากกว่าในน้ำ และสามารถสะสมในปลาและสิ่งมีชีวิตในน้ำชนิดอื่น ๆ ได้ และสารพวก PAHs หลายชนิด เป็นพิษต่อยีสส์ (พันธุกรรม) และเป็นสารก่อมะเร็งด้วย

ตำแหน่งของสารปนเปื้อนใน subsurface เป็นจุดวิกฤตของการทำให้กระบวนการ bioremediation ในสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นได้สำเร็จ ใน unsaturated zone สารปนเปื้อนอยู่ได้ในสภาพที่แตกต่างกัน 4 ลักษณะ คือ 1) aqueous phase คือการละลายอยู่ในน้ำ 2) air phase คือเป็นไอในช่องอากาศ 3) adsorb phase คือแทรกอยู่ในชั้น subsurface ของของแข็ง และ 4) liquid phase คืออยู่ในลักษณะ non-aqueous phase liquid (NAPL) ซึ่งจะเคลื่อนที่ลงตามแนวตั้งจนกระทั่งความอึดตัวที่เหลือทำให้ค่าความเป็นของเหลวลดลงหรือจนกระทั่งถึงระดับ capillary fringe การแพร่กระจายของของเหลวจะปรากฏขึ้นจนกระทั่งการซึมทะลุของของเหลวถึงระดับน้ำ ไฮโดรคาร์บอนจะค่อย ๆ แพร่กระจายอย่างช้า ๆ และลอยอยู่บนผิวน้ำของการเกิดระเหิดจะเป็นการบีบการแพร่กระจายของ liquid เนื่องจากทำให้เกิดแรงบีบให้น้ำสูงขึ้น

การผันแปรของระดับน้ำอาจเนื่องมาจากความเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลซึ่งจะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ bulk liquid ใน subsurface ส่วนที่ละลายได้จะละลายจาก bulk liquid (ก้อนของเหลวหรือส่วนของของเหลวนั้น) เข้าไปในน้ำ และจะส่งถ่ายด้วยการเคลื่อนที่ของน้ำใต้ดินพวกไฮโดรคาร์บอนหนัก เช่น chlorinated จะซึมจมลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงระดับที่ไม่สามารถซึมผ่านได้

ความสามารถในการละลายของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมีค่าต่ำ ดังนั้นไฮโดรคาร์บอนจะถูกเชื่อมติดอยู่กับของแข็งและไม่อยู่ใน dissolved phase ดังนั้นในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของไฮโดรคาร์บอนปริมาณที่อยู่ในดินจึงมีความสำคัญต่อค่าความเข้มข้นในน้ำใต้ดิน จึงเป็นเรื่องที่ยากมากที่เราจะนำเอา PAHs เหล่านี้ให้อยู่ในสภาพ aqueous phase ซึ่งเป็น phase สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้แต่ synthetic surfactant ทำให้เกิดสภาพดังกล่าวได้ ดังที่กล่าวถึงในตอนต้น biosurfactant จะไม่เป็นประโยชน์แน่นอนถ้าสารประกอบที่ปนเปื้อนนั้นสามารถถูก degrade ได้โดยกระบวนการทางชีววิทยา ด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต biosurfactant และสามารถย่อยสลายสารประกอบพวก aromatic hydrocarbon ทั้งในแง่ของการดูดซึม PHAs ออกจากดินโดย biosurfactant และการ mineralization เพื่อการ oxidized end products สามารถทำให้บรรลุผลได้ Oberbremer *et al.* (1990) ได้แสดงให้เห็นถึงอัตราการเกิดการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่สามารถเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อมีการเติม sophorose liquids ซึ่งเป็น biosurfactant ใน model system ที่ประกอบด้วยดิน 10 เปอร์เซ็นต์ และ 1.35 เปอร์เซ็นต์ ของส่วนผสมของไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วย tetradecane, pentadecane, 1,2,4-trimethylcyclohexane, pristane phenyldecane และ naphthalene ที่แขวนลอยในอาหาร mineral salt medium โดย biosurfactant ที่เติมลงไปจะถูกย่อยสลาย หลังจากเริ่มย่อยบางส่วน ของไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบอยู่

Tsomides (1995) ศึกษาถึงผลของ nonionic surfactant ต่อการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในระบบดิน (soil-system) พบว่าความสามารถในการละลายของ PAHs สารประกอบพวกไม่ละลายน้ำจะเพิ่มขึ้นในระบบดินโดยการเติม nonionic surfactant ที่ความเข้มข้นที่มากเกินไปกว่าค่า CMCs อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ surfactant ที่เข้มข้นมากเกินไปกว่า CMC จะไปยับยั้งกระบวนการ PHA biodegradation ในการศึกษาถึง nonionic surfactant ทั้ง 7 ชนิด พบว่ามีเพียง Triton X-100 เท่านั้นที่ไม่ยับยั้งการเกิด mineralization ที่ความเข้มข้นมากกว่า

ค่า CMC phenanthrene ไม่ปรากฏจากดินอย่างสมบูรณ์หลังจากผ่านไป 9 วัน และ mineralization เกิดขึ้นกว่า 50 ถึง 65 เปอร์เซ็นต์ หลังจากผ่านไป 12 วัน และได้ศึกษาถึงผลของความแตกต่างของ nonionic surfactant ต่อการละลายและความเป็นประโยชน์ของ phenanthrene ความแตกต่างของ nonionic surfactant สามารถทำลาย phenanthrene ในระดับที่แตกต่างกัน และเพิ่มการใช้ประโยชน์ของ phenanthrene ในลำดับของการใช้ประโยชน์แม้ว่าจะไม่สัมพันธ์กับการเพิ่มความสามารถในการเพิ่มการละลายโดยสมบูรณ์ ซึ่งให้เห็นถึงผลของ surfactant ในทางสรีรวิทยาและทางฟิสิกส์เคมี

Edwards *et al.*, (1994) ได้ศึกษาถึง soil/aqueous system กับ hydrophobic organic compound (HOC) ในสภาวะที่มีและไม่มี surfactant ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า nonionic surfactant ซึมซับกับอินทรีย์วัตถุในดิน ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มสัดส่วนความสมดุลของปริมาณสารอินทรีย์ซึ่งมีแนวโน้มตามการเพิ่มปริมาณ HOC ที่ซึมซับจึงเป็นการเพิ่มค่า HOC soil/water partition coefficient ในขณะเดียวกัน free surfactant monomers ใน aqueous phase มีแนวโน้มลดการดูดซึม HOC โดยการเพิ่มความสามารถในการละลายอย่างชัดเจน ดังนั้นในระบบ soil-liquid-surfactant system มีความต้องการ surfactant มากกว่าระบบ liquid-surfactant system

Laha and Luthy (1991 and 1992) ศึกษาถึงการชะและการย่อยสลายทางชีวภาพของ phenanthrene ในน้ำและระบบดิน/น้ำ โดย nonionic surfactant ซึ่ง surfactant จะเพิ่มความสามารถการละลายของ phenanthrene ได้ดีแม้ว่าจะมีผลในการยับยั้งการย่อยสลายทางชีวภาพ

Deitsch and Smith, 1995 ; Aronstein *et al.*, 1991 พบว่า ดินที่มีความแตกต่างของสารอินทรีย์และ synthetic surfactant มีผลต่อการชะสารปนเปื้อนออกจากดินที่ความเข้มข้นต่ำของ surfactant monomers เริ่มรวมตัวกันและสร้างเป็นโครงสร้าง micelle เรียก admicelle หรือ hemimicelle แนวโน้มการสร้าง admicelle หรือ hemimicelle ขึ้นอยู่กับปฏิกริยาระหว่าง surfactant และผิวของดิน ความสามารถในการละลายในน้ำของ surfactant มีแนวโน้มต่ำในการดูดซับ

จากการรายงานของ Edwards *et al.* (1994) อธิบายว่าในสารละลาย CMC surfactant เพิ่มความสามารถการละลายของ HOC ได้เล็กน้อยและเปรียบเทียบกับปริมาณของ HOC ที่มาก

กว่าสามารถละลายใน micelle ที่สารละลายของ surfactant ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า CMC สามารถสรุปความแตกต่างได้ 3 ระบบ คือ ระบบดิน/น้ำ, ระบบดิน/น้ำ/surfactant ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า และระบบดิน/น้ำ/surfactant ที่เข้มข้นสูงกว่า CMC ที่จุดสมดุลของระบบดิน/น้ำ การดูดซับ HOC ถูกอธิบายโดยค่าสัมประสิทธิ์ของ K_d คืออัตราส่วนของจำนวนโมลของ HOC ที่ถูกดูดซับต่อกรัมของดินกับจำนวนโมลของ HOC ใน aqueous phase ต่อลิตรของสารละลาย

$$K_d = \left(\frac{n_{sorb}}{W_{soil}} \right) \left(\frac{V_{aq}}{n_{aq}} \right)$$

เมื่อ n_{sorb} = สมดุลจำนวนโมลของ HOC ที่ถูกดูดซับกับดิน

n_{aq} = สมดุลจำนวนโมลของ HOC ในสารละลาย

V_{aq} = ปริมาตรสารละลายน้ำ

W_{soil} = น้ำหนักของดิน

ที่ค่า CMC ต่ำการเติม surfactant ควรพิจารณาถึงระบบ two-phase ที่ CMC ค่า $K_{d,cmc}$ คืออัตราส่วนของจำนวนโมลของ HOC ที่ถูกดูดซับต่อกรัมของดินกับจำนวนโมลของ HOC ที่ถูกละลายต่อลิตรของสารละลาย monomeric ที่ CMC

$$K_{d,cmc} = \left(\frac{n_{sorb,cmc}}{W_{soil}} \right) \left(\frac{V_{aq}}{n_{aq,cmc}} \right)$$

เมื่อ $n_{aq,cmc}$ = สมดุลจำนวนโมลของ HOC ในสารละลาย surfactant ที่ CMC

$n_{sorb,cmc}$ = สมดุลจำนวนโมลของ HOC ที่ถูกดูดซับกับดินที่ surfactant ที่ CMC

เมื่อความเข้มข้นของ surfactant มากกว่า CMC ควรพิจารณาถึงระบบ three-phase สมดุลของการดูดซับ HOC ระหว่าง sorbed phase และ aqueous pseudophase ยังคงถูกแสดงค่าโดย $K_{d,cmc}$ สมดุลการกระจายของ HOC ระหว่าง micellar pseudophase และ aqueous

pseudophase ถูกแสดงค่าโดยค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ K_m คืออัตราส่วนของเศษส่วนของโมลของ HOC ใน micellar pseudophase และเศษส่วนของโมลของ HOC ใน aqueous pseudophase

$$K_m = \frac{X_m}{X_a}$$

เมื่อ X_m = เศษส่วนของ HOC ใน micellar pseudophase

X_a = เศษส่วนของ HOC ใน aqueous pseudophase

จากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการดูดซับของ surfactant ยังคงเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารอินทรีย์ในดินซึ่งมีผลต่อการดูดซับของ HOC

จากทฤษฎีค่า K_d ถูกคำนวณโดยใช้ค่าปรับแก้โดย Karickhoff *et al.*, 1979

$$K_d = K_{oc} * f_{oc} = (6.3 * 10^{-4}) K_{ow} f_{oc}$$

เมื่อ K_{oc} = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของ PAH ระบบดิน/น้ำ ที่มีสารอินทรีย์คาร์บอน

f_{oc} = เศษส่วนของน้ำหนักอินทรีย์คาร์บอนในดิน

K_{ow} = สัมประสิทธิ์การดูดซับของ PAH octanol/น้ำ

หากมีสารปนเปื้อนถูกดูดซับจากดินสารปนเปื้อนเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียสำหรับปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยเฉพาะ polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) ปัจจัยจำกัดอาจจะเป็นอัตราความสามารถของการละลายหรืออัตราการย่อยสลายขององค์ประกอบของน้ำหนักโมเลกุลที่ใหญ่

6. การนำสาร surfactant ไปใช้ประโยชน์

โรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันปิโตรเลียม สามารถนำสาร biosurfactant ไปใช้ในขบวนการกำจัดมลพิษจากน้ำมันได้ และสามารถนำ biosurfactant ที่ผลิตได้ไปใช้ในขบวนการ bioremediation ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งการใช้สาร biosurfactant ในขบวนการ soil bioremediation สามารถเพิ่มการละลายและอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ (Oberbremer *et al.*, 1990)

การใช้ surfactant ในขบวนการ soil remediation นั้นจะขึ้นอยู่กับ 2 กลไก คือ 1) การละลาย (solubilization) คือ การทำให้สารไฮโดรคาร์บอนที่ดูดซับบนอนุภาคดินบางส่วน กลายเป็นส่วน hydrophobic interior ของ surfactant micelles และ 2) การเคลื่อนที่ (mobilization) คือ การทำให้สารไฮโดรคาร์บอนหลุดออกจากอนุภาคดิน ซึ่งประสิทธิภาพของขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของ surfactant ที่จะลดแรงตึงระหว่างผิว และในขบวนการ oil recovery ระยะที่ 1 และ 2 ซึ่งใช้น้ำและความดันในขบวนการสามารถนำน้ำมันกลับได้เพียง 20 – 40 % เท่านั้น แต่เมื่อมีการใช้สาร surfactant ในระยะที่ 3 คือระยะ enhanced oil recovery จะสามารถนำน้ำมันกลับได้ 40 – 80% โดยกลไกที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพในขบวนการ oil recovery คือ การเคลื่อนที่ ซึ่งสามารถนำหลักการนี้มาใช้ในการชะล้าง (washing) ดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic organic compounds) และมีค่าการละลายต่ำ ทำให้มีการเคลื่อนที่ได้ต่ำในสิ่งแวดล้อม (Peter *et al.*, 1992)

ปัจจุบันอุตสาหกรรมหลายประเภทมีการนำสาร biosurfactant มาใช้ประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นโรงงานอุตสาหกรรมด้านอาหาร อุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมสิ่งทอ หรือในด้านเกษตรกรรม ซึ่งมีรายละเอียดดังตารางที่ 3 (Kosaric *et al.*, 1987)

ตารางที่ 3 การใช้ surfactant ในอุตสาหกรรม (Kosaric et al., 1987)

ประเภทอุตสาหกรรม	ประโยชน์ของ surfactant
น้ำมันปิโตรเลียม	
การเจาะน้ำมัน	ทำให้เกิด emulsion ของน้ำมัน เกิดการกระจายตัวของของแข็งได้ดี
บ่อน้ำมัน	ทำให้เกิด emulsion และกระจายตัวของ sludge และตะกอน ทำให้สามารถกำจัดออกจากบ่อน้ำมันได้ และสามารถยับยั้งการกัดกร่อนเครื่องมือได้
ผลิตภัณฑ์	ช่วยชะล้าง sludge ออกได้ และทำให้น้ำมันเชื้อเพลิง crane – case oil และ turbine oil ไม่เกิดการกัดกร่อน
อาหารและเครื่องดื่ม	
กระบวนการผลิตผลไม้และผัก	สำหรับทำความสะอาด ทำให้การล้างยาฆ่าแมลงและ wax ได้ดีขึ้น
การตกผลึกของน้ำตาล	ลดระยะเวลากระบวนการผลิต
ไขมันและน้ำมัน	ป้องกันการกระเด็น เนื่องจากความร้อนสูงและน้ำ
เกษตรกรรม	
ปุ๋ยฟอสเฟต	ป้องกันการเกิดตะกอนระหว่างการเก็บ ทำให้ปุ๋ยอยู่ในสภาพของเหลวได้
การใช้ฉีดพ่น	เกิดการกระจายตัวได้ดี เกิดการละลายและทำให้เกิด emulsion ของยาฆ่าแมลงในสารละลาย ส่งผลให้การแทรกซึมสู่ศัตรูพืชดีขึ้น
ผลิตภัณฑ์หนังฟอก	
หนังสัตว์	เป็นสารชะล้างและเป็น emulsifier ในการกำจัดไขมันสัตว์
การฟอกหนัง	ทำให้เปียกและเกิดการแทรกซึมได้ดี
การย้อมสี	ทำให้เปียกและเกิดการแทรกซึมได้ดี

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ประเภทอุตสาหกรรม	ประโยชน์ของ surfactant
สิ่งทอ	
การเตรียมเส้นใย	เป็นสารที่ใช้ล้างวัตถุดิบ
การย้อมสีและพิมพ์	ทำให้เกิดการแทรกซึม เกิดการละลายและทำให้สี ย้อมติดสม่ำเสมอ
สีและสารเคลือบผิว	
การเตรียมสี	ทำให้สีกระจายตัวในขณะที่ถูกบด
สี latex	เกิดการกระจายตัวของสี ชะลอการตกตะกอนและ การแยกตัวของสี
Wax	ทำให้เกิด emulsion ได้ดีขึ้น

7. การศึกษาสาร surfactant เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ในการจัดการสิ่งแวดล้อม

การใช้สาร biosurfactant ในขบวนการ soil bioremediation สามารถเพิ่มการละลายและอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ โดย Oberbremer *et al.*, (1990) พบว่า อัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในระบบที่ประกอบด้วยดิน 10% และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (tetradecane, pentadecane, 1,2,4-trimethylcyclohexane, pristane, phenyldecane และ naphthalene ผสมใน mineral salt medium) 1.35% และจากการศึกษาของ Aronstein *et al.* (1991) ทำการศึกษาโดยใช้สาร surfactant ที่มีค่าความเข้มข้นต่ำ (ต่ำกว่าระดับ CMC) เพื่อย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกที่ดูดซับกับอนุภาคดิน ผลการศึกษาพบว่า biosurfactant ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในขบวนการย่อยสลายได้

Banat *et al.* (1991) ศึกษาความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant จาก proprietary bacterial strain (Pet 1006) พบว่า สามารถผลิตได้ดีเมื่อเจริญในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่าแรงตึงผิวมีค่า 49.0 mN/m หลังจาก 14 ชั่วโมง จะเติมแหล่ง คาร์บอนเสริมลงไปอีก พบว่า ทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเป็น 33.2 mN/m แสดงว่า เชื้อนี้สามารถที่ จะผลิตสาร biosurfactant เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับแหล่งคาร์บอนเสริม และเมื่อทดสอบความสามารถใน การกำจัดคราบน้ำมันของ Pet 1006 นี้ พบว่า สามารถกำจัดคราบน้ำมันได้ดี และสามารถดึงสาร ประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากน้ำมันได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

Laha and Luthy (1991) ศึกษาผลของ nonionic surfactant 3 ชนิด ในการ desorb และย่อยสลาย [¹⁴C] phenanthrene ในถังปฏิกริยา พบว่าประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการ desorb สาร phenanthrene จะเกิดขึ้นเมื่อ surfactant มีความเข้มข้นที่ระดับ CMC แต่ที่ความ เข้มข้นระดับนี้การย่อยสลายทางชีวภาพของสาร phenanthrene จะถูกยับยั้ง ซึ่งสรุปว่าการ ยับยั้งการย่อยสลายทางชีวภาพนี้มีสาเหตุจากปฏิกริยาของ nonionic surfactant ต่อโปรตีนใน เยื่อหุ้มเซลล์หรือผลของการแก่งแย่งระหว่าง surfactant กับ phenanthrene เพื่อที่จะเป็นแหล่ง อาหารของ จุลินทรีย์ และ Laha and Luthy (1992) ทำการทดลองเพื่อหาสาเหตุที่แท้จริงของ การยับยั้งการย่อยสลายของ phenanthrene พบว่า nonionic surfactant มีผลในการยับยั้งการ ย่อยสลายสาร phenanthrene ซึ่งสาเหตุของการยับยั้งขบวนการย่อยสลายคาดว่าจุลินทรีย์ สามารถใช้ surfactant เป็นแหล่งอาหารได้ง่ายกว่า phenanthrene

Peter *et al.* (1992) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสาร surfactant 22 ชนิด ในการ เคลื่อนย้าย (mobilizing) น้ำมันดีเซลจากดินที่มีการปนเปื้อนก่อนเข้าสู่ขบวนการ bioremediation พบว่า สาร ionic surfactant มีผลทำให้มีการละลาย (solubilization) น้ำมันดีเซลเป็นจำนวนมาก ในขณะที่สาร anionic surfactant จะทำให้เกิดประจุลบที่ผิวของหยดน้ำมัน ซึ่งจะถูกผลักออกจาก อนุภาคดิน ซึ่งเป็นการเพิ่มการเคลื่อนที่ของน้ำมันเช่นเดียวกัน

Tsomides *et al.* (1995) มีการศึกษา nonionic surfactant ที่มีต่อการละลาย ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดิน พบว่า สาร PAHs และสารประกอบ hydrophobic ชนิด อื่น ๆ จะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นถ้าใช้ nonionic surfactant ที่มีความเข้มข้นมากกว่าระดับ CMC ถึงแม้ว่า nonionic surfactant ที่มีค่าสูงกว่าระดับ CMC จะมีผลในการยับยั้งขบวนการย่อยสลาย

ทางชีวภาพของสาร PAHs อย่างไรก็ตามจากการศึกษา nonionic surfactant 7 ชนิด พบว่า triton X 100 เพียงชนิดเดียวที่ไม่ยับยั้งขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของ phenanthrene โดย phenanthrene จะถูกดึงออกจากดิน 100% หลังจาก 9 วัน และสามารถย่อยสลายได้ 50-60% หลังจาก 12 วัน

Bangkoh *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาลิตสาร biosurfactant ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2.2 ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักและสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส ทำให้มีค่าแรงตึงผิว 40.2 mN/m โดยเจือจาง 100 เท่า และจากการศึกษาโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ได้จากการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย และข้าวสาลี พบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถทำให้มีค่าแรงตึงผิวใกล้เคียงกับกลูโคส คือ 44.8 mN/m หลังจากนั้นนำมาทดสอบเพื่อยืนยันผลโดยการควบคุมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน(กลูโคสและแอมโมเนียมไนเตรท) และใช้ 75 mM Tris buffer, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อนำมาวัดค่าแรงตึงผิวมีค่าเท่ากับ 39.3 mN/m

Carrillo *et al.* (1996) ศึกษาการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสาร biosurfactant โดยวิธีย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่าจากทั้งหมด 492 สายพันธุ์ มีเพียง 37 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนี หลังจากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อจาก 459 สายพันธุ์ที่ไม่เกิดสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมา 49 สายพันธุ์ร่วมกับเชื้อ 37 สายพันธุ์ในตอนแรก มาทดสอบความสามารถในการลดแรงตึงผิว พบว่า มี 5 สายพันธุ์ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (ต่ำกว่า 40 mN/m) ซึ่งเชื้อเหล่านี้มาจาก 37 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้

Niran *et al.* (1996) ศึกษาความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อ *Bacillus* sp. KP-2 ซึ่งแยกได้จากอาหารหมัก พบว่า สาร biosurfactant ที่ผลิตได้นั้นจะมี surface activity คงที่ในช่วง pH 6.0-10.0 และมีค่าสูงสุดที่ pH 6.0 ส่วนความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ อยู่ในช่วง 3-8 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิช่วง 25-121 องศาเซลเซียส และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการลดแรงตึงผิวของ *Bacillus* sp. KP-2 และค่า CMC กับ synthetic surfactant เท่ากับ 35 mg/l และ 35 mN/m ตามลำดับ

Sood (1997) ศึกษาการผลิต biosurfactant โดย *Nocardia amarae* และผลต่อการดูดซับของ phenanthrene ในดิน พบว่าการใช้ synthetic surfactant เพื่อดูดซับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจากดิน โดยการดูดซับจะให้ผลสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ surfactant มีมากเกินกว่าระดับ CMC อย่างไรก็ตาม ที่ระดับความเข้มข้นนี้จะมีผลยับยั้งแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ โดยกระบวนการ biodegradation ซึ่ง biosurfactant เป็น surfactant ชนิดหนึ่งที่ผลิตโดยจุลินทรีย์และสามารถใช้แทน synthetic surfactant หรือการดูดซับดินที่มีการปนเปื้อนโดยไม่ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ดิน ในการศึกษานี้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ของ *Nocardia amarae* (เป็นแบคทีเรียที่พบในกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยใช้อากาศทั่วไป) จะถูกนำมาศึกษาโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน อิทธิพลของ biosurfactant ซึ่งถูกผลิตโดย *Nocardia amarae* ต่อการดูดซับ polyaromatic hydrocarbon (phenanthrene ซึ่งมีความสามารถในการละลายต่ำประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในดิน โดยจะศึกษาถึงปริมาณสารอินทรีย์ในระดับต่าง ๆ ในการศึกษานี้ใช้แหล่งคาร์บอน 3 แหล่ง ได้แก่ โซเดียมอะซิเตต, เฮกซะเดคเคน และ สารผสมระหว่างโซเดียมอะซิเตตกับเฮกซะเดคเคนจะถูกใช้เป็นสับสเตรทเพื่อศึกษาการผลิต biosurfactant ของ *Nocardia amarae* โดย *Nocardia amarae* สามารถผลิต biosurfactant ได้สูงสุดใน 11 – 12 วัน ของการเพาะเลี้ยง โดยค่าแรงตึงผิวจะมีค่าต่ำสุดที่อายุการเพาะเลี้ยง 6 – 7 วัน หรือเมื่อ *Nocardia amarae* เข้าสู่ระยะ stationary growth phase ค่าแรงตึงผิวของสารละลายของอาหารเลี้ยงเชื้อลิสระ เท่ากับ 52 mN/m ในกรณีที่ใช้ acetate เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ค่าแรงตึงผิวมีค่าเท่ากับ 39 mN/m เมื่อใช้ hexadecane หรือ ส่วนผสมระหว่าง เฮกซะเดคเคน และ อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนการผลิต biosurfactant จะมีค่าเป็น 4 เท่าของค่า CMC เมื่อใช้ เฮกซะเดคเคน 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้ามีการใช้เฮกซะเดคเคน 2 เปอร์เซ็นต์ และ อะซิเตต 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน การผลิต biosurfactant จะมีค่าเท่ากับ 5 เท่าของ CMC โดยอัตราการเติบโตและการผลิต biosurfactant เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วใน 1 – 2 วันของการเลี้ยงเชื้อในกรณีที่ใช้อะซิเตตและเฮกซะเดคเคน (ผสม) เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้ามีการใช้ biosurfactant เป็นแหล่งคาร์บอน *Nocardia amarae* ต้องการเกลือแร่ร่วมด้วย ซึ่งพบว่าสามารถเกิด biodegradation ได้ (ในแง่ของ COD) ค่า COD เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 900 มิลลิกรัมต่อลิตร และจะมีค่าลดลงเหลือ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ช่วงปลายของระยะ log phase ของการเจริญ และความเข้มข้นของมวลชีวภาพจะเพิ่มจาก 400 mgTSS/l เป็นประมาณ 1200 mgTSS/l ซึ่งแสดงให้เห็นว่า COD ไม่ใช่ดัชนีที่ดีสำหรับการบ่งชี้ biosurfactant ดินที่มีระดับสารอินทรีย์ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 6.9, 9.1 และ 19.2 เปอร์เซ็นต์ จะถูกใช้สำหรับการศึกษาถึงอิทธิพลของ

biosurfactant ต่อการดูดซับของ phenanthrene ในดิน พบว่า biosurfactant จะมีผลสูงสุดใน การการดูดซับ phenanthrene ในดินในระดับที่สูงกว่าค่า CMC ในสภาวะที่มี biosurfactant ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของ phenanthrene จะถูกเปลี่ยนรูปเป็นของเหลวในระบบดินที่มีสมดุล น้ำกับปริมาณสารอินทรีย์ 6.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ระบบดินที่มีปริมาณสารอินทรีย์ 19.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ phenanthrene 44 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเปลี่ยนเป็น aqueous phase ในสภาวะที่ ไม่มี biosurfactant ผลของระบบดินที่ใช้ทดสอบไม่แตกต่างกัน ในกรณีนี้มีเพียง 23 เปอร์เซ็นต์ ของการดูดซับ phenanthrene ทั้งหมดที่ละลายไปกับน้ำกลั่น

David *et al.* (1997) ศึกษาผลกระทบของ rhamnolipid (biosurfactant) ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ยึดติดอยู่ในช่องว่างระหว่างเม็ดทราย การทดลองทำใน sand-packed columns ภายใต้สภาวะการไหลที่อิ่มตัวของเฮกซะเดคเคน (สารประกอบไฮโดรคาร์บอน) พบว่า ความเข้มข้นของ biosurfactant ที่มากกว่าระดับ CMC มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเฮกซะเดคเคนที่อยู่ในทราย และในทางตรงกันข้าม ถ้าความเข้มข้นของ biosurfactant ต่ำกว่าระดับ CMC จะมีผลต่อขบวนการ mineralization ของเฮกซะเดคเคนที่ยึดติดอยู่ในช่องว่างระหว่างเม็ดทราย อย่างไรก็ตามขบวนการนี้ยังขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียด้วย

Pruthi and Cameotra (1997a) ได้ทำการแยกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการเป็นอิมัลชัน และมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดย *Serratia marcescens* MTCC 86 ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ปริมาณสาร biosurfactant ในช่วงปลาย log phase จะเพิ่มขึ้น แต่จะให้ค่าแรงตึงผิวลดลง แสดงว่าสาร biosurfactant เป็นสารทุติยภูมิของจุลินทรีย์ และยังพบว่า biosurfactant ที่ผลิตได้เป็นอิมัลชันที่คงตัวในแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ซึ่งสาร biosurfactant ที่เชื่อนี้ผลิตขึ้นมานั้นจะมีประสิทธิภาพในกระบวนการ enhanced oil recovery ที่อุณหภูมิช่วง 10-120 องศาเซลเซียส

Pruthi and Cameotra (1997b) ได้ทำการแยกเชื้อที่สามารถผลิตสาร biosurfactant ที่ผลิตโดย *Arthrobacter protophormiae* MTCC 86 ซึ่งมีเฮกซะเดคเคน เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสาร biosurfactant ที่ผลิตได้สามารถลดค่าแรงตึงผิวจาก 68.0 mN/m เป็น 30.6 mN/m ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถที่เจริญและผลิตสาร biosurfactant ได้ดีในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์สูง (10.0 - 100.0 กรัมต่อลิตร)

Ivshina et al. (1998) ได้ทำการศึกษาการผลิต biosurfactant โดย *Rhodococcus* 10 สายพันธุ์ 4 สปีชีส์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฮกซะเดคเคน หรือ n-alkane เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Rhodococcus ruber* IEGM AC 219 สามารถผลิตสาร biosurfactant ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์อีมีลชัน 62.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าแรงตึงผิว 27 mN/m และค่าแรงตึงผิวรวม 1.6 mN/m เมื่อทำการศึกษาถึงกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ พบว่ากลุ่มที่มีการเติม *Rhodococcus ruber* IEGM AC 219 ซึ่งผลิตสาร biosurfactant complex ลงไปในระบบจะมีอัตราการสลายคราบน้ำมันได้ดีในช่วง 3 เดือนแรก

Wang and Vipulanandan (1998) ได้ศึกษาผลิตสาร biosurfactant จากของเสีย โดยใช้ *Flavobacterium* sp. ซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างน้ำมันที่ใช้แล้ว พบว่าสามารถผลิตสาร biosurfactant ที่ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำกว่า 29 mN/m และสามารถเพิ่มค่าการละลายของ naphthalene จาก 35 เป็น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

Strevett et al. (2001) ศึกษาถึงการสลาย toluene ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจนของการผลิต biosurfactant โดยจุลินทรีย์ ผลจากการศึกษาพบว่า ในสภาวะที่มีออกซิเจน การผลิต biosurfactant ชนิด rhamnolipid สามารถลดปริมาณ toluene มีผลทำให้สามารถลดแรงตึงผิวจาก 69 mN/m เป็น 42 mN/m ซึ่งจะถูกระบุเปรียบเทียบกับการผลิต biosurfactant โดยจุลินทรีย์ซึ่งไม่มีความสามารถในการผลิต biosurfactant แต่ถูกเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมมีผลให้สามารถลดค่าแรงตึงผิวจาก 69 mN/m เป็น 65 mN/m ในสภาวะที่ไม่มี toluene biosurfactant ที่ถูกผลิตขึ้นสามารถลดค่าแรงตึงผิวจาก 72 mN/m เป็น 25 mN/m ที่ค่า CMC 19 มิลลิกรัมต่อลิตร

8. คุณสมบัติทั่วไปของดินที่ใช้ในการทดลอง

ชุดดินน้ำพอง (Ustoxic Quartzipsamments) เป็นดินในอันดับเอนติโซลส์ที่มีการระบายน้ำดีและประกอบด้วยทรายควอร์ตซ์เป็นส่วนใหญ่ ดินอาจออกสีขาว หรืออาจจะออกสีน้ำตาลเหลือง หรือแดง และพบในบริเวณผิวหน้าสภาพภูมิประเทศที่เกิดในอนุยุคโพลสโตซีนหรืออายุน้อยกว่าในบางบริเวณอาจจะพบชั้นสเปคตติกในหน้าตัดดิน แต่อยู่ลึกมาก ลักษณะสำคัญก็คือภายในระดับความลึก 2 เมตร เม็ดทรายควอร์ตซ์จะต้องไม่มีการเคลือบ ส่วนที่เป็นทรายของดินอย่างน้อยร้อยละ 95 เป็นแร่ควอร์ตซ์ เซอร์คอน ทัวร์มา린 รูไทล์ หรือแร่ที่คงทนต่อการสลายตัวอื่น ๆ ที่สลายตัวแล้ว จะปลดปล่อยเหล็กและอลูมิเนียมออกมา ดินชนิดนี้จะมีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างต่ำ ต้องมีการเติมปุ๋ยอินทรีย์ในการเกษตรกรรม ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ปุ๋ยอ้อย และมันสำปะหลัง (เอิบ, 2533)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดิน

1.1 ตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณบึงน้ำมัน 6 แห่ง ฟาร์มปศุสัตว์ 3 แห่ง พื้นที่เกษตรกรรม 3 แห่ง ร้านอาหาร 3 แห่ง ตลาดสด 2 แห่ง และบ่อน้ำบาดาลเสีย 1 แห่ง

1.2 ตัวอย่างดินสำหรับทดสอบการดูดซับน้ำมัน

ดินขุดน้ำพอง ขนาดเม็ดดินเล็กกว่า 2 มิลลิเมตร

2. อาหารที่ใช้แยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

2.1 Blood agar base

2.2 Mineral salt glucose (MSG)

2.3 Mineral salt medium (MSM)

2.4 Nutrient agar (NA)

2.5 Nutrient broth (NB)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวัดความสามารถการผลิตสาร biosurfactant

3.1.1 Tris buffer, pH 8.0

3.1.2 Xylene

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

3.2.1 Acetone alcohol

3.2.2 Bromothymol blue 0.2%

3.2.3 Bromocresol purple

3.2.4 Crystal violet

3.2.5 Gram iodine

3.2.6 Kovac' s reagent

3.2.7 Safranin

3.3 สารเคมีที่ใช้จำแนกชนิด biosurfactant

- 3.3.1 Sodium carbonate
- 3.3.2 Sodium hydroxide
- 3.3.3 Copper sulphate
- 3.3.4 Sodium potassium tartrate
- 3.3.5 Bovine serum albumin
- 3.3.6 3,5 dinitrosalicylic acid solution
- 3.3.7 Sulfuric acid
- 3.3.8 Phenol solution (5 %)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบหาปริมาณน้ำมัน

- 3.4.1 Sulfuric acid
- 3.4.2 Trichlorotrifluoroethane
- 3.4.3 Sodium sulphate anhydrous crystal

4. เครื่องมือ

- 4.1 กล้องจุลทรรศน์
- 4.2 เครื่องเขย่า
- 4.3 เครื่องเติมอากาศ
- 4.4 ตู้บ่มเชื้อ
- 4.5 ตู้อบ
- 4.6 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 4.7 เครื่องชั่งอย่างละเอียด
- 4.8 เครื่องชั่งอย่างหยาบ
- 4.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 4.10 ตู้เก็บสารเคมี
- 4.11 เทอร์โมมิเตอร์
- 4.12 หม้อนิ่งความดันไอ
- 4.13 เครื่องวัดแรงดึงผิว
- 4.14 กรวยแยกพร้อมจุกเทฟลอน

- 4.15 เครื่องดูดอากาศ
- 4.16 เครื่องอังน้ำ
- 4.17 ชุดกลั่น

5. อุปกรณ์อื่น ๆ

- 5.1 กระจกตวง
- 5.2 ขวดปรับปริมาตร
- 5.3 ขวดรูปชมพู่
- 5.4 หลอดทดลอง
- 5.5 Pasteur pipette
- 5.6 ปิเปต
- 5.7 บีกเกอร์
- 5.8 ไมโครปิเปต
- 5.9 ห่วงถ่ายเชื้อ
- 5.10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 5.11 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ
- 5.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 5.13 กระดาษกรอง (Whatman NO. 40) เส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร

วิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดิน จำนวน 1 กรัม มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ (NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์) ตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-6} หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มา spread ลงบนอาหาร MSG แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วเก็บโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์แล้วเก็บใน NA slant เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสาร biosurfactant เบื้องต้นโดยวิธี blood haemolysis

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในขั้นตอนแรก มา streak ลงบนอาหาร blood agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วสังเกตการเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ หากเกิดโซนใสขึ้น แสดงว่าเชื่อนั้นสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ผลการทดสอบเป็นบวก

3. การประเมินความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี xylene emulsification assay

นำเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง มาเลี้ยงในอาหาร MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 แหล่ง คือ กลูโคส กลิเซอรอล และเฮกซะเดคเคน แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดเชื้อที่ได้มา 35 ไมโครลิตร เติมน้ำลงในหลอดที่มี 20 mM Tris buffer, pH 8.0 อยู่ปริมาตร 35 ไมโครลิตร แล้วเติม xylene ปริมาณ 35 ไมโครลิตร ลงไปที่ผิวหน้า หลังจากนั้นให้ใช้ pasture pipette จุ่มลงไปก้นหลอดเพื่อเติมอากาศให้แก่สารละลาย ปริมาตร 2 ลิตรต่อนาที เวลา 45 วินาที เพื่อให้สารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ก่อนที่จะนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

4. การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant โดยเครื่อง Face Surface Tensiometer

นำเชื้อที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาถ่ายลงในอาหารสูตร MSM ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 3 แหล่ง คือ กลูโคส, กลิเซอรอล และเฮกซะเดคเคน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่าแรงตึงผิว

5. การศึกษาช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตและการผลิตสาร biosurfactant

นำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร NB นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาถ่ายลงในอาหารสูตร MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซนต์ ที่ต่างกัน 3 แหล่งคือ กลูโคส, กลิเซอรอล และเฮกซะเดคเคน แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อทำ colony plate count แล้วนำตัวอย่างที่เหลือมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่าแรงตึงผิว

6. การจำแนกชนิดของสาร biosurfactant

โดยวิธี Lowry method , Phenol sulfuric total sugar และ Phosphorus ascorbic acid method

7. การศึกษาผลของสาร biosurfactant ต่อการดูดซับน้ำมันในดิน

นำตัวอย่างดินชุดดินน้ำพอง ขนาดเม็ดดินเล็กกว่า 2 มิลลิเมตร ที่มีระดับปริมาณอินทรีย์วัตถุต่างกันคือ 0.01, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0 เปอร์เซนต์โดยปุ๋ยหมัก ปริมาณ 5 กรัม ผสมกับสารละลาย biosurfactant 5 มิลลิลิตร และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา

24 ชั่วโมง นำสารละลายดังกล่าวไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนไขมันมาทดสอบหาความเข้มข้นของน้ำมัน โดยวิธีการสกัดด้วยกรวยสำหรับแยก (Separatory Funnel Extraction)

8. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา โดยใช้หลักของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition (Holt *et al.*, 1994)



สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

1. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
2. ภาควิชาทรัพยากรดินและสิ่งแวดล้อม คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือนกันยายน 2543

สิ้นสุดการทดลอง เดือนสิงหาคม 2545

รวมระยะเวลาการศึกษา 24 เดือน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

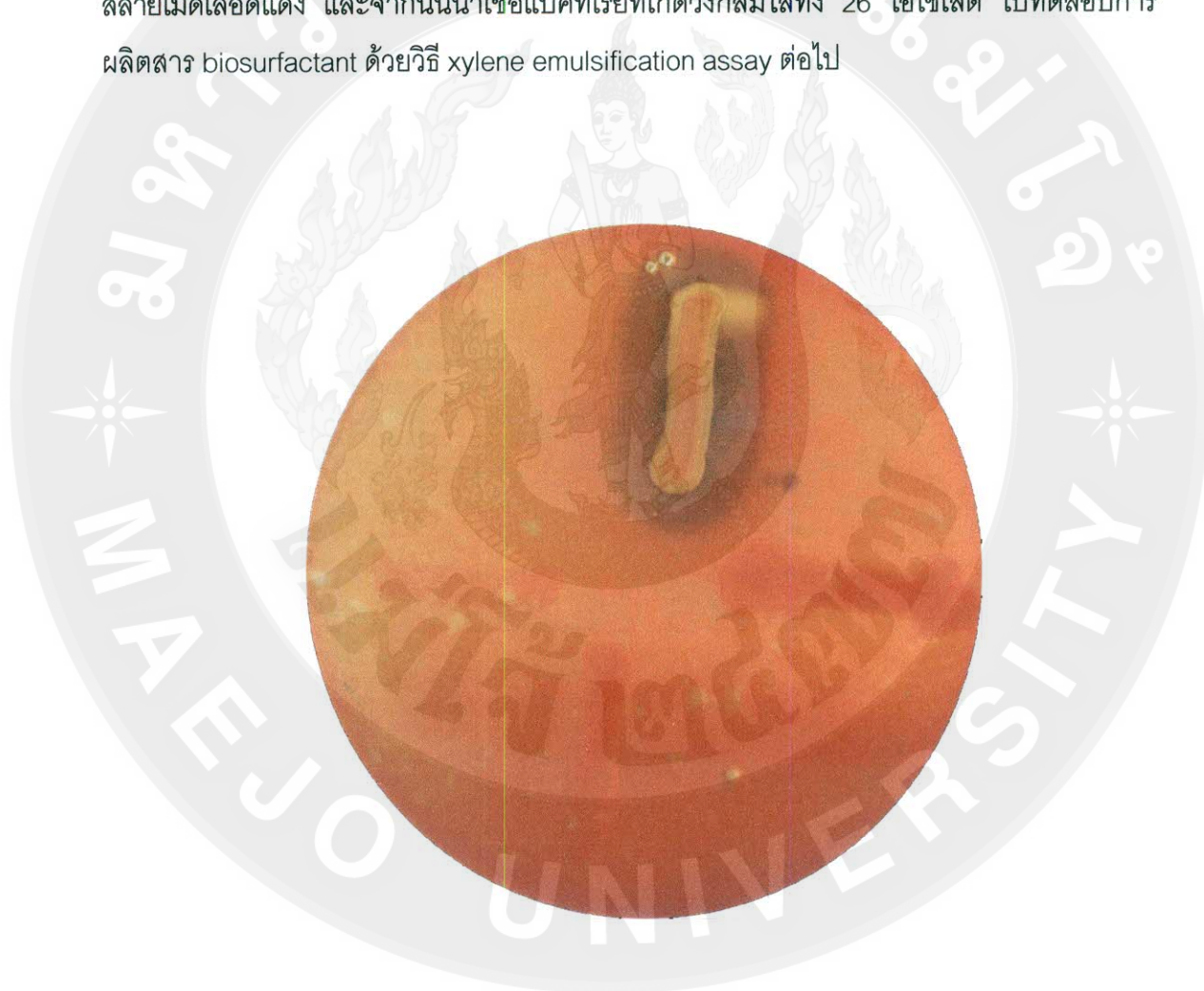
การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน 18 ตัวอย่าง บนอาหาร Kenknight and Munaier's medium พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 206 ไอโซเลต โดยตัวอย่างแต่ละชนิดจะให้จำนวนไอโซเลตที่แตกต่างกัน เนื่องจากมาจากแหล่งที่แตกต่างกันและมีการให้รหัสชื่อ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แหล่งของตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

ตัวอย่างดิน	รหัสชื่อ	จำนวนไอโซเลต
บิมน้ำมัน 1	BS ₁ B ₁ – BS ₁ B ₁₈	18
บิมน้ำมัน 2	BS ₂ B ₁ – BS ₂ B ₅	5
บิมน้ำมัน 3	BS ₃ B ₁ – BS ₃ B ₂₅	25
บิมน้ำมัน 4	BS ₄ B ₁ – BS ₄ B ₁₄	14
บิมน้ำมัน 5	BS ₅ B ₁ – BS ₅ B ₉	9
บิมน้ำมัน 6	BS ₆ B ₁ – BS ₆ B ₈	8
ฟาร์มไก่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	BS ₇ B ₁ – BS ₇ B ₅	5
บ่อบำบัดน้ำเสีย มหาวิทยาลัยแม่โจ้	BS ₈ B ₁ – BS ₈ B ₆	6
ฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยแม่โจ้	BS ₉ B ₁ – BS ₉ B ₁₆	16
ฟาร์มสุกร มหาวิทยาลัยแม่โจ้	BS ₁₀ B ₁ – BS ₁₀ B ₁₈	18
สกว. 29 K 200	BS ₁₁ B ₁ – BS ₁₁ B ₁₂	12
สกว. 29 Na 100	BS ₁₂ B ₁ – BS ₁₂ B ₂₂	22
สกว. 29 Na 200	BS ₁₃ B ₁ – BS ₁₃ B ₁₂	12
ตลาดหนองจอก จ. ลำพูน	BS ₁₄ B ₁ – BS ₁₄ B ₆	6
ตลาดสันป่าฝ้าย จ. ลำพูน	BS ₁₅ B ₁ – BS ₁₅ B ₉	9
ร้านอาหารซุ้มใบคา	BS ₁₆ B ₁ – BS ₁₆ B ₁₂	12
ร้านอาหารแดง	BS ₁₇ B ₁ – BS ₁₇ B ₅	5
โรงอาหารมหาวิทยาลัยแม่โจ้	BS ₁₈ B ₁ – BS ₁₈ B ₄	4
	รวม	206

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสาร biosurfactant เบื้องต้นโดยวิธี blood haemolysis

จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดิน จำนวน 206 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยเลี้ยงในอาหาร blood agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้มีจำนวน 26 ไอโซเลต ดังภาพที่ 9 ซึ่ง Carrillo *et al.* (1996) ได้รายงานไว้ว่า ความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ในอาหารมีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เกิดวงกลมใสทั้ง 26 ไอโซเลต ไปทดสอบการผลิตสาร biosurfactant ด้วยวิธี xylene emulsification assay ต่อไป



ภาพที่ 9 วงใสที่เกิดจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบบน blood agar

3. การประเมินความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี xylene emulsification assay

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 26 ไอโซเลต ที่ให้ผลเป็นบวกในการทดสอบด้วยวิธี blood agar มาทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 3 แหล่ง คือ กลูโคส, กลีเซอรอล และเฮกซะเดคเคน (2 เปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธี xylene emulsification assay พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 26 ไอโซเลต ให้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ดังตารางที่ 5 ซึ่งจากการศึกษาของ Banat *et al.* (1991) โดยใช้วิธี xylene emulsification assay เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับปริมาณสารลดแรงตึงผิว พบว่า ถ้าค่าการดูดกลืนแสงยิ่งมากและมีระดับการกระจายตัวใน xylene สูง จะมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวอยู่สูงและในทางกลับกัน หากค่าการดูดกลืนแสงต่ำก็จะมีปริมาณของสารลดแรงตึงผิวอยู่ในระดับต่ำเช่นกัน

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 26 ไอโซเลต เมื่อทดสอบโดยวิธี xylene emulsification assay

รหัสเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร		
	แหล่งคาร์บอน		
	กลูโคส	กลีเซอรอล	เฮกซะเดคเคน
BS ₁ B ₂	0.023	0.012	0.016
BS ₁ B ₁₅	0.019	0.070	0.023
BS ₁ B ₂₄	0.060	0.090	0.025
BS ₃ B ₁₃	0.021	0.017	0.018
BS ₄ B ₂	0.039	0.011	0.016
BS ₄ B ₇	0.011	0.010	0.021
BS ₆ B ₄	0.024	0.006	0.022
BS ₆ B ₆	0.010	0.007	0.006
BS ₇ B ₁	0.013	0.004	0.004
BS ₇ B ₅	0.020	0.014	0.013
BS ₉ B ₈	0.015	0.010	0.022
BS ₁₀ B ₇	0.019	0.006	0.023

ตารางที่ 5 (ต่อ)

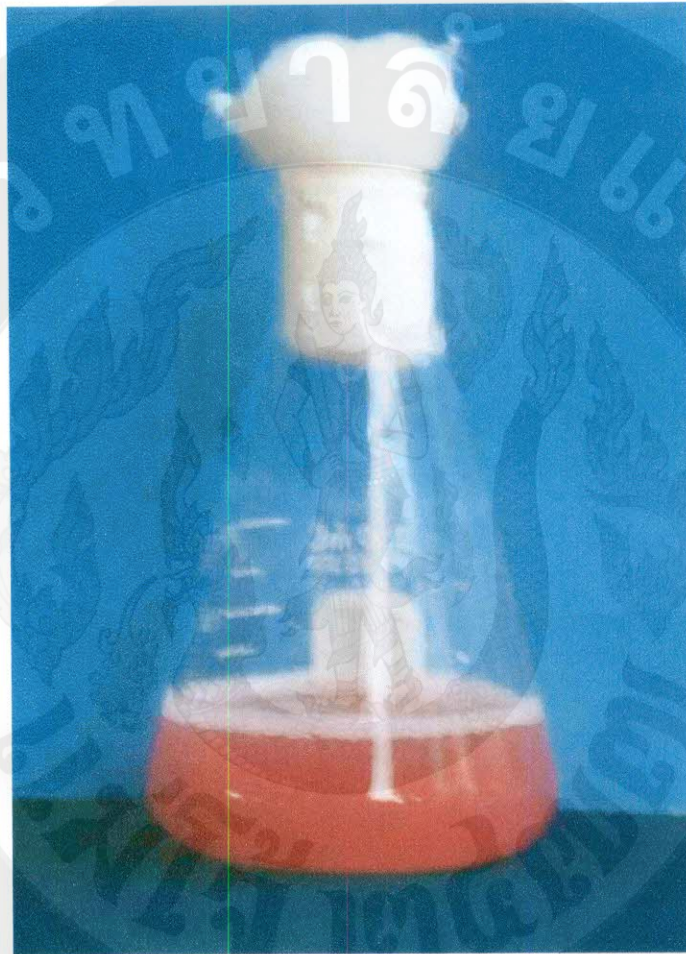
รหัสเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร		
	แหล่งคาร์บอน		
	กลูโคส	กลีเซอรอล	เฮกซะเดกเคน
BS ₁₁ B ₁	0.039	0.056	0.057
BS ₁₁ B ₄	0.131	0.058	0.073
BS ₁₁ B ₈	0.042	0.049	0.055
BS ₁₂ B ₇	0.153	0.038	0.054
BS ₁₂ B ₁₇	0.044	0.030	0.057
BS ₁₃ B ₁₂	0.054	0.087	0.029
BS ₁₄ B ₁	0.180	0.080	0.055
BS ₁₄ B ₃	0.090	0.032	0.079
BS ₁₅ B ₃	0.058	0.043	0.024
BS ₁₅ B ₄	0.065	0.046	0.045
BS ₁₅ B ₅	0.037	0.045	0.060
BS ₁₆ B ₁	0.076	0.123	0.040
BS ₁₆ B ₂	0.061	0.053	0.036
BS ₁₈ B ₁	0.028	0.067	0.111

จากการทดลองของ Banat *et al.* (1991) โดยใช้วิธี xylene emulsification assay เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับค่าแรงตึงผิว พบว่า ถ้าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น หมายถึงการ emulsion เกิดมากขึ้น ค่าแรงตึงผิวจะลดลง นั่นหมายถึงการผลิต biosurfactant ปริมาณมาก

จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ให้ค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มากกว่า 0.1 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ดังนี้ $BS_{11}B_4$ สามารถให้ค่าการดูดกลืนแสงได้ดีในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน, $BS_{12}B_7$ ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน, $BS_{14}B_1$ ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน, $BS_{16}B_1$ ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และ $BS_{18}B_1$ สามารถให้ค่าการดูดกลืนแสงได้ดีในอาหารที่มีเฮกซะเดคเคนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.131, 0.153, 0.180, 0.123 และ 0.111 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในอาหารที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงนั้นแสดงว่า มีความขุ่นสูง ซึ่งเกิดจากความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อนั้น ๆ ได้ดี พบว่า ถ้าหากเชื้อใดผลิตสาร biosurfactant ได้มากจะทำให้ xylene แยกตัวและรวมตัวกับ Tris buffer เกิดขึ้นได้ดี ทำให้มีความขุ่นสูง ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 0.1 จำนวน 5 ไอโซเลต มาทำการวัดแรงตึงผิวต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant โดยเครื่อง Face Surface Tensiometer

จากการทดสอบ xylene emulsification assay สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 0.1 จำนวน 5 ไอโซเลต นำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร MSM แล้วเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต biosurfactant ของเชื้อแต่ละไอโซเลต ดังภาพที่ 10 เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 48 ชั่วโมง จึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดแรงตึงผิวโดยเครื่อง Face Surface Tensiometer ให้ผลดังตารางที่ 6



ภาพที่ 10 เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เจริญในอาหารสูตร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอน
ต่างกัน

ตารางที่ 6 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิต biosurfactant ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด

รหัสเชื้อ	ประสิทธิภาพการลดแรงตึงผิว								
	กลูโคส			กลีเซอรอล			เฮกซะเดคเคน		
	MSM	ตัวอย่าง	SR (%)	MSM	ตัวอย่าง	SR (%)	MSM	ตัวอย่าง	SR (%)
BS ₁₁ B ₄	59.0	58.0	1.52	-	-	-	-	-	-
BS ₁₂ B ₇	59.0	55.7	5.59	-	-	-	-	-	-
BS ₁₄ B ₁	59.0	44.3	24.92	-	-	-	-	-	-
BS ₁₆ B ₁	-	-	-	62.0	59.3	4.35	-	-	-
BS ₁₈ B ₁	-	-	-	-	-	-	63	58.2	7.62

หมายเหตุ : SR (%) หมายถึง การลดลงของค่าแรงตึงผิว (surface tension reduction) (%)

: มีค่าเท่ากับ $\frac{\text{ค่าแรงตึงผิวก่อนการเจริญ} - \text{ค่าแรงตึงผิวหลังการเจริญ}}{\text{ค่าแรงตึงผิวก่อนการเจริญ}} \times 100$

จากตารางแสดงผลการวัดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Face Surface Tensiometer พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแหล่งคาร์บอนซึ่งผ่านการทดสอบแล้วให้ผลว่ามีความเหมาะสมต่อการผลิตสาร biosurfactant ได้ดีที่สุด หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดแรงตึงผิว พบว่า ไอโซเลต BS₁₄B₁ ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าเท่ากับ 44.3 mN/m เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแรงตึงผิวของอาหาร ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกัน มีค่าเท่ากับ 59.0 mN/m จากการศึกษาของ Bangkok *et al.* (1996) พบว่าการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2.2 ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักและแหล่งคาร์บอนที่เชื้อนี้สามารถผลิตสาร biosurfactant ได้ดีที่สุด คือ กลูโคส ทำให้มีค่าแรงตึงผิวเป็น 40.2 mN/m ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Cooper and Paddock (1984) รายงานว่า *Torulopsis bombicola* จะผลิต glycolipids โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากลูโคสมีผลต่อการเจริญของเซลล์ที่ดี แต่การผลิต biosurfactant ลดลงสอดคล้องกับการศึกษาของ Duvnjak *et al.* (1982) พบว่า *Arthobacter paraffineus* ATCC 19558 ให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อ Cooper *et al.* (1981) ใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิต biosurfactant โดย *Bacillus subtilis* พบว่า หลังจากเติมไฮโดรคาร์บอนมีผลต่อการผลิต biosurfactant กล่าวคือเมื่อเติมเฮกซะเดคเคนมีผลต่อการเพิ่มมวลชีวภาพแต่จะมีผลในการยับยั้งการผลิต biosurfactant

Hommel *et al.* (1987) อธิบายว่าการผลิต biosurfactant ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอน การเติมแหล่งคาร์บอนในช่วงกลางของระยะการเจริญไม่สามารถเพิ่มการผลิต biosurfactant ได้และที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสสูงมีผลต่อการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องเพราะมีผลต่อการทำให้เกิดฟอง

จากการหาค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าแรงตึงผิว (surface tension reduction) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน กล่าวคือ ในกลูโคสไอโซเลต BS₁₁B₄ สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อลงได้ 1.52 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต BS₁₂B₇ ลดลงได้ 5.59 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต BS₁₄B₁ ลดค่าแรงตึงผิวของอาหารลงได้ 24.92 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต BS₁₆B₁ สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารลงได้ 4.35 เปอร์เซ็นต์ และในขณะที่ใช้เฮกซะเดคเคนเป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต BS₁₈B₁ จะลดแรงตึงผิวของอาหารลงได้ 7.62 เปอร์เซ็นต์

จากการทดสอบเพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสาร biosurfactant โดยวิธีการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar เป็นเกณฑ์เริ่มต้นในการคัดแยกแล้วจากนั้นทำการทดสอบขั้นที่สองด้วยวิธี xylene emulsification assay ซึ่งเป็นการตรวจสอบถึงความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ซ้ำอีกครั้งหนึ่งเพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และผ่านการทดสอบทั้งสองวิธีดังกล่าวมีคุณสมบัติในการผลิตสาร biosurfactant ได้จริงซึ่งสาร biosurfactant มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่มีผลช่วยในการละลายและดีดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากอนุภาคดินหรือน้ำ อันจะนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการกำจัดมลพิษจากน้ำมันได้ ดังนั้นจึงได้นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบแล้วทั้งสองวิธีไปวัดระดับความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant โดยการวัดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว โดยเครื่อง Face Surface Tensiometer พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะให้ค่าแรงตึงผิวที่ดีที่สุดในการเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือ เฮกซะเดคเคน และกลีเซอรอล ตามลำดับ

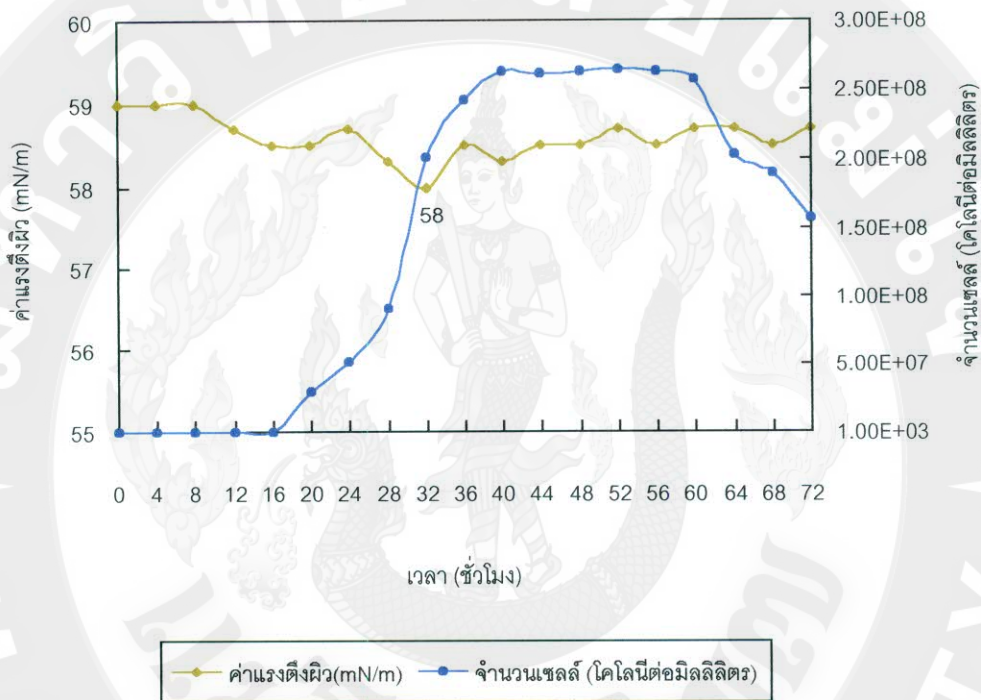
Falatto and Novak (1992) ได้ศึกษาเกี่ยวกับแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสาร biosurfactant โดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* 44 T1 ที่ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหาร ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ กลูโคส ฟรุกโตส โซเดียมซิเตรต โซเดียมซัลซิเนต โซเดียม ไพรูเวท กลีเซอรอล แมนนิทอล น้ำมันมะกอก และ n-alkane C₁₀ ถึง C₁₆ พบว่า n-alkane C₁₂ ให้ค่าแรงตึงผิวดีที่สุด เมื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีและโครงสร้างทางสรีรวิทยาของเซลล์ที่แยกได้จากอาหารในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 จะผลิตสาร biosurfactant ประเภท rhamnolipid ชนิด R₁ และ R₃ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น C₁₁ หรือ C₁₂ ส่วนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส หรือ แมนนิทอล จะผลิตสาร biosurfactant ประเภท glycolipid ชนิด R₁, R₂, R₃ และ R₄ ส่วนแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ก็ผลิตสาร biosurfactant มากน้อยแตกต่างกันไป (Robert et al., 1989) ดังนั้นจากผลการวัดแรงตึงผิว ดังตารางที่ 6 ที่ให้ค่าแรงตึงผิวมากน้อยไม่เท่ากัน ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากสาร biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตได้นั้นมีอยู่หลายประเภทแต่ละประเภทมีหลายชนิดรวมทั้งมีองค์ประกอบของสารหลายอย่างรวมอยู่ด้วย ซึ่งสารแต่ละอย่างก็มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังนั้นการที่เชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตให้ค่าแรงตึงผิวแตกต่างกันก็ขึ้นอยู่กับว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตนั้นจะมีคุณสมบัติในการผลิตสาร biosurfactant ประเภทใดออกมาและเป็นชนิดใด ปริมาณมากน้อยเพียงใด ก็ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ต้องมีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต จึงต้องมีการวิเคราะห์ทางเคมี และโครงสร้างทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในรายละเอียดต่อไป

5. การศึกษาช่วงการเจริญและการผลิต biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรีย

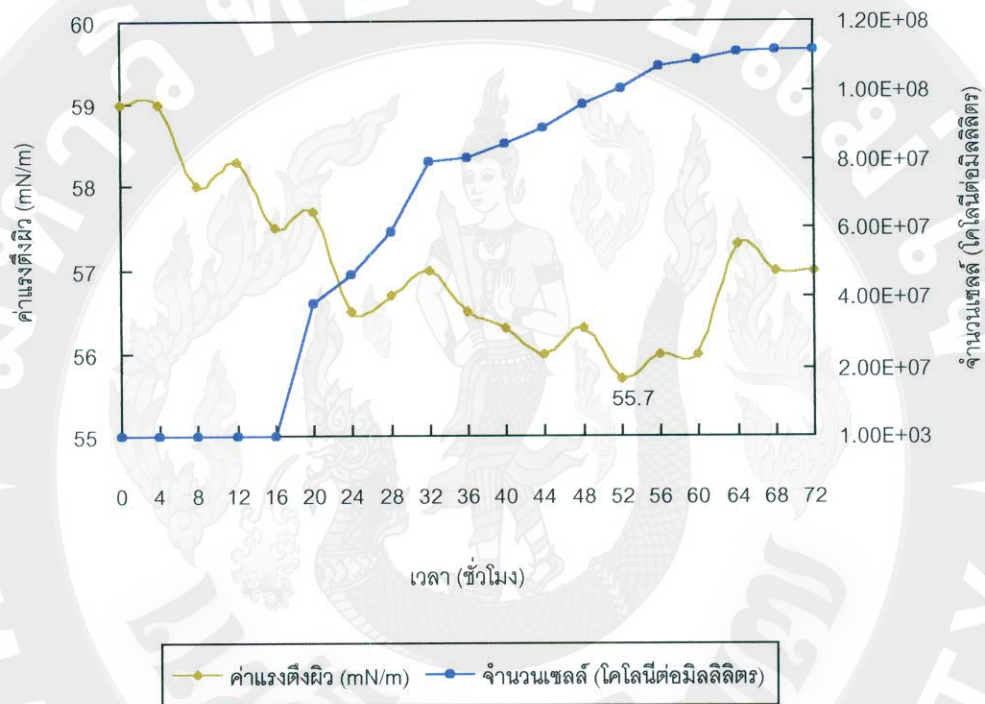
เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BS₁₄B₁ สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจาก 59.0 mN/m ลงเหลือ 44.3 mN/m คิดเป็นการลดลงของค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 24.92 เปอร์เซ็นต์ที่การเพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมง สำหรับ BS₁₆B₁ ลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฮกซะเดคเคนเป็นแหล่งคาร์บอนจาก 63.0 mN/m เป็น 58.2 mN/m คิดเป็นการลดลงของค่าแรงตึงผิว 7.62 เปอร์เซ็นต์ ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 36 ส่วนไอโซเลต BS₁₂B₇ ลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจาก 59.0 mN/m เป็น 55.7 mN/m คิดเป็นการลดลงของแรงตึงผิวเท่ากับ 5.59 เปอร์เซ็นต์ ในเวลาของการเพาะเลี้ยง 52 ชั่วโมง สำหรับไอโซเลต BS₁₆B₁ ลดแรงตึงผิวของอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวจาก 62.0 mN/m เป็น 59.3 mN/m คิดเป็นการลดลงแรงตึงผิว 4.35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 32 ชั่วโมง

และไอโซเลต BS₁₁B₄ ลดแรงตึงผิวของอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจาก 59.0 mN/m ลงเหลือ 58.0 mN/m คิดเป็นการลดลงของค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 1.52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 32 ชั่วโมง ซึ่งการผลิต biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าระยะของการเจริญที่มีการปลดปล่อย biosurfactant ได้ดีอยู่ในช่วงก่อนระยะ stationary phase (ภาพที่ 11 - ภาพที่ 15) โดยไอโซเลต BS₁₄B₁ มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้สูงที่สุด และใช้ระยะเวลาสั้น รองลงมา คือ ไอโซเลต BS₁₈B₁, BS₁₂B₇, BS₁₆B₁ และ BS₁₁B₄ ตามลำดับ

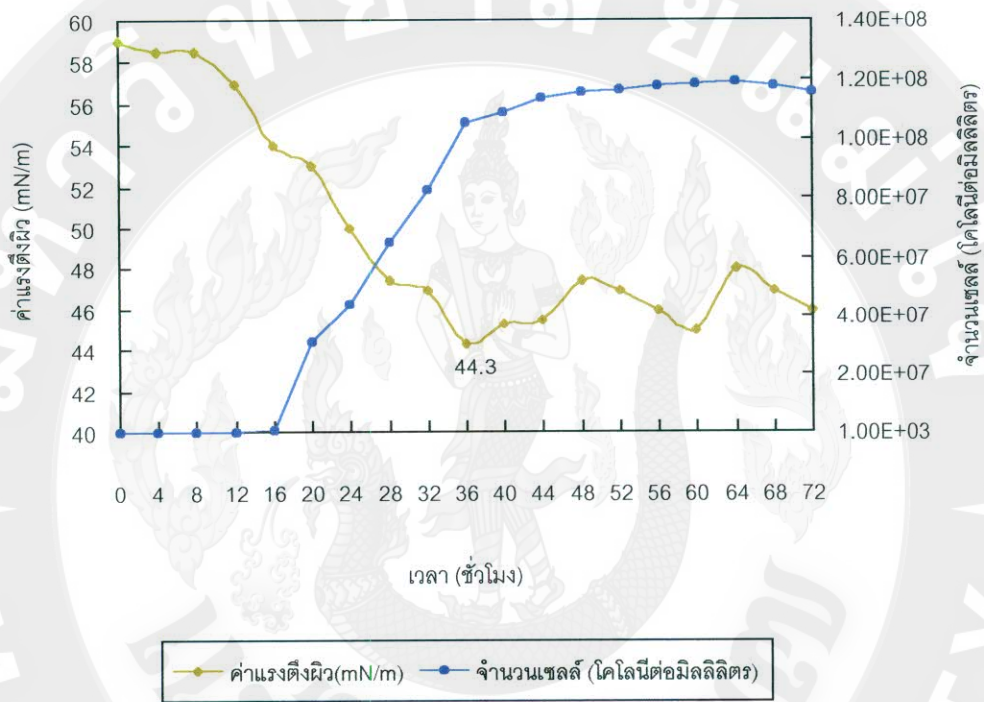




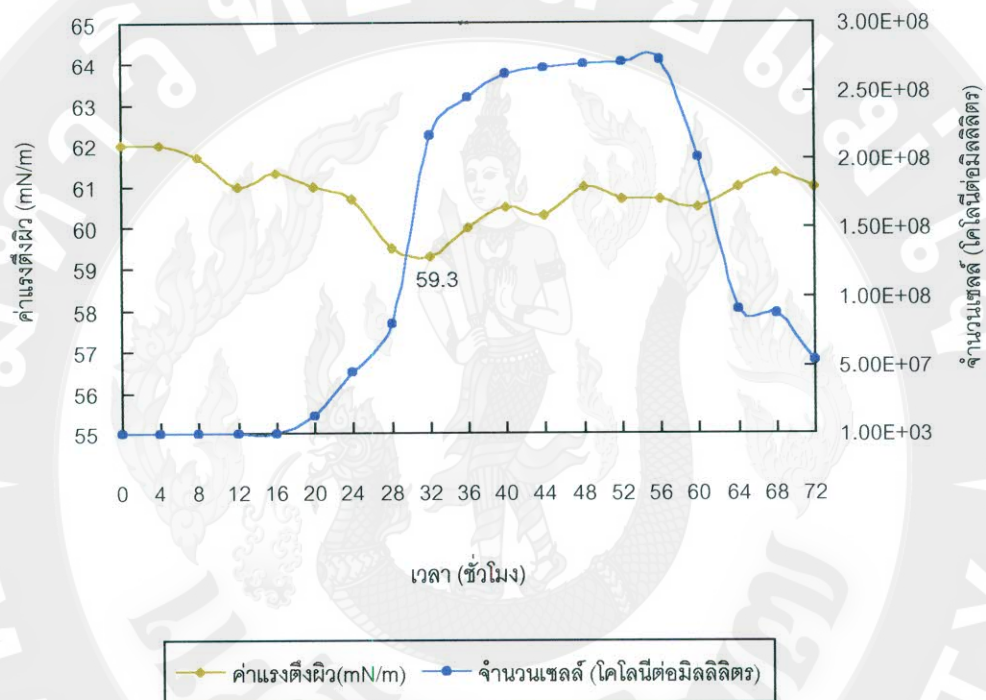
ภาพที่ 11 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย BS₁₁B₄ เมื่อใช้กัญโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



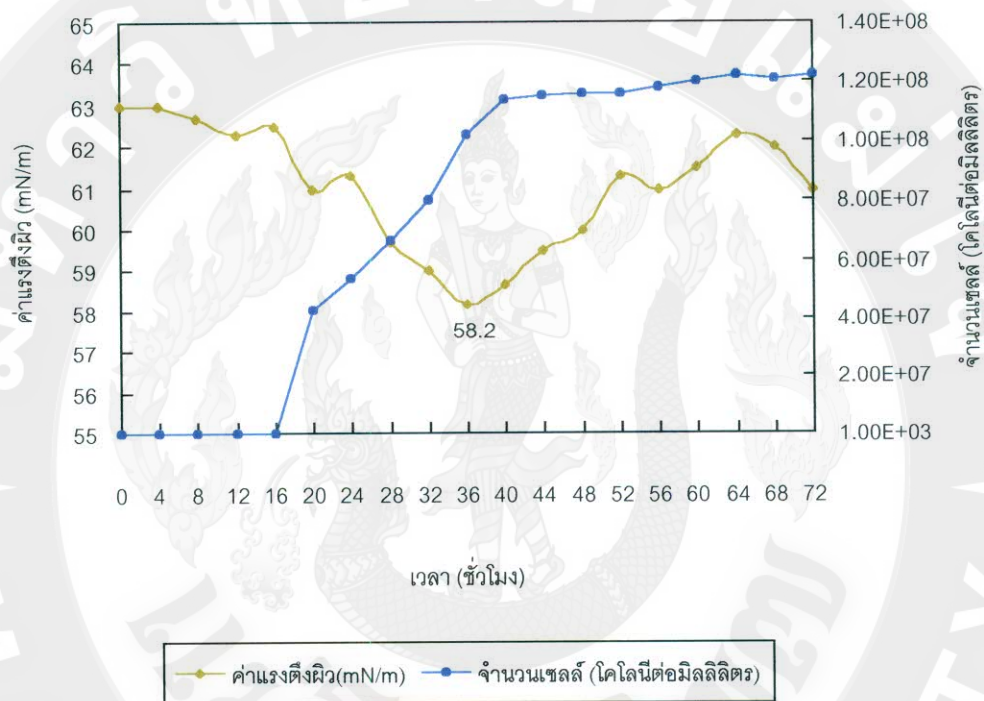
ภาพที่ 12 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย $BS_{12}B_7$ เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 13 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย $BS_{14}B_1$ เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 14 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย $BS_{16}B_1$ เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 15 ค่าแรงตึงผิวและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย $BS_{18}B_1$ เมื่อใช้เฮกซะเดกเคนเป็นแหล่งคาร์บอน

สำหรับผลการทดลองที่พบว่าเชื้อที่มีการปลดปล่อย biosurfactant ได้มีประสิทธิภาพดีในช่วงก่อนระยะ stationary phase นั้นสอดคล้องกับการทดลองของ Cooper (1986) พบว่า biosurfactant เกือบทั้งหมดถูกปลดปล่อยออกมาโดยจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะ exponential phase เช่น glycolipids ซึ่งถูกผลิตโดย *Totulopsis bombicolo* ใช้คาร์โบไฮเดรต และน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนในระยะหลังของช่วง exponential phase Hommel *et al.* (1987) พบว่า ชนิดของสับสเตรทมีอิทธิพลในการผลิต biosurfactant ส่วนช่วงระยะเวลาการผลิต biosurfactant โดยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงทันทีหลังจากเริ่มต้นการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งมีปริมาณของ biosurfactant เพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ถูกผลิตออกมาในช่วงหลังของระยะ stationary phase ในทางกลับกัน เมื่อใช้ n - hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน biosurfactant จะถูกปลดปล่อยออกมาในช่วงกลางของระยะ exponential phase เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase คาร์บอนที่เหลืออยู่ยังคงถูกใช้ในการผลิต biosurfactant อย่างต่อเนื่อง Pruthi and Cameotra (1997a) พบว่า เมื่อเลี้ยง *Serratia macescens* ใน mineral salt medium ที่เติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ w / v จะได้ biosurfactant ที่เป็น emulsifier ที่ดีและสามารถลดแรงตึงผิวได้โดยการลดแรงตึงผิวและการเพิ่มของ biosurfactant จะอยู่ระหว่างช่วง late log phase ซึ่งให้เห็นว่า biosurfactant เป็นสารทุติยภูมิและ biosurfactant ทำให้เกิด emulsion คงที่ในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลายชนิดและพบว่าการผลิต biosurfactant ของ *Arthrobacter protophormiae* ระหว่างการเจริญในอาหารที่เติม n - hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน biosurfactant ที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารลงจาก 68.0 mN/m. เป็น 30.6 mN/m Busscher *et al.* (1997) ได้ศึกษาถึงการผลิต biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus thermophilus* พบว่า เชื้อดังกล่าวจะปลดปล่อย biosurfactant ออกมาปริมาณมากในช่วงกลางของระยะ exponential phase และช่วงแรกของระยะ stationary phase ในขณะที่ในช่วง stationary phase จะปลดปล่อยออกมาปริมาณน้อย แต่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวสูงกว่า จากการวิจัยในครั้งนี้ สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดในระยะ stationary phase เช่นกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองดังกล่าวข้างต้น

6. การตรวจชนิดของ biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตเบื้องต้น

หลังจากทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิต biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต จึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยมีข้อมูลพื้นฐานว่าสาร biosurfactant ที่จุลินทรีย์ผลิตส่วนใหญ่จะประกอบด้วยลิพิด ซึ่งสามารถแบ่งได้ 5 ประเภท คือ glycolipids, lipopolysaccharides, lipopeptides, phospholipids และ fatty acid หรือ neutral lipids (Georgiou *et al.*, 1992) ดังนั้นในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบเบื้องต้นจึงวิเคราะห์หาส่วนประกอบอื่นที่ไม่ใช่ลิพิด ได้แก่ โปรตีน น้ำตาล และฟอสฟอรัส ซึ่งการหาปริมาณโปรตีนใช้วิธี Lowry's method, ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้ Phenol sulfuric total sugar (Dubios *et al.*, 1956) และปริมาณฟอสฟอรัส โดยวิธี Phosphorus ascorbic acid method (Lenore *et al.*, 1989) การวิเคราะห์แสดงผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงของวิธีการวิเคราะห์ชนิด biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตเบื้องต้น

รหัสเชื้อ	วิธีการวิเคราะห์		
	Lowry's method	Phenol sulfuric total	Phosphorus ascorbic
	OD 660 nm	sugar OD 490 nm	acid method OD 880 nm
BS ₁₁ B ₄	0.022	0.554	0.172
BS ₁₂ B ₇	0.114	0.659	0.088
BS ₁₄ B ₁	0.732	0.034	0.065
BS ₁₆ B ₁	0.101	0.587	0.000
BS ₁₈ B ₁	0.085	0.716	0.102

จากตารางการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ biosurfactant เบื้องต้น พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต BS₁₈B₁, BS₁₂B₇, BS₁₆B₁ และ BS₁₁B₄ ตรวจพบน้ำตาลสูงสุด ตามลำดับ และยังตรวจพบโปรตีน และฟอสฟอรัส แต่เป็นปริมาณที่ต่ำ และไอโซเลต BS₁₆B₁ ไม่พบปริมาณของฟอสฟอรัสเลย ดังนั้น biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลตดังกล่าวผลิตจึงควรอยู่ในกลุ่มของ

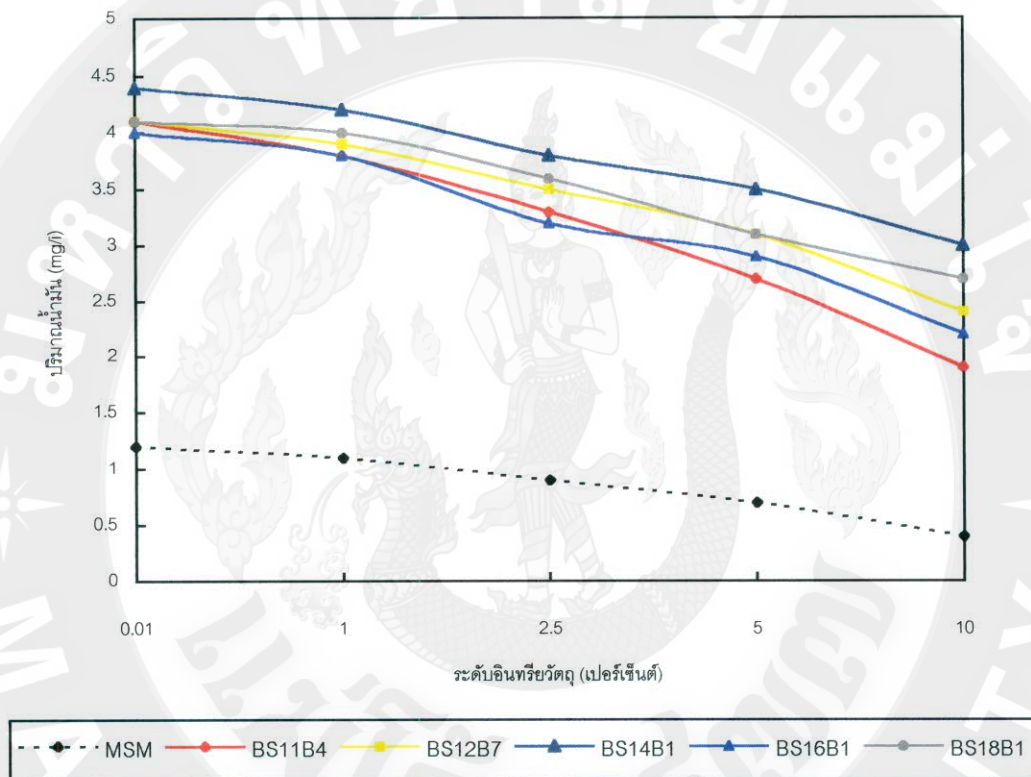
lipopolysaccharides หรือ lipopeptides ในขณะที่ไอโซเลต BS₁₄B₁ ตรวจพบโปรตีนในปริมาณสูงสุด และยังตรวจพบน้ำตาลและฟอสฟอรัส แต่มีปริมาณต่ำ จึงอาจเป็นไปได้ว่า biosurfactant ที่ไอโซเลต BS₁₄B₁ ผลิตได้จัดอยู่ในกลุ่มของ glycolipids

7. การศึกษาผลของ biosurfactant ต่อการดูดซับน้ำมันในดิน

ดินที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นดินซุดน้ำพอง มีค่า pH 5.48 ความชื้น 0.23 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ 0.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียของแต่ละไอโซเลตที่สามารถเจริญและลดแรงตึงผิวได้ดีในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เชื้อแบคทีเรีย แต่ละไอโซเลตผลิต biosurfactant ได้มากที่สุด มาทดสอบความสามารถในการชะน้ำมันออกจากดินซึ่งมีระดับอินทรีย์วัตถุต่างกันคือ 0.01, 1, 2.5, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ความสามารถในการชะน้ำมันออกจากดินของ biosurfactant ที่แบคทีเรียผลิต

รหัสเชื้อ	ปริมาณน้ำมันที่ถูกชะออกจากดิน (mg/l)				
	ระดับอินทรีย์วัตถุ (เปอร์เซ็นต์ w/w)				
	0.01	1	2.5	5	10
MSM	1.2	1.1	0.9	0.7	0.4
BS ₁₁ B ₄	4.1	3.8	3.3	2.7	1.9
BS ₁₂ B ₇	4.1	3.9	3.5	3.1	2.4
BS ₁₄ B ₁	4.4	4.2	3.8	3.5	3.0
BS ₁₆ B ₁	4.0	3.8	3.2	2.9	2.2
BS ₁₈ B ₁	4.1	3.6	3.6	3.1	2.7



ภาพที่ 16 ปริมาณน้ำมัน (mg/l) ซึ่งถูกชะออกจากดินที่ระดับอินทรีย์วัตถุต่างกันโดย biosurfactant

จากผลการทดสอบความสามารถในการชะน้ำมันออกจากดินที่มีปริมาณอินทรีย์วัตถุต่างกันคือ 0.01, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ชะน้ำมันออกจากดินในปริมาณ 1.2, 1.1, 0.9, 0.7 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับของระดับปริมาณอินทรีย์วัตถุ ส่วนน้ำเลี้ยงที่มี biosurfactant ซึ่งถูกผลิตโดยแบคทีเรีย BS₁₁B₄ ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 32 สามารถชะน้ำมันออกจากดินปริมาณ 4.1, 3.8, 3.3, 2.7 และ 1.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับปริมาณอินทรีย์วัตถุ biosurfactant ซึ่งแบคทีเรีย BS₁₂B₇ ผลิตออกมาที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 52 สามารถชะน้ำมันได้ 4.1, 3.9, 3.5, 3.1 และ 2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับปริมาณอินทรีย์วัตถุ ส่วนแบคทีเรีย BS₁₄B₁ ผลิต biosurfactant ออกมามากที่สุดในช่วงการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง สามารถชะน้ำมันออกจากดินได้ปริมาณ 4.4, 4.2, 3.8, 3.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับของระดับปริมาณอินทรีย์วัตถุ ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณของน้ำมันที่ถูกชะออกจากดินเป็นปริมาณมากที่สุด นอกจากนี้ biosurfactant ซึ่งถูกผลิตโดย BS₁₆B₁ ในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 32 ชั่วโมง ชะน้ำมันได้ปริมาณ 4.0, 3.8, 3.2, 2.9 และ 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับปริมาณอินทรีย์วัตถุ และ biosurfactant ซึ่งถูกผลิตโดย BS₁₈B₁ ในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 36 สามารถชะน้ำมันได้ 4.1, 4.0, 3.6, 3.1 และ 2.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับของระดับปริมาณอินทรีย์วัตถุ

แสดงดังภาพที่ 16 จากผลการทดสอบการดูดซับของน้ำมันพบว่า ปริมาณของอินทรีย์วัตถุมีผลต่อการดูดซับน้ำมันกล่าวคือ ที่ระดับอินทรีย์วัตถุในดินสูง มีผลต่อการดูดซับของน้ำมันสูงด้วยเช่นกัน สามารถอธิบายได้จากการทดลองของ Edward *et al.* (1994) ซึ่งศึกษาถึงระบบดิน/น้ำ กับสารประกอบอินทรีย์ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic organic compounds ; HOC) ที่มีและไม่มี surfactant สามารถอธิบายได้ว่า nonionic surfactant ดูดซับกับอินทรีย์วัตถุในดิน ซึ่งอินทรีย์วัตถุในดินจะมีผลในการเพิ่มประจุในดิน ซึ่งนำไปสู่การดูดซับของ HOC ที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งสิ่งที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของ HOC ในระบบ ดิน/น้ำ และการทดลองของ Deitsch and Smith, 1995 ; Aronstein *et al.*, 1991 พบว่า ดินที่มีแตกต่างของสารอินทรีย์และ synthetic surfactant มีผลต่อการชะสารปนเปื้อนออกจากดินที่ความเข้มข้นต่ำของ surfactant monomers เริ่มรวมตัวกันและสร้างเป็นโครงสร้าง micelle เรียก admicelle หรือ hemimicelle แนวโน้มการสร้าง admicelle หรือ hemimicelle ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาระหว่าง surfactant และผิวของดิน ความสามารถในการละลายในน้ำของ surfactant มีแนวโน้มต่ำในการดูดซับ

8. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant

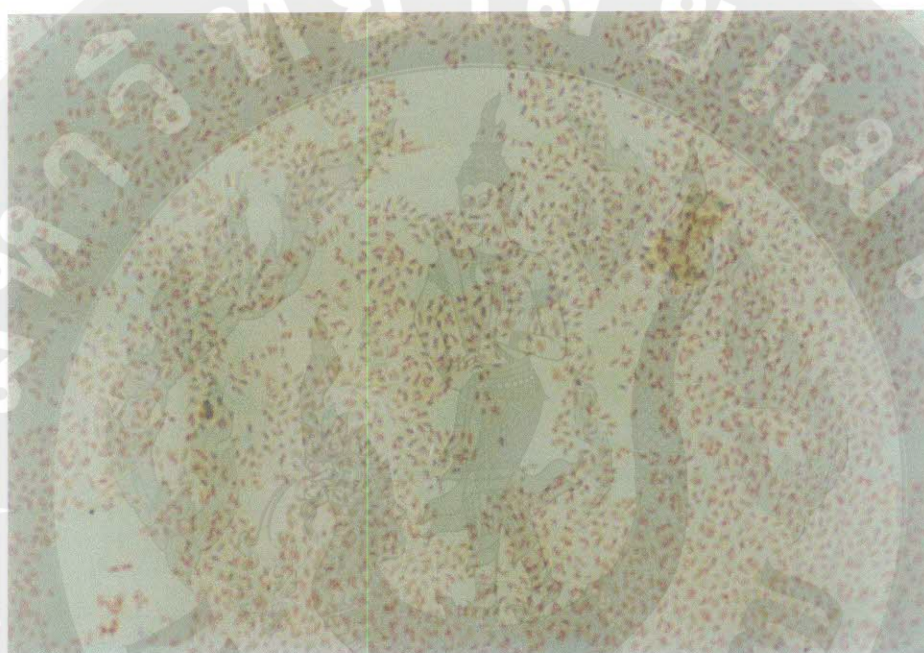
ผลของการศึกษาลักษณะทางชีวเคมี และทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย BS₁₄B₁ ซึ่งให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุด โดยนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีบางประการ โดยใช้หลักของ Bergey's Manual of Determinative, 9th edition ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 9 ซึ่งเชื้อที่ได้มีลักษณะเป็นท่อนสั้นติดสี่แกรมลบ และสร้างเม็ดสีแดงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นลักษณะของจีโนส *Serratia* ดังภาพที่ 17

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย BS₁₄B₁

ปฏิกิริยาที่ทดสอบ	ผลการเกิดปฏิกิริยา
Oxidase	-
Indole productase	-
Voges-proskauer	+
Glucose	+
Lactose	-
Methyl red	-

หมายเหตุ + เกิดปฏิกิริยา

- ไม่เกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรมของจีโนส *Serratia*

สรุปผลการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินจำนวน 18 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 206 ไอโซเลต

2. เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 206 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant เบื้องต้นโดยการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกโดยดูผลจากการเกิดวงใส พบว่ามีเพียง 26 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้

3. เมื่อนำทั้ง 26 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant โดยวิธี xylene emulsification assay โดยเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีกลูโคส, กลีเซอรอล และเฮกซะเดกเคน (2 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลต ที่เกิด emulsion ได้ดี คือ BS₁₁B₄, BS₁₂B₇, BS₁₄B₁, BS₁₆B₁ และ BS₁₈B₁ โดยสามารถให้ระดับการกระจายตัวใน xylene เมื่อได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร แล้วให้ค่าสูงมากกว่า 0.1 โดยแต่ละไอโซเลต จะให้ผลดีในแหล่งคาร์บอนต่างกัน กล่าวคือ ไอโซเลต BS₁₁B₄, BS₁₂B₇ และ BS₁₄B₁ ให้ระดับการกระจายตัวใน xylene ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนไอโซเลต BS₁₆B₁ ให้ผลดีโดยมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน และ ไอโซเลต BS₁₈B₁ ให้ระดับการกระจายตัวใน xylene ที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร สูงกว่า 0.1 โดยมีเฮกซะเดกเคน เป็นแหล่งคาร์บอน

4. การทดสอบความสามารถในการผลิต biosurfactant พบว่า ไอโซเลต BS₁₁B₄, BS₁₂B₇ และ BS₁₄B₁ โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่าการลดแรงตึงผิว 1.52, 5.59 และ 24.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลต BS₁₄B₁ ให้ค่าการลดแรงตึงผิวได้สูงที่สุด ส่วน ไอโซเลต BS₁₆B₁ ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถลดแรงตึงผิวลงได้ 4.35 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต BS₁₈B₁ ในเฮกซะเดกเคนให้ค่าลดแรงตึงผิวเท่าผิวเท่ากับ 7.62 เปอร์เซ็นต์

5. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิต biosurfactant พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลต จะผลิต biosurfactant ได้ดีในช่วงก่อนระยะ stationary phase

6. ในการทดสอบชนิดของ biosurfactant ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตได้ โดยใช้การทดสอบทางเคมีพื้นฐานคือ โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และฟอสฟอรัส พบว่าไอโซเลต BS₁₁B₄, BS₁₂B₇, BS₁₆B₁ และ BS₁₈B₁ มีส่วนประกอบของน้ำตาลทั้งหมดในปริมาณสูง จึงควรอยู่ในกลุ่มของ lipopolysaccharides หรือ lipopeptides และไอโซเลต BS₁₄B₁ ประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณมาก จึงอาจเป็นไปได้ว่า biosurfactant ที่ไอโซเลตดังกล่าวผลิตได้จะอยู่ในกลุ่มของ glycolipids

7. การทดสอบผลของ biosurfactant ต่อการดูดซับน้ำมันในดินที่มีระดับอินทรีย์วัตถุต่างกัน พบว่า น้ำเลี้ยงที่มี biosurfactant ซึ่งถูกผลิตโดยแบคทีเรีย BS₁₄B₁ ในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง มีผลต่อการดูดซับน้ำมันมากที่สุด กล่าวคือ สามารถชะน้ำมัน ออกจากดินซึ่งมีระดับอินทรีย์วัตถุ 0.01, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณ 4.4, 4.2, 3.8, 3.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากผลการทดสอบการดูดซับของน้ำมันพบว่า ปริมาณของอินทรีย์วัตถุมีผลต่อการดูดซับน้ำมันกล่าวคือ ที่ระดับอินทรีย์วัตถุในดินสูง มีผลต่อการดูดซับของน้ำมันสูงด้วยเช่นกัน

8. เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และปฏิกิริยาทางชีวเคมี มาจำแนกชนิด โดยเทียบกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology , 9th edition พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส BS₁₄B₁ ซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวได้ดี และมีประสิทธิภาพในการชะน้ำมันออกจากดินได้ดีที่สุด พบว่าอยู่ในจีนัส *Serratia*

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองการผลิตสาร biosurfactant โดยแบคทีเรียที่แยกจากดินและผลต่อการดูดซับน้ำมันในดิน ทำให้ทราบถึงความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ของแบคทีเรียที่แยกจากดิน ชนิดของแบคทีเรียและชนิดของสาร biosurfactant ที่แบคทีเรียสามารถผลิตได้ รวมทั้งผลของสาร biosurfactant ต่อการดูดซับของน้ำมันในดิน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองเป็นแบคทีเรียที่แยกจากดินซึ่งมีการปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียมและไขมัน ในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ถือได้ว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สามารถผลิตสาร biosurfactant ได้ ดังนั้นในการผลิตระดับอุตสาหกรรมในอนาคตอาจมีความเป็นไปได้สูง ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถผลิตสาร biosurfactant ได้ดี เพราะมีความหลากหลายในสิ่งแวดล้อมและมีโครงสร้างของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร biosurfactant หากมีการควบคุมการผลิตสาร biosurfactant และการสร้างสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและน่าจะกระทำได้ง่ายกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านสภาพแวดล้อม เช่น การควบคุมอุณหภูมิในการผลิตสาร biosurfactant อาหารและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียและการผลิตสาร biosurfactant รวมทั้งพยายามคัดแยกหาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสาร biosurfactant ที่มีศักยภาพสูงในการดึงน้ำมันออกจากดินให้มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับสาร synthetic surfactant ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าสาร synthetic surfactant มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ อาจมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อมและในกระบวนการผลิต synthetic surfactant บางชนิดเป็นแหล่งกำเนิดมลพิษ เช่น กระบวนการผลิต sodium dodecylbenzene sulfonate (SDS) จะก่อให้เกิดสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อนและสารมลพิษบางชนิด

สำหรับผลการทดสอบสาร biosurfactant ต่อการดูดซับน้ำมันในดิน พบว่า อินทรีย์วัตถุมีอิทธิพลต่อการดูดซับน้ำมันในดิน หรือมีผลต่อการทำงานของสาร biosurfactant ในการดึงน้ำมันออกจากดิน จากการทดลองใช้ตัวอย่างดินชุดน้ำพองเพียงชุดเดียวในการทดสอบ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลการทำงานของสาร biosurfactant ในการดึงน้ำมันในดินกับตัวอย่างดินหลายชุด เนื่องจากตัวอย่างดินในแต่ละชุดจะมีสมบัติที่แตกต่างกัน ทั้งทางด้าน ฟิสิกส์ เคมีและชีวภาพของดิน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้น่าจะมีอิทธิพลต่อกระบวนการดูดซับน้ำมันด้วย รวมทั้งควรศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการดึงน้ำมันออกจากดินด้วยเช่น pH, อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา,

ความเข้มข้นของสาร biosurfactant, การควบคุมอัตราการไหลและระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของสาร biosurfactant ที่ใช้ในขบวนการดึงน้ำมันออกจากดิน

หากมีการนำไปประยุกต์ใช้ระดับอุตสาหกรรมหรือใช้ในเชิงพาณิชย์ในอนาคต ควรมีการวิเคราะห์ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ เพื่อควบคุมและลดต้นทุนการผลิตที่อาจเพิ่มขึ้นจากกระบวนการผลิตสาร biosurfactant เช่น แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตที่มีราคาสูง หากเปรียบเทียบกับสาร synthetic surfactant ซึ่งอาจจะมีราคาต่ำกว่าสาร biosurfactant ส่งผลต่อความนิยมการใช้สาร biosurfactant ได้ แนวทางที่อาจเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตสาร biosurfactant ทางด้านแหล่งคาร์บอนที่ใช้ก็คือ ควรมีการศึกษาถึงการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ของเสียจากภาคอุตสาหกรรม หรือ วัสดุขี้เถ้าที่มีราคาถูก มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสาร biosurfactant เพื่อนำไปสู่การพัฒนาทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณในเชิงพาณิชย์ได้

บรรณานุกรม

- เอิบ เขียวรีนรมณ์. 2533. ดินของประเทศไทย ลักษณะการแจกกระจายและการใช้. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 650 น.
- Aronstein, B.N., Y.M. Calvillo and M. Alexander. 1991. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environment Science Technology*. 25(10): 1728-1732.
- Banat, I.M., N. Samarah, M. Murad, R. Horne and S. Banerjee. 1991. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7: 80-88.
- Bangkoh, S., T. Jiraporn and T. Suthep. 1996. Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* F 2.2. *Thai Journal of Biotechnology*. 1 (1): 46-53.
- Busscher, H.J., C.G. van Hoogmoed, G.I. Geertsema – Doornbusch, M. van der Kuijl – Booij and H.C. van der Mei. 1997. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactant inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Applied and Environmental Microbiology*. 32: 3810 – 3817.
- Carrillo, P.G., C. Mardaraz, S.I. Pitta-Alvarez and A.M. Giulietti. 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 12: 82-84.
- Cooper, D.G. 1986. Biosurfactants. *Microbiological Science*. 3(5): 90-95.
- Cooper, D.G. and J.F. Zajic. 1980. Surface acting compounds from microorganism. *Advances in Applied Microbiology*. 26: 229-253.
- Cooper, D.G. and D.A. Paddock. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. 47(1): 173-176.
- Cooper, D.G., C.R. MacDonald, S.J.B. Duff and N. Kosaric. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous production removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*. 43(3): 408-414.

- David, C. H., Z. Yimin and M.M. Raina. 1997. Rhamnolipid (Biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9): 3622-3627.
- Deitsch, J.J. and J.A. Smith. 1995. Effect of triton X-100 on the rate of trichloroethene desorption from soil to water. *Environmental Science & Technology*. 29: 1069-1075.
- Dubios, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350 - 356.
- Duvnjak, Z. and N. Kosaric. 1985. Production and release of surfactant by *Corynebacterium lepus* in hydrocarbon and glucose media. *Biotechnology Letters*. 7(11): 793-796.
- Duvnjak, Z., D.G. Cooper and N. Kosaric. 1982. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. *Biotechnology and Bioengineering*. 24: 165-170.
- Edwards, D.A., Z. Liu and R.G. Luthy. 1994. Surfactant solubilization of organic compounds in soil/aqueous system. *Journal of Environmental Engineering*. 24 (1): 5-11.
- Falatko, D.M., and J.T. Novak, 1992. Effects of biologically produced surfactants on mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environment*. 64: 163 – 169.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology*. 10: 208-217.
- Francy, D.S., J.M. Thomas, R.L. Raymond and C.H. Ward. 1991. Emulsification of hydrocarbons by surface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*. 8: 237-246.
- Georgiou, G., L. Sung-Chyr and M.M. Sharma. 1992. Review of surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*. 10: 60-66.

- Ghurye, G.L., C. Vipulanandan and R.C. Willson. 1994. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 661-666.
- Guerra-Santos, L., O. Kappeli and A. Fiechter. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*. 48: 301-305.
- Harrison, D.E.F. 1973. *Growth, Oxygen, and Respiration*. CRC Critical Reviews in Microbiology. New York: Marcel Dekker. 185-193.
- Holt, G.R., R.N. Krieg, H.A. Sneath, T.J. Staley and T.S. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Maryland: Williams & Wilkins. 787 p.
- Hommel, R., O. Stüwer, W. Stuber, D. Haferburg and H.P. Kleber. 1987. Production of water – soluble surface – active exolipids by *Torulopsis apicola*. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 26: 199-207.
- Ivshina, I.B., M.S. Kukima, J.C. Philip and N. Christofski. 1998. Oil desorption from mineral and organics materials using biosurfactant complexed by *Rhodococcus* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 711-717.
- Jonsson B., B. Lindman, K. Holmberg and B. Kronberg. 1999. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. New York: John Wiley & Sons. 549 p.
- Kachholz, T. and M. Schlingmann. 1987. *Biosurfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker. 342 p.
- Karickhoff, S.W., D.S. Brown and T.A. Scott. 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research*. 13(2): 241 – 248.
- Kosaric, N., W.L. Cairns and C.C. Gray . 1987. *Biosurfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker. 342 p.
- Laha, S. and R.G. Luthy. 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environmental Science and Technology*. 25(11): 1920-1927.

- Laha, S. and R.G. Luthy. 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil – water systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 40: 1367-1372.
- Lang, A. and C. Wagner. 1987. *Biosurfactant and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker. 342 p.
- Lenore, S., E. Arnold and R. Rhodes. 1989. *Standard Method for Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC: American Public Health Association.
- Lowry, O.H., N.J. Rosbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Niran, R., T. Jiraporn and T. Suthep. 1996. Properties of biosurfactant produced by *Bacillus* sp. strain KP-2. *Thai Journal of Biotechnology*. 1 (1): 54-60.
- Oberbremer, A., R. Muller-Hurtig and F. Wagner. 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32: 485-492.
- Peter, R.W., C.D. Motemagno and L. Shem. 1992. Surfactant screening of diesel-contaminated soil. *Hazardous Waste and Hazardous Materials*. 9(2): 113-116.
- Pruthi, V. and S.S. Cameotra. 1997a. Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 133-135.
- _____. 1997b. Production and properties of a biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae* – an antarctic strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 137-139.
- Robert, M., M.E. Mercade, M.P. Bosch, J.L. Parra, M.J. Espuny, M.A. Manresa and J. Guinea. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44TI. *Biotechnology Letters*. 11 (12): 871-874.
- Rosen, M.J. 1989. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 2nd Edition. New York : Wiley. 118 p.

- Sood, A. 1997. Biosurfactant Production by *Nocadia amarae* and Its Effect on Partition of Phenanthrene into Soil. Master Thesis, Illinois Institute of Technology, Chicago.
- Strevett, Keith A., R. Tanner, David A. Sabatini and Knox, Robert. 2001. The effect of in situ biosurfactant production on hydrocarbon biodegradation. *Journal of Environmental Engineering*. 31 (1): 5-12.
- Tsomides, H.J., J.B. Hughes, J.M. Thomas and C.H. Ward. 1995. Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14(6): 953-958.
- Wang, S.Y. and C. Vipulanandan. 1998. Producing Biosurfactants from Waste Materials. <http://www.Yahoo/Journals/JSD>.
- Wilson, D.J. and A.N. Clark. 1994. Soil Surfactant Flush/Washing, in *Hazardous Waste Site Soil Remediation Theory and Application of Innovative Technologies*. New York: Marcel Dekker. 560 p.
- Zajic, J.E., H. Guignard and D.F. Gerson. 1977. Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 19: 1303-1312.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

1. Andrad' s Carbohydrate broth

peptone	10.0	กรัม
beef extract	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
bromcresol purple 1.6 %	7.25	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.1 เติมอินดิเคเตอร์ เติมน้ำตาลทดสอบ 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์ นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. Blood agar base

Brain Heart Infusion (Difco)	40	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหาร 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไปหลอมปรับ pH เป็น 6.8 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เติมเลือดลงไป 5 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่จะนำไปทดสอบ

3. Hugh and Leifson' s O – F medium

petone	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.3	กรัม
agar	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
bromthymol blue 0.2%	15	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.1 เติมอินดิเคเตอร์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ผสมสารละลายน้ำตาลที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แบ่งใส่หลอดทดสอบ

4. Indole Test

Tryptone broth

tryptone	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Mineral salt glucose

KH_2PO_4	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.7	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.0	กรัม
$\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COONa})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
glucose	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 6.0 – 8.0 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Mineral salt medium

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.0	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.8	กรัม
KH_2PO_4	3.5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.7	กรัม
yeast extract (Difco)	0.5	กรัม
glucose	20	กรัม
หรือ glycerol	20	มิลลิลิตร
หรือ hexadecane	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดย hexadecane จะเติมลงไปในการอาหารหลังจากที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนที่จะเติมเชื้อ

7. Nutrient agar

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Triple Sugar Iron Agar Reaction

beef extract	3.0	กรัม
yeast extract	3.0	กรัม
peptone	20.0	กรัม
glucose	1.0	กรัม
lactose	10.0	กรัม
sucrose	10.0	กรัม
ferrous sulfate หรือ ferrous ammonium sulfate	0.2	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
sodium sulfate	0.2	กรัม
phenol red	0.024	กรัม
agar	13.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.3 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



1. 1 M Tris stock

Tris base [Tris (hydroxymethyl) aminomethane] 121.0 กรัม

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ตามต้องการด้วยกรด hydrochloric เข้มข้น เมื่อได้ pH ที่ต้องการแล้ว นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ในขวดสีชา

2. Acetone alcohol (Decolorizer for Gram Staining)

95 % ethyl alcohol 250 มิลลิลิตร

acetone 250 มิลลิลิตร

3. Bromothymol blue 0.2 %

bromothymol blue 0.2 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. Bromocresol purple

bromocresol purple 0.64 กรัม

95 % ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร

ละลาย bromocresol purple ในสารละลาย 95 % ethyl alcohol ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

5. Crystal violet stain

crystal violet 0.5 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

6. Gram iodine

iodine 1.0 กรัม

potassium iodine 2.0 กรัม

น้ำกลั่น 360 กรัม

7. Kovac' s reagent

para – dimethylaminobenzaldehyde	5.0	กรัม
butyl alcohol	75.0	มิลลิลิตร
hydrochloric acid concentrated	20.0	มิลลิลิตร

ละลาย para – dimethylaminobenzaldehyde ทั้งหมดใน butyl alcohol เติมกรด hydrochloric ซ้ำๆ คนสารละลายตลอดเวลาจนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เก็บไว้ในตู้เย็น

8. Methyl red indicator

methyl red	0.1	กรัม
ethyl alcohol	300	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายจนครบ 500 มิลลิลิตร

9. Safranin

safranin	2.5	กรัม
95 % ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร



ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ : นายชาคริต วังคะออม

วัน เดือน ปีเกิด : 12 มีนาคม 2521

ภูมิลำเนา : จังหวัดแพร่

ประวัติการศึกษา :

พ.ศ. 2538 - โรงเรียนพิริยาลัยจังหวัดแพร่

มัธยมศึกษา (วิทย์-คณิต)

พ.ศ. 2543 - มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

