รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลน

Biodiversity of biosurfactant-producing bacteria in mangrove sediment

โดย ผศ. ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์ และคณะ

กุมภาพันธ์ 2553

RECEIVED
BY Cosia DATE 19/2/53

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลน

Biodiversity of biosurfactant-producing bacteria in mangrove sediment

โดย ผศ. ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์ และคณะ

กุมภาพันธ์ 2553

รหัสโครงการ BRT R_651178

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลน

Biodiversity of biosurfactant-producing bacteria in mangrove sediment

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
3. Miss Dina Riska คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
4. นายอทิพันธ์ เสียมไหม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R_651178

บทคัดย่อ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสารมารถลดแรงตึงผิวระหว่างชั้นของของเหลวได้ มีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในหลายด้าน เช่น การนำน้ำมันกลับมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหรรมน้ำมัน การเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมอาหารและสารให้ความชุ่มชื้นในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การศึกษานี้แยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลนในภาคใต้ของประเทศไทยโดยใช้วิธี enrichment culture technique ซึ่งใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1033 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน 89 ตัวอย่าง พบว่า 95 ไอโซเลต สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จากการใช้วิธี drop-collapsing test ในการตรวจสอบ และมี 20 ไอโซเลตที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยสามารถลดแรงตึงผิวได้ดี ไอโซเลต 318 สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด (16.8 mN/m) ซึ่งเป็นไอโซเลตที่แยกได้จากดินจังหวัดสตูล เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการลดแรงตึงผิวมี 5 ไอโซเลต ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี คือ ไอโซเลต 79, 213, 318, 319 และ 1033 เมื่อนำไปเทียบเคียงสายพันธุ์ด้วย 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas putida* ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้นี้มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดสารโดยวิธีการทางชีวภาพในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ต่อไปในอนาคต

Abstract

Biosurfactants are a diverse group of surface-active agents produced by many living organisms. These amphiphilic compounds contain a hydrophobic and a hydrophilic moiety, and have the ability to reduce interfacial tension between different fluid phases. Their uses and potential commercial applications have been reported in several fields, including surfactant-assisted flooding for enhanced oil recovery in the oil industry, emulsifiers in the food industry and moisturizers in the cosmetic industry. In this study, we characterized biosurfactant producing microbial populations from mangrove sediment in South of Thailand by enrichment culture technique using used lubricating oil as a sole carbon source. A total of 1033 oil-utilizing bacteria were isolated from the 89 sediment samples. Ninety-five isolates were positive for biosurfactant production by drop-collapsing test and 20 showed the promising of biosurfactant activity by surface tension reduction. The highest reduction of surface tension (16.8 mN/m) was achieved with isolates 318 from a Satun sediment sample. Based on surface tension reduction, isolates 79, 213, 318, 319 and 1033 were identified by 16S rRNA gene sequencing as *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia* and *Psedudomonas putida,* respectively. Bacterial isolates displaying substantial potential for production of biosurfactants can be applied in the bioremediation of soils contaminated with oils or petroleum hydrocarbons.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

การปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ในดินหรือในแหล่งน้ำมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเมื่อไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะมีการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ต่างๆ ซึ่งจะทำให้การย่อยสลายยากมากยิ่งขึ้นและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว การกำจัดไฮโดรคาร์บอนซึ่งปนเปื้อนในธรรมชาติมีหลายวิธีแต่การกำจัดโดยวิธีชีววิธี (bioremediation) เป็นวิธีที่ได้นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีค่าใช้จ่ายน้อย และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งไม่เป็นพิษ แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันได้หลายชนิด ซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในสถานที่ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านั้น อย่างไรก็ตามสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำทำให้การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่นเป็นไปได้ยากหรือช้า ดังนั้นหากต้องการเพิ่มความสามารถในการละลายและทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นย่อยสลายได้ดีขึ้นจึงควรมีการใช้สารลดแรงตึงผิวโดยเฉพาะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้งในรูปของสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular) และที่ติดอยู่กับผนังเซลล์จุลินทรีย์ (Cell-bounded) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) สามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะในแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีซับสเตรทไม่ละลายน้ำ (water-immiscible substrate) และใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งอาหาร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและใช้ในการปรับปรุงสภาพแวดล้อม ซึ่งรวมถึงการกำจัดโลหะหนักและสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั้งในดินและน้ำ เพิ่มการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย เพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดคราบน้ำมัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลนที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงเพื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์ และเก็บสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไว้เพื่อที่จะได้ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

Executive Summary

Hydrocarbon contaminated in environment has become a serious environmental problem. Once in the environment, hydrocarbon can bind to organic matter, mineral particles and organisms. This fact can play an important role in the persistence and toxicity of oil components. Hydrocarbon assimilation has many methods however, bioremediation is promising method because effective, lower cost than other technologies and final products are water and carbon dioxide. Hydrocarbon microbiology research has supported the hypothesis that hydrocarbons and its derivatives are amenable to microbial degradation; microorganisms possessing this potential are widespread in many environments. The ability of microbial communities to adapt to contaminants is evident from contaminated zones. Biodegradation of hydrocarbons by native microbial populations is the primary mechanism by which hydrocarbon contaminants are removed from the environment. However, hydrocarbon compounds have low water solubility. Consequently, the biodegradation is very low or slowly. The biodegradation is maximized when the water-insoluble substrate is dissolved, or emulsified. In these ways, biosurfactants are capable of increasing the bioavailability of poorly soluble hydrocarbons. Microbial compounds, which exhibit pronounced surface activity, are classified as biosurfactants. Biosurfactants are either extracellular compounds or localized on the cell surface. Biosurfactants compose of hydrophilic region and hydrophobic portion. The use of biosurfactants to protect the environment seems possible since a number of bacterial strains can produce biosurfactants during growth on hydrocarbon or water-immiscible substrate. There are many areas of application where biosurfactants can be use such as in industries and environmental restoration including removal of heavy metal, organic compounds from soil and water. Biosurfactants also increase water insoluble uptake of microorganisms as well as increase efficiency of bioremediation. Therefore, this research aims to isolate and screen biosurfactant producing bacteria from mangrove sediment. Bacterial strains which exhibit high biosurfactant production and activity will be selected and identified and kept the selected strains for use in the future.

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Sample sources and screening result; Growth (G) and biosurfactant production (B) by isolates cultivated in MSM medium with glucose or used lubricating oil (ULO) as the carbon source	12
2	Growth (G) and biosurfactant production (B) by bacterial isolates cultivated in MSM containing 1% (w/v) of each carbon source (glucose, ULO, glycerol, CS and molasses)	15
3	Surface tension of culture media with and without cells after growth of isolates in minimal medium with 1% (w/v) of each carbon source (glucose, ULO, glycerol, CS and molasses as the carbon source) cultivation 48 h at room temperature ($30 \pm 2^{\circ}C$) and 200 rpm	16

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 79, 213, 318, 319 และ 1106 วิเคราะห์จากลำดับเบสโดยวิธี 16S rDNA	19

บทนำ

การปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินหรือแหล่งน้ำเป็นปัญหาหนึ่งที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเมื่อสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะมีการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ต่างๆ ทำให้การย่อยสลายยากยิ่งขึ้นและมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Mercadé *et al.*, 1996) โดยสาเหตุใหญ่ที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน คือ การขาดความระมัดระวังและความรับผิดชอบของผู้ใช้

การกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนซึ่งปนเปื้อนในธรรมชาติมีหลายวิธีแต่การกำจัดโดยชีววิธี (bioremediation) เป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่ายน้อย และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งไม่เป็นพิษ (Leahy and Colwell, 1990) แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในสถานที่ที่มีการปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอนดังกล่าว อย่างไรก็ตามสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำทำให้การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่นเป็นไปได้ยากหรือช้า (Kelle and Chiou, 1989) ซึ่งการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อสารเหล่านั้นละลาย (dissolved) หรือเกิดเป็นอิมัลชั่น (emulsified) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของสารทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ดีขึ้น (Mattei *et al.*, 1986) ปกติมีการใช้สารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีมาใช้ในการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อม แต่การใช้สารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีจะเป็นการเพิ่มมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายสารลดแรงตึงผิวเองเป็นสารก่อมลพิษเช่นกัน (Dhouib *et al.*, 2003) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) จึงเป็นทางเลือกใหม่ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติในการเพิ่มความสามารถในการใช้ได้ของสาร (bioavailability) โดยเฉพาะสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ เช่น phenanthrene (Gilewicz *et al.*, 1997; Olivera *et al.*, 2003) และ resin (Venkateswaran *et al.*, 1995)

ป่าชายเลนเป็นพื้นที่ที่กักเก็บของสารก่อมลพิษหลายชนิดเนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีการท่วมถึงของกระแสน้ำ (Kleskowski *et al.*, 1994; Bernard *et al.*, 1996) เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเนื่องจากการปนเปื้อนของน้ำมันซึ่งเกิดมาจากกระบวนการผลิต การขนส่ง หรือกิจกรรมอื่นๆ ของมนุษย์ (Burns *et al.*, 1993) มีจุลินทรีย์ประจำถิ่นหลายกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือสารปนเปื้อนเหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงาน (Catallo and Portier, 1992; Chaineau *et al.*, 1999) ซึ่งโดยปกติจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้มักจะสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เช่นกัน (Calvo *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006)

สำหรับในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับปัญหาการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในป่าชายเลนยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะการศึกษาถึงความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อจะได้เป็นข้อมูลและเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำจัดและแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมต่อไป หรือสำหรับการบำบัดหรือกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ในแหล่งปนเปื้อนหรือระบบบำบัดน้ำเสียของส่วนราชการหรือเอกชนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลนที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างน้อย 10 สายพันธุ์
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายและชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยอาศัยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA
3. เพื่อรวบรวมและเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลน

วิธีการดำเนินงาน

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral Salt Medium (MSM) ประกอบด้วย (ต่อ 1 ลิตร) K_2HPO_4, 0.8; KH_2PO_4, 0.2; $CaCl_2$, 0.05; $MgCl_2$, 0.5; $FeCl_2$, 0.01; $(NH_4)_2SO_4$, 1.0; NaCl, 5.0; waste lubricating oil, 10 เติมน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 (Yin *et al.*, 2005)

<u>การวิเคราะห์กิจกรรมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u>

- การหาค่า Emulsification activity (%EA)

เติม *n*-hexadecane 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 2 นาที แล้วทิ้งไว้ 10 นาที และ 24 ชั่วโมง หาค่า emulsification activity และ emulsion stability (E_{24}) โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ (ดัดแปลงจาก Cooper and Goldenberg, 1987)

$$\text{Emulsification activity และ } E_{24} = \frac{\text{ความสูงของ emulsion} \times 100}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}}$$

- การหาค่า surface tension

วัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายโดยใช้เครื่อง Ring Tensiometer (Kim *et al.*, 2002)

- การทดสอบ drop collapsing test

หยด Mineral oil 2 ไมโครลิตร ลงใน 96-microtiter plate lid เก็บที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรลงบนผิวของน้ำมัน ทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วตรวจสอบลักษณะรูปร่างของหยดบนผิวน้ำมัน หากเชื้อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ลักษณะของหยดน้ำมันจะมีการกระจายตัว โดยให้คะแนนตามระดับของความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ + เส้นผ่านศูนย์กลาง < 4 mm, ++ เส้นผ่านศูนย์กลาง > 4 mm และให้ – คือไม่มีกิจกรรม (Youssef *et al.*, 2004)

<u>ตัวอย่างดิน</u>

- เก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนโดยเก็บที่ผิวหน้าถึงความลึกประมาณ 5 เซนติเมตร โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง 20 จุด เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการแยกเชื้อ โดยจะเก็บตัวอย่างที่จังหวัดต่างๆ ดังนี้ อำเภอปะเหลียน และอำเภอสิเกา จังหวัดตรัง, อำเภอทุ่งหว้า จังหวัดสตูล, อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช

1. การแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เติมตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน 1 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Mineral salt medium (MSM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน หรือจนกระทั่งเห็นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และ/หรือมีการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน (Mercadé *et al.*, 1996) จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 % ลงใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน แล้วถ่ายเชื้อ 1 % ลงในอาหารใหม่และทำการเลี้ยงตามวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง (ดัดแปลงจาก Al-Sharidah *et al.*, 2000) เก็บตัวอย่างกลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร MSM ที่ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบขั้นต่อไป

ถ่ายกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1 % ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้น spread plate ลงบนอาหาร MSM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วฉาบอยู่ที่ผิวหน้าอาหาร MSM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สุ่มโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็งมา streak plate บนอาหาร MSM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วฉาบอยู่ที่ผิวหน้าอาหาร

MSM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง แล้ว streak ซ้ำ 2-3 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วในอาหาร MSM ที่ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1 (1 ลูป) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหรือน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง แล้วนำส่วนใสที่สกัดน้ำมันออกแล้วไปหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการทดสอบด้วย drop collapsing test คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีค่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ มีค่า drop collapsing test สูง ไปย้อมสีแกรมและตรวจสอบลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันได้แก่ กลูโคส น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว กลีเซอรอล น้ำตาลทรายและกากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่ใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนนำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง ตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop collapsing test และวัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสโดยใช้เครื่อง Ring Tensiometer เลือกไอโซเลทที่มีค่า drop collapsing test สูงและสามารถลดค่า surface tension ได้มาก เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป โดยเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวทางการค้าคือ sodium dodecyl sulfate และ Tween 80

3. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในกรณีที่เป็นแบคทีเรีย (ย้อมสีแกรม, รูปร่างและการจัดเรียงตัว) การทดสอบทางชีวเคมี และเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rDNA โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol/chloroform DNA extraction (Ausubel *et al.*, 1995) เพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primers ในช่วง 8f และ 1492r แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (QIAGEN, Inc.) จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง

DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi. nlm. nih. gov)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตะกอนดินป่าชายเลนในภาคใต้ของประเทศไทยทั้งฝั่งอันดามัน (อำเภอปะเหลียน และ อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง, อำเภอทุ่งหว้า จังหวัดสตูล) และอ่าวไทย (อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา และ อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช) โดยวิธี Enrichment culture method พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 1033 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินทั้งหมด 89 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียได้ 258 ไอโซเลท และ 134 ไอโซเลท จากตะกอนดิน 33 และ 19 ตัวอย่างในอำเภอปะเหลียนและอำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ตามลำดับ, 142 ไอโซเลท จากตะกอนดิน 10 ตัวอย่างในอำเภอทุ่งหว้า จังหวัดสตูล, 357 ไอโซเลท จากตะกอนดิน 14 ตัวอย่างในอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา และ 142 ไอโซเลท จากตะกอนดิน 13 ตัวอย่างในอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Sample sources and screening result; Growth (G) and biosurfactant production (B) by isolates cultivated in MSM medium with glucose or used lubricating oil (ULO) as the carbon source

	Number	Number	Glucose			ULO		
Sample sources	of sites	of isolates	G	B	%	G	B	%
Palian, Trang	33	258	186	25	13	249	16	6
Sikao, Trang	19	134	120	12	10	132	20	15
Thungwa, Satun	10	142	136	22	16	126	11	9
Ranot, Songkhla	14	357	324	12	4	270	13	5
Huasai, Nakhonsrithammarat	13	142	132	6	5	98	4	4
Total	89	1033	898	77	48	875	64	39

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร MSM ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคสหรือน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48

ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่ใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง ตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop collapsing test พบว่า มีแบคทีเรีย 898 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญในอาหาร MSM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในจำนวนนี้ มี 77 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรือ คิดเป็นร้อยละ 77 ของเชื้อที่เจริญในอาหาร MSM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่มีแบคทีเรีย 875 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยในจำนวนนี้ มี 64 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรือ คิดเป็นร้อยละ 39 ของเชื้อที่เจริญในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 1 จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียสามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าการใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน สังเกตได้จากปริมาณไอโซเลทที่เจริญและมีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้กลูโคสและน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน (898 และ 77 ไอโซเลท สำหรับกลูโคส และ 875 และ 64 ไอโซเลท สำหรับน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ตามลำดับ)

จากการทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี drop collapsing test คัดเลือกแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุด 20 ไอโซเลท ย้อมแกรมและตรวจสอบลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วจึงนำมาเลี้ยงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว กลีเซอรอล น้ำตาลทราย และกากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่ใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง ตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop collapsing test และวัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสโดยใช้เครื่อง Ring Tensiometer ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ พบว่าร้อยละ 75 (15 จาก 20 ไอโซเลท) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกนั้น เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สอดคล้องกับรายงานของ Bicca และคณะ (1999) ที่พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์จากน้ำมันนั้นมักเป็นแบคทีเรียแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนสารอาหารได้ดีกว่ากลุ่มอื่นๆ

ตารางที่ 2 แสดงผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียเกือบทั้งหมด (19 จาก 20 ไอโซเลท) เจริญเมื่อใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียเหล่านี้ผ่านการ

enrichment โดยใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนมาก่อน จึงทำให้แบคทีเรียเกือบทั้งหมดเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนดังกล่าว ในส่วนของกลูโคส น้ำตาลทราย กลีเซอรอล และกากน้ำตาลนั้นจำนวนแบคทีเรียที่เจริญเท่ากับ 16, 16, 14 และ 10 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสัดส่วนของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการเจริญเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันพบว่ากลูโคสและน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีร้อยละของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการเจริญมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 75 และ 74 (12 จาก 16 และ 14 จาก 19 ไอโซเลท ตามลำดับ) สำหรับกลีเซอรอล น้ำตาลทราย และกากน้ำตาล มีร้อยละของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการเจริญเท่ากับ 28, 18 และ 10 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากข้อข้อมูลข้างต้นให้เห็นว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Table 2 Growth (G) and biosurfactant production (B) by bacterial isolates cultivated in MSM containing 1% (w/v) of each carbon source (glucose, ULO, glycerol, CS and molasses).

Isolate	Origin	Gram strain*	Shape	Glucose		ULO		Glycerol		CS		Molasses	
				G**	B**	G	B	G	B	G	B	G	B
2/3	Thungwa, Satun	N	rod	+	-	+	++	+	+	+	-	-	-
9/4	Thungwa, Satun	N	rod	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-
11	Palian, Trang	N	cocci	+	++	+	-	+	-	-	-	-	-
11/6	Thungwa, Satun	N	cocci	+	++	+	+	+	-	-	-	+	-
13	Palian, Trang	N	rod	+	++	+	-	+	-	-	-	+	-
15	Palian, Trang	P	rod	+	-	+	++	+	-	+	-	-	-
33	Thungwa, Satun	N	cocci	-	-	+	++	+	-	+	-	-	-
37	Thungwa, Satun	N	rod	-	-	+	++	+	+	+	-	+	-
54	Thungwa, Satun	P	rod	+	-	+	++	+	-	+	-	-	-
57	Palian, Trang	N	rod	+	-	+	++	+	-	+	-	+	-
79	Thungwa, Satun	N	cocci	+	+	+	++	+	-	+	-	+	-
213	Palian, Trang	N	rod	+	++	+	+	+	-	+	-	+	-
318	Palian, Trang	P	rod	-	-	-	-	+	+	+	-	+	++
319	Palian, Trang	P	rod	+	++	+	+	+	-	+	-	-	-
1033	Palian, Trang	N	cocci	+	++	+	+	+	-	+	+	+	-
1106	Sikao, Trang	N	rod	+	++	+	+	-	-	+	+	-	-
1121	Sikao, Trang	N	cocci	-	-	+	++	-	-	+	+	+	-
1291	Palian, Trang	P	rod	+	++	+	-	-	-	+	-	+	-
1297	Palian, Trang	N	cocci	+	++	+	-	-	-	+	-	-	-
1310	Palian, Trang	N	rod	+	++	+	-	-	-	+	-	-	-
Total				16	12	19	14	14	4	16	3	10	1

* Gram stain: P, Gram-positive; N, Gram-negative

** Growth and biosurfactant production: +, positive response (+, diameter < 4 mm; ++, diameter > 4 mm); -, negative response

Table 3. Surface tension of culture media with and without cells after growth of isolates in minimal medium with 1% (w/v) of each carbon source (glucose, ULO, glycerol, CS and molasses as the carbon source) cultivation 48 h at room temperature (30 ± 2°C) and 200 rpm.

Isolate	Origin	Carbon source	Initial surface tension (mN/m)	Final surface tension (mN/m)*
2/3	Thungwa, Satun	WLO	64.6	50.8 ± 1.0
9/4	Thungwa, Satun	Glucose	71.2	58.5 ± 0.5
11	Palian, Trang	Glucose	71.2	61.2 ± 0.5
11/6	Thungwa, Satun	Glucose	71.2	61.0 ± 1.0
13	Palian, Trang	Glucose	71.2	70.2 ± 0.0
15	Palian, Trang	WLO	64.6	59.0 + 0.5
33	Palian, Trang	WLO	64.6	54.5 ± 0.5
37	Thungwa, Satun	WLO	64.6	63.6 ± 0.0
54	Thungwa, Satun	WLO	64.6	55.0 ± 0.5
57	Thungwa, Satun	WLO	64.6	54.0 ± 1.0
79	Thungwa, Satun	WLO	64.6	48.8 ± 0.5
213	Palian, Trang	Glucose	71.2	56.2 ± 0.5
318	Palian, Trang	Molasses	55.5	38.7 ± 0.5
319	Palian, Trang	Glucose	71.2	55.5 ± 0.5
1033	Sikao, Trang	Glucose	71.2	59.3 ± 0.5
1106	Sikao, Trang	Glucose	71.2	57.2 ± 1.0
1121	Sikao, Trang	WLO	64.6	57.2 ± 0.5
1291	Palian, Trang	Glucose	71.2	58.2 ± 0.5
1297	Palian, Trang	Glucose	71.2	63.0 ± 0.5
1310	Palian, Trang	Glucose	71.2	60.0 ± 1.0
1% SDS	-	-	71.2	42.0 ± 0.9
1% Tween 80		-	71.2	40.5 ± 0.5
Water		-	71.2	71.0 ± 1.0

*Values reported are averages of three to six replicates ± the standard error.

[a] nd, not determined.

ตารางที่ 3 แสดงผลค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับค่าแรงตึงผิวของอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่า มี 5 ไอโซเลท (2/3, 33, 57, 79 และ 318) ที่มีค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสน้อยกว่า 55 mN/m และมีเพียงไอโซเลท 318 เท่านั้นที่มีค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (1% ของ SDS และ Tween 80) โดยที่ค่า critical micelle concentration (CMC) ของ SDS มีค่าเท่ากับ 0.18% (Cooper *et al.*, 1979; Bodour and Maier, 1998) ค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสของไอโซเลท 318 ที่มีค่าน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวทางการค้าแสดงให้ถึงศักยภาพที่จะสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก ไอโซเลท 318 ไปประยุกต์ใช้ทางการค้าได้

เมื่อพิจารณาถึงค่า surface tension reduction พบว่า มีแบคทีเรียไอโซเลท 79, 213, 318, 319 และ 1106 ที่มีค่า surface tension reduction มากกว่า 14 mN/m โดยที่แบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ดังกล่าวนั้นใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแหล่งของคาร์บอนมีผลต่อการเจริญและสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสอดคล้องกับ Edmonds และ Cooney (1969) ที่รายงานว่าโครงสร้างและคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์

3. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

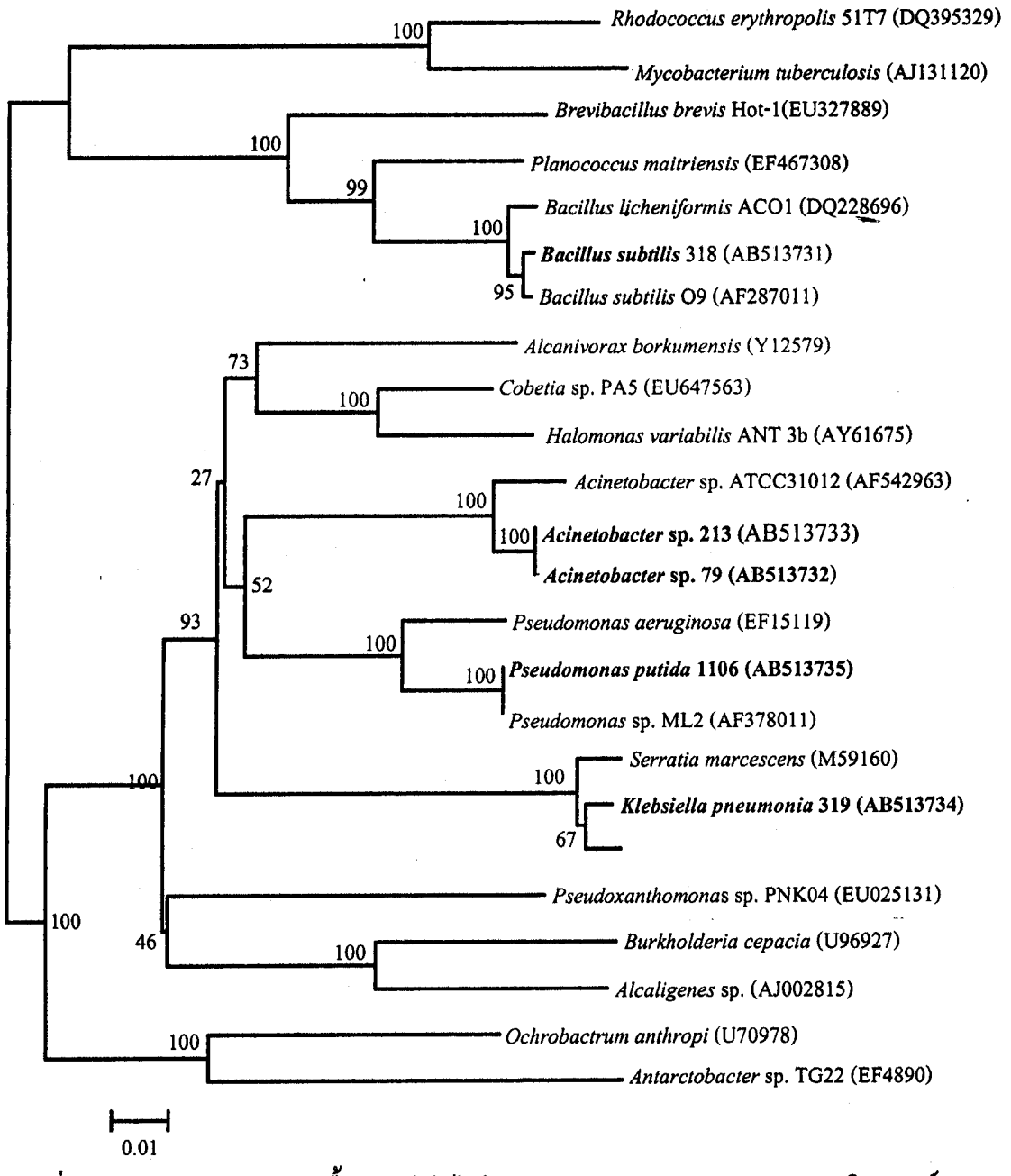
จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่มีสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rDNA โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดเลือกได้ในอาหาร Nutrient broth จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol/chloroform DNA extraction (Ausubel *et al.*, 1995) เพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primers ในช่วง 8f และ 1492r แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (QIAGEN, Inc.) จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www. ncbi. nlm. nih. gov) พบว่าสายพันธุ์ 79 และ 213 คือ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ 318 คือ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 319 คือ *Klebsiella pneumonia* และสายพันธุ์ 1106 คือ *Pseudomonas putida* รูปที่ 1 แสดง Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีความใกล้ชิดกัน โดยใช้โปรแกรม Treeview

สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการศึกษาครั้งนี้มี 4 ชนิด ได้แก่ *Acinetobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia* และ *Pseudomonas putida* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวมักสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้

ง่ายต่อการเข้าถึงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน (Van Dyke *et al.*, 1993; Scheibenbogen *et al.*, 1994; Herman *et.*, 1997) เช่น *Acinetobacter* sp. พบได้ทั่วไปในบริเวณดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน(Huy *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2006) อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพวกไกลโคลิปิดเพื่อช่วยในการย่อยสลายสารดังกล่าวอีกด้วย (Huy *et al.*, 1999) ส่วน *B. subtilis* พบได้ทั่วไปในบริเวณที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Joshi and Walia, 1996; Andretta *et al.*, 2004; Mukherjee and Das, 2005; Toledo *et al.*, 2006; Das and Mukherjee, 2007; Pornsunthorntawee *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 2008) มีความสามารถในการย่อยสลายสาร organochlorine (Andretta *et al.*, 2004) และน้ำมันดิบโดยการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพวกลิโปเปปไทด์ (Das and Mukherjee, 2007)

Lee และคณะ (2008) แยกเชื้อ *Klebsiella* sp. Y6-1 จากของเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ โดยสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีองค์ประกอบของเปปไทด์และลิปิดซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 เป็น 32 mN/m ที่ความเข้มข้น 40 mg/L

P. putida พบได้ทั่วไปในบริเวณที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (McNally *et al.*, 1999; Cavalca *et al.*, 2000; Collina *et al.*, 2004; Bonilla *et al.*, 2005 Olivera *et al.*, 2009) โดยมักผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพวกแรมโนลิปิดหรือลิโปเปปไทด์ (Raza *et al.*, 2006; Kuiper et al., 2004)



รูปที่ 1 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 79, 213, 318, 319 และ 1106 วิเคราะห์จากลำดับเบสโดยวิธี 16S rDNA

เอกสารอ้างอิง

Al-Sharidah, A., Richardt, A., Golecki, J.R., Dierstein, R. and Tadros, M.H. 2000. Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait. Microbial. Res., 155: 157-164.

Andretta, C.W.S., Rosa, R.M., Tondo, E.C., Gaylarde, C.C. and Henriques, J.A.P. 2004. Identification and molecular characterization of a *Bacillus subtilis* IS13 strain involved in the biodegradation of 4,5,6-trichloroguaiacol. Chemosphere. 55: 631-639.

Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1995. Short Protocols in Molecular Biology (3rd ed.) John Wiley and Sons, Inc., New York. USA.

Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C. and Frankenberger, W.T. 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. Microbiol. Res., 160: 249-255.

Bernard, D., Pascaline, H. and Jeremie, J.J. 1996. Distribution and origin of hydrocarbons in sediments from lagoons with fringing mangrove communities. Mar. Pollut. Bull., 32: 734-739.

Bicca, C.F., Fleck, L.C. and Ayub, M.A.Z. 1999. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. Braz. J. Microbiol., 30: 231-236.

Billingsley, K.A., Backus, S.M. and Ward, O.P. 1999. Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by Pseudomonas LB400. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52: 255-60.

Bodour, A.A. and Maier, R.M. 1998. Application of a modified dropcollapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. J. Microbiol. Methods 32: 273-280.

Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., Wasserman, J.C.A. and Duran, R. 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. Res. Microbiol., 157: 752-762.

Burns, K.A., Garrity, S.D., Levings, S.C. 1993. How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills?. Mar. Pollut. Bull., 26: 249-257.

Calvo, C., Toledo, F.L. and Gonzalez-Lopez, J. 2004. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. J. Biotechnol., 109: 255-262.

Catallo, W.J. and Portier, R.J. 1992. Use of indigenous and adapted microbial assemblages in the removal of organic chemicals from soils and sediments. Water Sci. Technol., 25: 229-237.

Cavalca, L., Di Gennaro, P., Colombo, M., Andreoni, V., Bernasconi, S., Ronco, I. and Bestetti, G. 2000. Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. Res. Microbiol., 151: 877-887.

Chaineau, C.H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E. and Oudot, J. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agriculture soil. Sci. Total Environ., 227: 237-247.

Chhatre, S., Purohit, H., Shanker, R. and Khanna, P. 1996. Bacterial consortia for crude oil spill remediation. Water Sci. Technol., 34: 187-193.

Collina, E., Bestetti, G., Gennaro, P.D., Franzetti, A., Gugliersi, F., Lasagni, M. and Pitea, D. 2005. Naphthalene biodegradation kinetics in an aerobic slurry-phase bioreactor. Environ. Int., 31: 167-171.

Colores, G.M., Macur, R.E., Ward, D.M. and Inskeep, W.P. 2000. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol., 66: 2959-64.

Cooper, D.G. and Goldberg, B.G. 1987. Surface active agents from to *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol., 53: 224-229.

Cooper, D.G., Zajic, J.E. and Gerson, D.F. 1979. Production of surfaceactive lipids by *Corynebacterium lepus.* Appl. Environ. Microbiol., 37: 4-10.

Dan, L.M., James, R.M. and Donald, R.L. 1999. Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. Chemosphere. 38: 1313-1321.

Das, K. and Mukherjee, A.K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Biores. Technol., 98: 1339-1345.

Dhouib, A., Hamad, N., Hassairi, I. and Sayadi, S. 2003. Degradation of anionic surfactants by *Citrobacter braakii.* Process Biochem., 38: 1245-1250.

Duke, N.C. and Watkinson, A.J. 2002. Chlorophyll-deficient propagules of *Avicennia marina* and apparent longer term deterioration of mangrove fitness in oil-polluted sediments. Mar. Pollut. Bull., 44: 1269-1276.

Edmonds, P., and Cooney J.J. 1969. Lipids of *Pseudomonas aeruginosa* cells grown on hydrocarbons and on trypticase soybean broth. J. Bacteriol., 98: 16-22.

Ferrer, M., Golyshin, P., Timmis, K.N. 2003. Novel maltotriose esters enhance biodegradation of Aroclor 1242 by *Burkholderia cepacia* LB400. World J. Microbiol. Biotechnol., 19: 637-43.

Gilewicz, M., Ni'matuzahroh, T., Nadalig, H., Budzinski, H., Doumenq, P., Michotey, V. and Bertrand, J.C. 1997. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48: 528-533.

Golyshin, P.N., Fredrickson, H.L., Giuliano, L., Rothmel, R., Timmis, K.N. and Yakimov, M.M. 1999. Effect of novel biosurfactants on biodegradation of polychlorinated biphenyls by pure and mixed bacterial cultures. Microbiologica, 22: 257-67.

Guo, C.L., Zhou, H.W., Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Mar. Pollut. Bull., 51: 1054-1061.

Herman, D.C., Lenhard, R.J. And Miller, R.M. 1997. Formation and removal of hydrocarbon residual in porous media: effect of attached bacteria and biosurfactant. Environ. Sci. Technol., 31: 1290-1294.

Huy, N.Q., Jin, S., Amada, K., Haruki, M., Huu, N.B., Hang, D.T., Ha, D.T.C., Imanaka, T., Morikawa, M. and Kanaya, S. 1999. Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. J. Biosci. Biuoeng., 88 : 100-102.

Kim, H.S., Jeon, J.W., Lee, H.W., Park, Y., Seo, W.T., Oh, H.M., Katsuragi, T., Tani, Y. and Yoon, B.D. 2002. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, from *Candida antarctica*. Biotechnol. Lett., 24 : 225-229.

Kleskowski, E.J., Corredor, J.E., Morell, J.M. and Del Castillo, C.A. 1994. Petroleum pollution and mutation in mangroves. Mar. Pollut. Bull., 28: 166–169.

Klle, D.E. and Chiou, C.T. 1989. Water solubility enhancements of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above critical micelle concentration. Environ. Sci. Technol., 23: 832-838.

Koma, D., Hasumi, F., Yamamoto, E., Ohta, T., Chung, S.-Y., and Kubo, M. 2001. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. J. Biosci. Bioeng., 91: 94-96.

Kuiper, I., Lagendijik, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, E.M., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, J.J. and Bloemberg, G.V. 2004. Characterization of two Pseudomonas putida lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. Molecul. Microbiol., 51: 97-113.

Leahy, J. G. and Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev., 54: 305-315.

Lee, S.C., Yoo, J.S., Kim, S.H., Chung, S.Y., Hwang, C.W., Joo, W.H. and Choi, Y.L. 2006. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* A8-8. J. Microbiol. Biotechnol., 16: 716-723.

Mattei, G., Rambeloarisoa, E., Giusti, G., Rontani, J.F. and Betrand, J.C. 1986. Fermentation procedure of a crude oil in continuous culture on seawater. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23: 302-304.

Mercadé, M. E., Monleón, L., de Andeés, C., Rodón, I., Martinez, E., Espuny, M. J. and Manresa, A. 1996. Screening and selecting of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. J. Appl. Bacteriol., 81:161-166.

Olivera, N.L., Commendatore, M.G., Delgado, O. and Esteves, J.L. 2003. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30: 542-548.

Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R. and Banat, I,M. 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresource Technol., 90: 159-168.

Raza, Z.A., Khan, M.S. and Khalid, Z.M. 2007. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. Process Biochem., 42: 686-692.

Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Environ Microbiol; 3: 229-236.

Scheibenbogen, K., Zytner, R.G., Lee, H. and Trevors, J.T. 1994. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactant and some chemical surfactant. J. Chem. Technol. Biotechnol., 59: 53-59.

Sim, L., Ward, O.P. and Li, Z. 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 19: 232-8.

Stelmack, P.L., Gray, M.R. and Pickard, M.A. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. Appl. Environ. Microbiol., 65:163-8.

Tam, N.F.Y., Ke, L., Wang, X.H. and Wong, Y.S. 2001. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. Environ. Pollut., 114: 255-263.

Tam, N.F.Y., Guo, C.L., Yau, W.Y. and Wong, Y.S. 2002. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isaolated from mangrove sediments in Hong Kong. Mar. Pollut. Bullet., 45: 316-324.

Tam, N.F.Y., Wong, T.W.Y. and Wong, Y.S. 2005. A case study on fuel oil contamination in a mangrove swamp in Hong Kong. Mar. Pollut. Bullet., 51: 1092-1100.

Van Dyke, M. I., Couture, P, Brauer, M., Lee, H. and Trevors, J. T. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol., 39: 1071-1078.

Venkateswaran, K., Hoaki, T., Kato, M. and Maruyama, T. 1995. Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil. Can. J. Microbiol., 41: 418-424.

Verma, S., Bhargava, R., Pruthi, V., 2006. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. Int. Biodete. Biodegrad., 57: 207-213.

Yin, B., Gu, J.D., Wan, N. 2005. Degradation of indole by enrichment culture and *Pseudomonas aeruginosa* Gs isolated from mangrove sediment. Int. Biodeter. Biodegr., 56: 243-248.

Youssef, N.H., Dunacn, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M. and McInerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. J. Microbiol. Met., 56: 339-347.

Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y. 2005. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a consortium enriched from mangrove sediments. Environ. Int., 31: 149-154.

Zhang, J., Cai, L., Yuan, D. and Chen, M. 2004. Distribution and sources of polynuclear aromatic hydrocarbons in Mangrove surficial sediments of Deep Bay, China. Mar. Pollut. Bullet., 49: 479-486.

ภาคผนวก

เอกสารสรุปผลงานวิจัยในรูปแบบและภาษาที่เหมาะสมสำหรับการประชาสัมพันธ์เผยแพร่ต่อประชาชนทั่วไป

การปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ในดินหรือในแหล่งน้ำมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเมื่อไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะมีการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ต่างๆ ซึ่งจะทำให้การย่อยสลายยากมากยิ่งขึ้นและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว การกำจัดไฮโดรคาร์บอนซึ่งปนเปื้อนในธรรมชาติมีหลายวิธีแต่การกำจัดโดยวิธีชีววิธี (bioremediation) เป็นวิธีที่ได้นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีค่าใช้จ่ายน้อย และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งไม่เป็นพิษ แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันได้หลายชนิด ซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในสถานที่ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านั้น อย่างไรก็ตามสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำทำให้การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่นเป็นไปได้ยากหรือช้า ดังนั้นหากต้องการเพิ่มความสามารถในการละลายและทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นย่อยสลายได้ดีขึ้นจึงควรมีการใช้สารลดแรงตึงผิวโดยเฉพาะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้งในรูปของสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular) และที่ติดอยู่กับผนังเซลล์จุลินทรีย์ (Cell-bounded) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) สามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะในแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีซับสเตรทไม่ละลายน้ำ (water-immiscible substrate) และใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งอาหาร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและใช้ในการปรับปรุงสภาพแวดล้อม ซึ่งรวมถึงการกำจัดโลหะหนักและสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั้งในดินและน้ำ เพิ่มการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย เพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดคราบน้ำมัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลนที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงเพื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์และเก็บสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไว้เพื่อที่จะได้ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

การศึกษานี้แยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลนในภาคใต้ของประเทศไทยโดยใช้วิธี enrichment culture technique ซึ่งใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1033 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน 89 ตัวอย่าง พบว่า 95 ไอโซเลต สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จากการใช้วิธี drop-collapsing test ในการตรวจสอบ และมี 20 ไอโซเลตที่มี

ศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยสามารถลดแรงตึงผิวได้ดี ไอโซเลต 318 สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด (16.8 mN/m) ซึ่งเป็นไอโซเลตที่แยกได้จากดินจังหวัดสตูล เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการลดแรงตึงผิวมี 5 ไอโซเลต ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี คือ ไอโซเลต 79, 213, 318, 319 และ 1033 เมื่อนำไปเทียบเคียงสายพันธุ์ด้วย 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas putida* ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้นี้มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดสารโดยวิธีการทางชีวภาพในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ต่อไปในอนาคต

สรุป OUTPUTS ที่ได้รับจากการดำเนินงาน

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลน (รหัสโครงการ BRT R_651178)

ตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง กันยายน พ.ศ. 2552

1. การตีพิมพ์บทความในวารสารทางวิชาการ

   อยู่ระหว่างการจัดทำต้นฉบับ (in manuscript) จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

   Atipan Saimmai, Dina Riska, Akio Tani, Kazuhide Kimbara, Vorasan Sobhon and Suppasil Maneerat. Mangrove sediment a new source of potential biosurfactant producing bacteria. To be submitted to International Biodeterioration and Biodegradation.

2. การนำเสนอผลงานในรูปแบบการนำเสนอ Oral presentation จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

   Riska, D. and Maneerat, S. 2008. Isolation and screening of biosurfactant producing bacteria from mangrove sediment. The 2nd International Conference Mathematics and Natural Sciences. Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia. 28-30 October.

3. จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาโท ในโครงการ จำนวน 1 คน ดังนี้

   Miss Dina Riska

   ชื่อวิทยานิพนธ์ Biosurfactant Producing Bacteria from Mangrove Sediment: Isolation, Screening and Optimization

   ระดับการศึกษา ปริญญาโท

ลงนาม.....

(ผศ. ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

วันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2553