



การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้บำบัด
สภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน

Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria for Oil Pollution Remediation

ศัลยา มานะกล้า

Sallaya Manakla

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Environmental Management

Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้บำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน

ผู้เขียน นางสาวศัลยา มานะกล้า

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**คณะกรรมการสอบ**

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี สุขสาโรจน์)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทร์สังขา)

.....
(ดร. อรมาศ สุทธินุ่น)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คັນธโชติ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี สุขสาโรจน์)

.....กรรมการ
(ดร. อรมาศ สุทธินุ่น)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี สุขสาโรจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวศัลยา มานะกล้า)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวศัลยา มานะกล้า)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้บำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน
ผู้เขียน	นางสาวศัลยา มานะกล้า
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างน้ำทะเลปนเปื้อนคราบน้ำมัน บริเวณท่าเรือลิเกา ท่าเรือกันตัง และท่าเรือสงขลา พบว่ามีแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหาร mineral salt medium (MSM) ที่เติมน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน 2% (v/v) เมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาผ่านการคัดเลือกขั้นแรกเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยพิจารณาจากค่าความสามารถในการกระจายน้ำมันและให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี drop-collapse พบว่าแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ ไอโซเลท S1 S2 K1 T1 และ T4 จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทมาผ่านการคัดเลือกขั้นที่สอง โดยพิจารณาจากค่า emulsification index (E_{24}) พบว่าเชื้อ S2 ให้ค่า E_{24} มากที่สุด คือ 55.10 % ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อนำเชื้อ S2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ และใช้เทคนิค 16S rDNA สามารถเทียบเคียงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย S2 คือ *Bacillus cereus* จากการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นของปัจจัยศึกษาของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนระหว่างกลูโคสต่อ NaNO_3 เท่ากับ 10:1 (w/w) ให้ค่า E_{24} สูงสุดเท่ากับ 63.47% จากนั้นใช้การออกแบบ Box-Behnken และเทคนิค response surface methodology (RSM) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 3 % (w/v) ความเข้มข้น NaNO_3 0.5 % (w/v) และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ S2 ในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล 2% (v/v) โดยวิธีการชั่งน้ำหนักน้ำมันดีเซลที่หายไป (weight loss method) พบว่าน้ำทะเลที่มีการเติมเชื้อ 2% (v/v) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเท่ากับ 40.46% ที่เวลา 7 วัน ส่วนชุดควบคุมมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเท่ากับ 0.61% และเมื่อนำตัวอย่างไปทดสอบด้วย GC-MS เพื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลก่อนและหลังการเติมเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยพิจารณาจากพื้นที่ใต้กราฟพบการย่อยสลายของสารประกอบ alkanes ตั้งแต่ C_{11} - C_{28} ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลุ่มเอสเทอร์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโมเลกุลต่ำ (C_9 - C_{10})

Thesis Title Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria for Oil Pollution Remediation.
Author Miss Sallaya Manakla
Major Program Environmental Management
Academic Year 2557

ABSTRACT

The result of hydrocarbon degrading bacteria isolation from oil-spilled seawater samples that were collected from Sikao, Kantang, and Songkhla harbors revealed ten isolates that can grow in mineral salt medium (MSM) supplemented with 2% (v/v) diesel as a carbon source. When these isolates were studied their abilities for biosurfactant production in the primary screening step by considering their oil displacement values and positive results to drop-collapse, five isolates including S1, S2, K1, T1, and T4 were selected. Then the selected five isolates were investigated their emulsification activities in the secondary screening step. It was found that S2 yielded the highest emulsification activity, 55.10% at 72 hours. The S2 was identified as *Bacillus cereus* based on its physiological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The preliminary study to optimize the biosurfactant production by *Bacillus cereus* showed MSM containing glucose as a carbon source, sodium nitrate as nitrogen source and ratio of glucose to sodium nitrate as 10:1 (w/w) was optimal condition. It yielded the maximum emulsification index of 63.47%. Then the biosurfactant production was optimized using Box-Behnken design and response surface methodology (RSM). The maximum emulsification activity was obtained under the optimal condition, 3 % (w/v) of glucose concentration, 0.5 % (w/v) of sodium nitrate concentration and initial pH at 6. After that the efficiency of strain S2 for diesel oil degradation by weight loss method was investigated. The result showed that the culture with 2% (v/v) of inoculums yielded degrading activity by 40.46% within 7 days whereas the control experiment yielded degrading activity only 0.61%. When the sample was analyzed with GC-MS, it was found that molecular alkanes compounds (C₁₁-C₂₈) in diesel oil was degraded to be ester compounds and low molecular alkanes compounds (C₉-C₁₀).

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญตารางภาคผนวก	(12)
สารบัญภาพประกอบ	(13)
สารบัญภาพประกอบภาคผนวก	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำตั้งเรื่อง	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
2.1 การร่วไหลของน้ำมันในทะเล	4
2.1.1 สาเหตุการร่วไหลของน้ำมันในทะเล	4
2.1.2 พฤติกรรมของน้ำมันเมื่อร่วไหลในทะเล	5
2.1.3 ผลกระทบของน้ำมันร่วไหลต่อสิ่งแวดล้อม	8
2.1.4 การบำบัดการปนเปื้อนน้ำมัน	9
2.2 สารลดแรงตึงผิว (Surfactant)	12
2.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)	14
2.4 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล	20
2.5 การวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	21
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์	23
2.7 การนำสารลดแรงตึงผิวไปใช้ประโยชน์	26
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	28
3.1 วัสดุ อุปกรณ์	28
3.2 วิธีการทดลอง	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 (ต่อ)	
3.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล	29
3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน จากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมัน	29
3.2.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นแรก (Primary screening)	30
3.2.4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นสอง (Secondary screening)	31
3.2.5 การเทียบเคียงและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก	32
3.2.6 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นของปัจจัยศึกษา	32
3.2.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	34
3.2.8 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรีย คัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ	34
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	36
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน	36
4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	37
4.2.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นที่ 1	37
4.2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นที่ 2	40
4.3 การเทียบเคียงและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก	43
4.4 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นของปัจจัยศึกษา	45
4.4.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน	45
4.4.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	46
4.4.3 อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน	47
4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	48
4.6 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก ในระดับห้องปฏิบัติการ	53
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	57
5.1 บทสรุป	57
5.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยเพิ่มเติม	58
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	66

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก (ต่อ)	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม	67
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์	69
ภาคผนวก ค ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ	70
ประวัติผู้เขียน	78

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1-1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ	18
ตารางที่ 3-1 สภาวะในการวิเคราะห์สารไฮโดรคาร์บอนด้วยเครื่อง GC-MS	35
ตารางที่ 4-1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop-collapse และ oil displacement ของจุลินทรีย์คัดแยก 10 ไอโซเลท	38
ตารางที่ 4-2 คุณสมบัติของแบคทีเรียคัดเลือก	44
ตารางที่ 4-3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ <i>B. cereus</i> จากแหล่งคาร์บอน ต่างๆ	46
ตารางที่ 4-4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ <i>B. cereus</i> จากแหล่งไนโตรเจน ต่างๆ	47
ตารางที่ 4-5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ <i>B. cereus</i> ที่อัตราส่วนของ แหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่างๆ	48
ตารางที่ 4-6 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	48
ตารางที่ 4-7 ผลของปัจจัยต่อค่า emulsification index (E_{24})	49
ตารางที่ 4-8 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระดับห้องปฏิบัติการ	53

สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางที่ ค-1 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง	70
ตารางที่ ค-2 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนอง	75
ตารางที่ ค-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน	75

สารบัญภาพประกอบ

	หน้า	
ภาพที่ 2-1	กระบวนกรทางเคมีและกายภาพของคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล	5
ภาพที่ 2-2	ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรคาร์บอน	7
ภาพที่ 2-3	การรวมตัวกันของส่วนหางหรือส่วนที่ชอบน้ำทำให้เกิด micelle	12
ภาพที่ 2-4	ค่าแรงตึงผิว ค่า interfacial tension และค่า critical micelle concentration (CMC)	13
ภาพที่ 2-5	กระบวนกรนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย	14
ภาพที่ 2-6	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิด (A) rhamnolipids จาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B) trehalolipids จาก <i>Rhodococcus erythropolis</i> (C) sophorolipids จาก <i>Torulopsis bombicola</i>	15
ภาพที่ 2-7	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์ ที่ผลิตโดย <i>Bacillus subtilis</i>	16
ภาพที่ 2-8	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มฟอสโฟลิปิด	17
ภาพที่ 2-9	โครงสร้างของ emulsan ผลิตโดย <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	18
ภาพที่ 4-1	ลักษณะหยดน้ำมันเมื่อทดสอบด้วยวิธี drop-collapse ไม่เกิดการสลายตัวของหยดน้ำมัน (ด้านซ้าย) เกิดการสลายตัวของหยดน้ำมัน (ด้านขวา)	39
ภาพที่ 4-2	ลักษณะแผ่นฟิล์มน้ำมันในการทดสอบด้วยวิธี oil displacement test (a) ก่อนหยด culture broth (b) หลังหยด culture broth	39
ภาพที่ 4-3	ลักษณะการเกิดกิจกรรมอิมัลชันของแบคทีเรียคัดเลือก 5 ไอโซเลท ที่ 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยน้ำมันเครื่อง	40
ภาพที่ 4-4	ผลของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันแบคทีเรียคัดเลือก 5 ไอโซเลท ทดสอบด้วยน้ำมันเครื่อง	41
ภาพที่ 4-5	กราฟการเจริญเติบโตและกิจกรรมการเกิดอิมัลชันของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก S2	42
ภาพที่ 4-6	ลักษณะ โคลินีเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus cereus</i> S2	43
ภาพที่ 4-7	กราฟโครงร่างระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและความเข้มข้น NaNO_3	50
ภาพที่ 4-8	กราฟโครงร่างระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและ pH เริ่มต้น	51
ภาพที่ 4-9	กราฟโครงร่างระหว่างความเข้มข้น NaNO_3 และ pH เริ่มต้น	52

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4-10 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรีย คัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน (a) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ (b) ชุดตัวอย่าง ที่มีการเติมเชื้อ	54
ภาพที่ 4-11 โครมาโตแกรมการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS (a) น้ำตัวอย่างวันที่ 0 (b) น้ำตัวอย่างวันที่ 7	56

สารบัญภาพประกอบภาคผนวก

	หน้า
ภาพที่ ข-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ / Nucleotide sequence (s) ของแบคทีเรียคัดเลือก S2	69
ภาพที่ ข-1 ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์	69
ภาพที่ ค-1 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง	73
ภาพที่ ค-2 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูล	73
ภาพที่ ค-3 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย	74
ภาพที่ ค-4 พื้นที่ผิวผลตอบสนองของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันระหว่างความเข้มข้น กลูโคสและความเข้มข้น NaNO_3	76
ภาพที่ ค-5 พื้นที่ผิวผลตอบสนองของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันระหว่างความเข้มข้น กลูโคส และ pH เริ่มต้น	76
ภาพที่ ค-6 พื้นที่ผิวผลตอบสนองของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันระหว่างความเข้มข้น NaNO_3 และ pH เริ่มต้น	77
ภาพที่ ค-7 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยเพื่อให้ได้กิจกรรมการ เกิดอิมัลชัน	77

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำตั้งเรื่อง

มนุษย์พยายามนำเอาทรัพยากรธรรมชาติมาใช้ประโยชน์เพื่อความเป็นอยู่อย่างสะดวกสบายในชีวิตประจำวัน น้ำมันนับว่าเป็นทรัพยากรที่ถูกนำมาใช้มากที่สุดในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการคมนาคม จากสถิติการใช้น้ำมันสำเร็จรูปในประเทศไทยพบว่า มีการใช้น้ำมันดีเซลมากเป็นอันดับหนึ่ง (ร้อยละ 46) รองลงมาเป็นน้ำมันเบนซิน (ร้อยละ 27) และน้ำมันอื่นๆ (ร้อยละ 37) (กระทรวงพลังงาน, 2554) จากการใช้ประโยชน์นี้เองบางครั้งทำให้เกิดปัญหาที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ หรืออาจเกิดจากการขาดความระมัดระวังทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป ตัวอย่างเช่น เมื่อ 20 เมษายน พ.ศ. 2553 เกิดอุบัติเหตุระเบิดและเพลิงไหม้แท่นขุดเจาะน้ำมัน Deepwater Horizon ในอ่าวเม็กซิโกของบริษัท British Petroleum (BP) ทำให้เกิดน้ำมันรั่วไหลสู่ทะเล ซึ่งนับเป็นหายนะต่อสิ่งแวดล้อมครั้งใหญ่ครั้งหนึ่งของโลก แม้ว่าประเทศไทยจะประสบปัญหาเหตุน้ำมันรั่วไหลไม่มากนัก จากรายงานของกรมควบคุมมลพิษ ในระหว่างปี พ.ศ. 2519-2553 เคยเกิดเหตุน้ำมันรั่วไหลที่ได้ดำเนินการตรวจสอบและจัดการแก้ไขร่วมมือกับหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง 124 เหตุการณ์ สาเหตุของการรั่วไหลในประเทศไทยได้แก่ 1) อุบัติเหตุ เช่น เรืออับปาง รั่วไหลจากแท่นขุดเจาะน้ำมัน 2) การลักลอบทิ้ง เช่น ปล่อน้ำมันล้างน้ำมันชนิดเดิมก่อนบรรทุกน้ำมันชนิดใหม่ หรือลักลอบถ่ายน้ำถ่วงท้องเรือและน้ำอับเฉาเรือ จึงได้มีการจัดทำแนวทางการควบคุมและจัดการน้ำอับเฉาเรือ จากองค์การทางทะเลระหว่างประเทศ (International Maritime Organization : IMO) เพื่อหาทางป้องกันและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น 3) การรั่วไหลระหว่างการสูบน้ำมันกลางทะเลจากเรือขนาดใหญ่ลงสู่เรือขนาดเล็ก หรือระหว่างเรือกับท่าเทียบเรือ 4) อุปกรณ์ที่ใช้ในการเดินเรือ เกือบกัก หรือสูบน้ำมันชำระ 5) สาเหตุอื่นๆ ซึ่งเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลแต่ละครั้งก็ทำให้เกิดผลกระทบต่อชายฝั่งอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ นอกจากนี้ น้ำมันที่เล็ดลอดมาจากกิจกรรมต่างๆ ตามแหล่งชุมชน ท่าเรือ โรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคม จากอู่ซ่อมรถหรือปั้มน้ำมัน ทำให้เกิดคราบน้ำมันปนเปื้อนอยู่มาก ขาดต่อการกำจัด และนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2553)

การกำจัดคราบน้ำมันสามารถกระทำได้หลายวิธี ซึ่งวิธีที่นำมาใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเลหรือมหาสมุทร ใช้วิธีทางกายภาพได้แก่ การใช้ทุ่นน้ำมัน (boom) เพื่อเก็บกักน้ำมันที่รั่วไหลให้มากที่สุดและดูดเก็บน้ำมันด้วยเครื่องเก็บคราบน้ำมัน (skimmer) และถ้าไม่สามารถใช้วิธีทางกายภาพกำจัดคราบน้ำมันได้ในทันทีหรือยังคง

มีคราบน้ำมันที่หลงเหลือจากการใช้วิธีทางกายภาพแล้ว ก็สามารถเลือกใช้สารเคมีกำจัดคราบน้ำมัน โดยสารเคมีนี้จะทำให้คราบน้ำมันแตกตัวเป็นอนุภาคเล็กๆ ซึ่งอนุภาคน้ำมันจะแขวนลอยอยู่ในน้ำ และเจือจางไปกับคลื่นลมในทะเลรวมทั้งเกิดกระบวนการย่อยสลายทางเคมีจากการทำปฏิกิริยากับ ออกซิเจนและแสงแดด และการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ในทะเล

วิธีการกำจัดคราบน้ำมันอีกวิธีหนึ่งคือการใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายตามธรรมชาติ (biodegradation) พบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายคราบน้ำมันดิบ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้เป็นอย่างดี วิธีการเร่งกระบวนการย่อยสลายโดย จุลินทรีย์ในธรรมชาติ (bioremediation) ได้ถูกนำมาใช้มากขึ้น เพื่อให้กระบวนการกำจัดสาร เหล่านี้เกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การเพิ่มธาตุอาหาร การใส่จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการ ย่อยสลายสูงลงไปในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน หรือเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactants) เพื่อเพิ่ม ความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้สารประกอบ ไฮโดรคาร์บอนอยู่ในสภาพหรืออยู่ในรูปที่ง่ายต่อการที่จุลินทรีย์จะเข้าย่อยสลายสารดังกล่าว (bioavailable form) อย่างไรก็ตาม การนำสารลดแรงตึงผิวไปใช้ประโยชน์นั้นต้องพิจารณาอย่าง รอบคอบ เพราะสารลดแรงตึงผิวสามารถทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน ถ้ามีการ นำไปใช้ในปริมาณที่ไม่ถูกต้อง และใช้อย่างผิดประเภท เมื่อมีการใช้และปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมแล้ว อาจต้องใช้เวลาในการย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์จนกว่าจะหมดไป (Kawamura, 2000) สารลดแรงตึงผิวบางชนิดที่มีการประกาศห้ามใช้ เช่น alkyl benzene sulfonate (ABS) เนื่องจากเป็น สารที่ย่อยสลายยาก จึงมีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) แทนการใช้สารลดแรงตึง ผิวที่ได้จากกระบวนการเคมีสังเคราะห์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตโดยจุลินทรีย์ หลายหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยจุลินทรีย์จะผลิตสารลดแรงตึงผิวบริเวณผิวเซลล์ หรือผลิตภายในเซลล์แล้วถูกส่งออกมาภายนอก สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดีคือ ย่อยสลายได้ โดยธรรมชาติ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีความจำเพาะเจาะจง และทนต่อสภาวะต่างๆ ได้ดี เช่น อุณหภูมิและความเป็นกรด่างสูงได้ (Desai and Banat, 1997) แต่การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในทางอุตสาหกรรมนั้นยังมีข้อจำกัดเนื่องจากต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีราคาสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ดังนั้นจะต้องทำการปรับปรุงกระบวนการผลิตและ หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณมากเพื่อลดต้นทุนในการ ผลิต

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียสายพันธุ์ ต่างประเทศหลายเรื่อง แต่บางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิของประเทศไทย (18 ถึง 36 องศาเซลเซียส) ในการวิจัยครั้งนี้จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียท้องถิ่นที่สามารถย่อยสลาย

น้ำมันจากความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน และหาสภาวะที่เหมาะสม ส่งเสริมให้เชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณสูงสุด เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดน้ำมันและด้านอื่นๆต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมัน
- 2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
- 3) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)
- 2) สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลต่อไป

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ทำการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซล และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณท่าเรืออำเภอเสียมะนิ อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง และท่าเรือจังหวัดสงขลา เทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยการพิจารณาถิ่นฐาน ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rDNA หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 การรั่วไหลของน้ำมันในทะเล

สถานการณ์น้ำมันรั่วไหลในประเทศไทยจากรายงานของกรมควบคุมมลพิษ ระหว่างปี พ.ศ. 2519-2553 มีทั้งหมด 124 เหตุการณ์ แหล่งรั่วไหลในทะเลที่สำคัญมาจากกิจกรรม การเดินเรือ เช่น การเดินเรือ การเปลี่ยนถ่ายน้ำมัน เป็นต้น (ร้อยละ 45) จากอุบัติเหตุการรั่วไหล (ร้อยละ 25) และอุตสาหกรรมที่อยู่บริเวณชายฝั่ง เช่น แท่นขุดเจาะ (ร้อยละ 18) และจากสาเหตุอื่นๆ (ร้อยละ 12) การรั่วไหลจากกิจกรรมการเดินเรือซึ่งเป็นการปนเปื้อนของน้ำมันเชื้อเพลิงหรือน้ำมันหล่อลื่นระหว่างการเดินเรือและบริเวณท่าเรือ มาจากส่วนท่อท้ายเรือและส่วนเครื่องยนต์ที่จม อยู่ในน้ำและการลักลอบทิ้ง ซึ่งจัดเป็นมลพิษที่มีจุดกำเนิดไม่แน่นอน (non-point source) ซึ่งจัดการ ได้ยาก การพิจารณาแนวทางเพื่อรับมือการปนเปื้อนน้ำมันไม่ควรมุ่งเน้นเฉพาะเหตุการณ์ใหญ่ ๆ ควรให้ความสำคัญกับการจัดการน้ำมันจากแหล่งอื่นๆ ในภาพรวมจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อการป้องกัน และแก้ปัญหาผลกระทบจากน้ำมันต่อสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน (พิสุทธิ เพ็ชรมนกุล และณัฐวิญญ์ ชวลิตพรศิยา, 2557)

2.1.1 สาเหตุการรั่วไหลของน้ำมันในทะเล

1) อุบัติเหตุ เกิดจากอุบัติเหตุทางเรือขนส่งน้ำมันและเรือประเภทอื่นๆ เช่น เรือชนกัน การอับปางของเรือ เป็นต้น การขนส่งน้ำมันด้วยเรือบรรทุกน้ำมันเป็นวิธีการที่ใช้ในการขนถ่าย น้ำมันปริมาณมากทั้งในรูปน้ำมันดิบและน้ำมันที่ผ่านกระบวนการกลั่นแยกแล้ว เมื่อเกิดอุบัติเหตุ การรั่วไหลของน้ำมันจากเรือบรรทุกน้ำมันจะเป็นลักษณะการรั่วไหลแบบครั้งเดียวในปริมาณมาก ซึ่งการรั่วไหลในลักษณะนี้จะทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในวงกว้างและมีความรุนแรงหาก ไม่ได้รับการจัดการอย่างถูกต้อง

2) การลักลอบทิ้ง เกิดจากการแอบถ่ายน้ำมันเครื่องและการแอบทิ้งน้ำปนน้ำมันในท้อง เรือ โดยทั่วไปเมื่อเรือน้ำมันขนส่งน้ำมันเสร็จแล้วต้องการเปลี่ยนผลิตภัณฑ์น้ำมันชนิดใหม่ ต้องทำ การล้างถัง หรือลักลอบถ่ายน้ำถ่วงท้องเรือและน้ำอับเฉาเรือ

3) การรั่วไหลระหว่างการสูบน้ำมันกลางทะเล เกิดจากการขนถ่ายน้ำมันทางทะเลใน กรณีที่ไม่สามารถนำเรือใหญ่เข้าเทียบท่าเรือได้ จึงต้องทำการขนถ่ายน้ำมันจากเรือใหญ่ลงเรือขนาดเล็ก และนำมาเก็บในถังเก็บน้ำมันหรือสู่วังกลั่นน้ำมัน หรือระหว่างเรือกับท่าเทียบเรือ ซึ่งมีโอกาส ที่จะก่อให้เกิดการรั่วไหลของน้ำมันลงทะเลได้

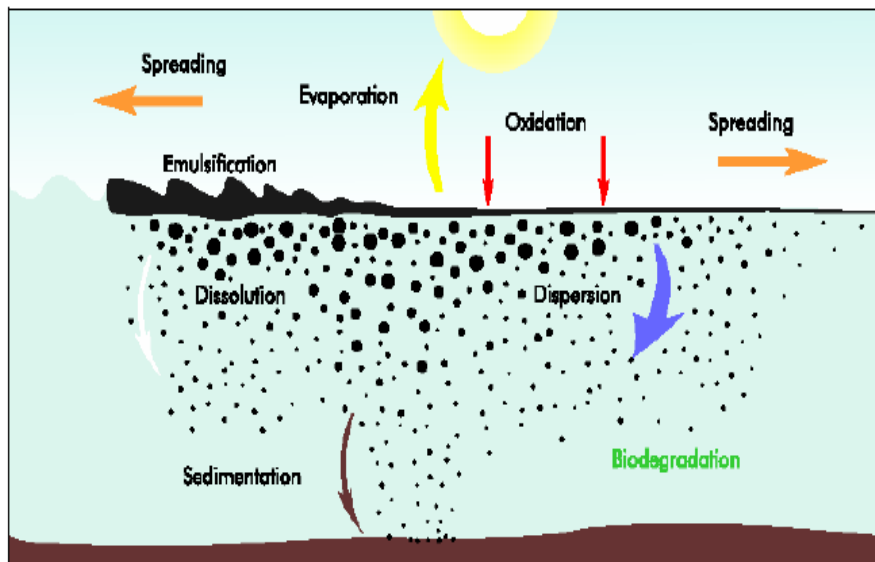
4) อุปกรณ์ที่ใช้ในการเดินเรือ เก็บกัก หรือถ่ายสูบน้ำมันชำรุด

5) สาเหตุอื่นๆ เช่น รั่วไหลจากแท่นขุดเจาะปิโตรเลียมในทะเล หรือรั่วไหลตามธรรมชาติ (กรมควบคุมมลพิษ, 2553)

2.1.2 พฤติกรรมของน้ำมันเมื่อรั่วไหลในทะเล

เมื่อน้ำมันรั่วไหลในทะเลจะเกิดกระบวนการทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น การระเหยและการละลาย ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของน้ำมัน การเปลี่ยนแปลงทางเคมี ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนในน้ำ แสงแดดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และหลังจากนั้นกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพจะมีบทบาทที่สำคัญในการกำจัดคราบน้ำมัน โดยเมื่อระยะเวลาผ่านไปน้ำมันที่หลงเหลือถูกพัดเข้าสู่ชายหาดจะสะสมอยู่ในบริเวณใต้พื้นทราย ส่วนคราบน้ำมันที่ผิวทราก็จะได้รับอิทธิพลของคลื่นลมโดยตรง ทำให้เกิดการชะล้างเอาน้ำมันที่ปนเปื้อนออกไป (ITOPF, 2014) ดังภาพที่ 2-1

1) การแพร่กระจาย (spreading) การแพร่กระจายของคราบน้ำมันจะเกิดขึ้นทันทีบริเวณผิวน้ำทะเลเมื่อเกิดการรั่วไหลโดยมีสาเหตุจากลมและการไหลเวียนของกระแสน้ำ ขอบเขตการแพร่กระจายขึ้นกับค่าความหนืด ปริมาณน้ำมันที่รั่วไหล ความหนาแน่น และแรงตึงผิวของน้ำมัน เมื่อเกิดการรั่วไหลน้ำมันที่มีความหนืดต่ำจะแพร่กระจายได้เร็วกว่าน้ำมันที่มีความหนืดสูง การใช้ทุ่นล้อมรอบน้ำมันเอาไว้จะทำให้การเก็บคราบน้ำมันด้วยเครื่องดูดน้ำมันมีประสิทธิภาพขึ้น



ภาพที่ 2-1 กระบวนการทางเคมีและกายภาพของคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล
ที่มา : ITOPF (2014)

2) การระเหย (evaporation) น้ำมันที่ลอยอยู่บนผิวน้ำจะมีอัตราการระเหยสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับขนาดพื้นที่ของน้ำมันที่ลอย (slick area) ชนิดของน้ำมัน (type of oil) อุณหภูมิของน้ำมัน (oil temperature) และความเร็วม (wind velocity) น้ำมันดิบเป็นสารประกอบที่ซับซ้อน พวกที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนต่ำกว่า 15 อะตอม (จุดเดือดต่ำกว่า 250 องศาเซลเซียส) จะระเหยไปจากน้ำภายใน 2-3 วัน ทำให้น้ำมันสูญหายไปร้อยละ 25-30 ส่วนพวกที่มีคาร์บอนอะตอมอยู่ในช่วง 15-25 อะตอม (จุดเดือดระหว่าง 250-400 องศาเซลเซียส) จะระเหยได้เพียงเล็กน้อย ส่วนพวกไฮโดรคาร์บอนที่มีคาร์บอนอะตอมมากกว่า 25 อะตอม (จุดเดือดสูงกว่า 400 องศาเซลเซียส) แทบไม่มีการระเหย คลื่น ลม และอุณหภูมิที่สูงขึ้นสามารถเร่งการระเหยได้ (Parker *et al.*, 1970) ซึ่งอัตราการระเหยของน้ำมันจะเร็วในช่วงแรกเนื่องจากสารระเหย (volatile) จะระเหยออกจากมวลน้ำมัน จนเหลือสารที่ไม่ระเหย (non-volatile) ซึ่งน้ำมันส่วนนี้เรียกว่า มูส (mousse) เป็นน้ำมันที่มีความถ่วงจำเพาะสูง ความหนืดสูง และจะจมลงสู่พื้นน้ำใน (ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์, 2533)

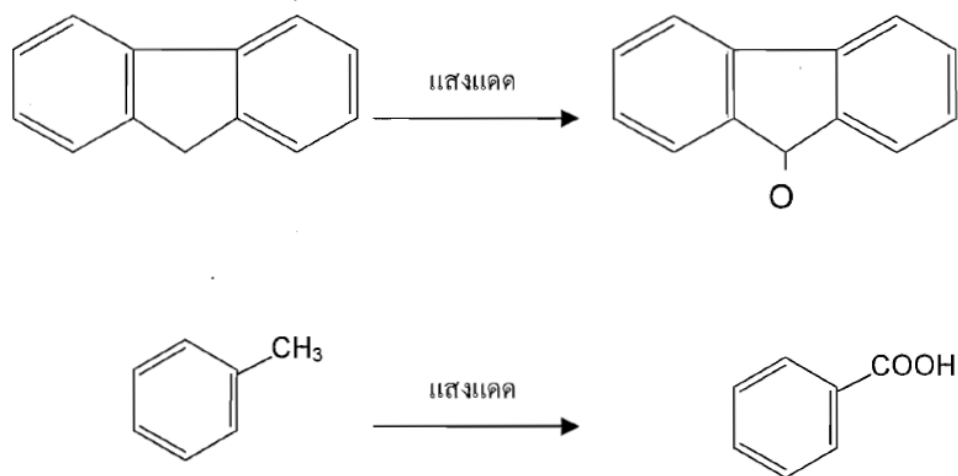
3) การละลาย (dissolution) น้ำมันปิโตรเลียมแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ต่างกัน กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยสามารถละลายน้ำได้ดีกว่ากลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับจำนวนอะตอมของคาร์บอน โครงสร้างของโมเลกุล ชาติที่เป็นองค์ประกอบ อิทธิพลของกระแสลม สภาพของแหล่งน้ำ และอื่นๆ การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนทางเคมีและชีวภาพมีส่วนสำคัญ เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำให้ไฮโดรคาร์บอนมีความสามารถในการละลายน้ำได้สูง (นิรันดร์ วิชัยสกุล, 2544)

4) การเกิดอิมัลชัน (emulsification) เป็นการผสมระหว่างน้ำมันกับน้ำ ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นอิมัลชัน (emulsion) ที่มีความหนืดเพิ่มขึ้นจึงทำให้กำจัดได้ยาก ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้กระบวนการกำจัดและการย่อยสลายเกิดขึ้นได้ยาก การเกิดอิมัลชันสามารถเพิ่มปริมาณของมูสได้มากถึง 5 เท่าของปริมาณน้ำมันที่รั่วไหล ทำให้ต้องใช้แรงงานคนและเครื่องจักรในการกำจัดมากขึ้น การผสมกันของน้ำมันกับน้ำจะเป็นไปอย่างรวดเร็วหากมีความเร็วมมากกว่า beaufort scale ระดับ 3 (ความเร็วมประมาณ 3.5-5 เมตรต่อวินาที)

5) การตกตะกอน (sedimentation) เกิดจากกระบวนการระเหยทำให้น้ำมันมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น หรือรวมตัวกันของอนุภาคที่กระจายอยู่ในน้ำ การดูดซึมและดูดซับไฮโดรคาร์บอนของอนุภาคแขวนลอย สารที่เหลือจากกระบวนการเหล่านี้จะมีลักษณะเป็นสารกึ่งแข็งลอยบริเวณผิวน้ำ ต่อมาจะแตกเป็นอนุภาคเล็กๆ และจมสู่ท้องน้ำ ส่วนอนุภาคของน้ำมันที่ละลายในน้ำจะรวมตัวกัน หรือเกาะกับสารแขวนลอยแล้วตกตะกอน พบมากบริเวณปากแม่น้ำ

6) ปฏิกิริยาโฟโตออกซิเดชัน (photo-oxidation) เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันซึ่งเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและออกซิเจนในอากาศโดยเกิดขึ้นบนผิวของน้ำทะเล ก่อให้เกิดสารที่ละลายน้ำได้ โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบในน้ำมัน เช่น อะโรมาติก

ไฮโดรคาร์บอนถูกเปลี่ยนสภาพโดยพลังงานแสงอาทิตย์ได้เร็วกว่ากลุ่มอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน และกลุ่มอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดโครงสร้างกิ่งก้านถูกย่อยสลายเร็วกว่าโครงสร้างโซ่ตรง ช่วงความยาวคลื่นแสงของอุลตราไวโอเล็ต (ต่ำกว่า 350 นาโนเมตร) ผลผลิตที่ได้เป็นกรดคาร์บอกไซคลิก แอลกอฮอล์ คีโตนและฟีนอล ซึ่งละลายน้ำได้ดีกว่าน้ำมัน (ภาพที่ 2-2) ปฏิกริยาฟิโตออกซิเดชันไม่สามารถทำให้คราบน้ำมันสลายได้มากนักแม้จะอยู่ในสถานะที่มีแสงอาทิตย์จัด ชั้นน้ำมันหนืดที่หนาหรืออิมัลชันมีโอกาสที่จะทำปฏิกริยากับออกซิเจนจนเกิดเป็นสารที่ไม่ย่อยสลาย (นิรันทร์ วิชัยสกุล, 2544)



ภาพที่ 2-2 ปฏิกริยาออกซิเดชันของไฮโดรคาร์บอน

ที่มา : Geyer (1980)

7) การย่อยสลายโดยธรรมชาติ (biodegradation) ในน้ำทะเลจะมีสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กซึ่งมีความสามารถย่อยน้ำมันอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา สาหร่าย และโปรโตซัว ปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการย่อยน้ำมันได้แก่ คุณสมบัติของน้ำมัน ออกซิเจน อาหารโดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส และอุณหภูมิ สิ่งมีชีวิตกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งจะสามารถย่อยส่วนประกอบของน้ำมันได้ส่วนใดส่วนหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นในการย่อยทุกองค์ประกอบของน้ำมันจะต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตหลากหลายสายพันธุ์ การใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ทำให้น้ำมันแตกออกเป็นหยดๆ จะเพิ่มอัตราการย่อยโดยธรรมชาติเนื่องจากพื้นที่ผิวที่เพิ่มมากขึ้น ในทางกลับกันน้ำมันที่ลอยไปติดบนหาดทรายเหนือระดับน้ำจะมีอัตราการย่อยสลายโดยธรรมชาติต่ำเนื่องจากพื้นที่ผิวน้อยและไม่สามารถสัมผัสน้ำได้ (พิสุทธิ์ เพ็ชรมนกุล และปฏิภาณ ปัญญาพลกุล, 2556)

2.1.3 ผลกระทบของน้ำมันรั่วไหลต่อสิ่งแวดล้อม

เมื่อน้ำมันรั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำและแพร่กระจายออกไปยังที่ต่างๆ ก็จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติ เศรษฐกิจ การประมง และประชาชนซึ่งใช้ประโยชน์พื้นที่แนวชายฝั่ง แบ่งออกเป็นผลกระทบ 3 ด้าน คือ

1) ผลกระทบด้านกายภาพ

เมื่อน้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเล น้ำมันจะลอยอยู่บนผิวน้ำเนื่องจากความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ของน้ำมันจะต่ำกว่าน้ำ ดังนั้นผลกระทบด้านกายภาพ ได้แก่ น้ำมันที่ลอยอยู่บนผิวน้ำจะบดบังหรือกั้นแสงอาทิตย์ไม่ให้ส่องผ่านลงไปใต้น้ำได้สะดวก ทำให้เกิดผลกระทบผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ น้ำมันไปขัดขวางการแลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างอากาศและน้ำ ทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลง น้ำมันชนิดที่มีสีทึบ เช่น น้ำมันดิบ น้ำมันเตา เป็นต้น จะสามารถดูดซับความร้อน (heat absorption) จากแสงอาทิตย์ได้ดีกว่าน้ำมันที่มีสีจางกว่า เช่น น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล เป็นต้น ทำให้น้ำมันมีอุณหภูมิสูงขึ้น

2) ผลกระทบด้านชีวภาพ

น้ำมันเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) เมื่อน้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเลย่อมก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำจำพวกพืชและสัตว์ สัตว์ที่ได้รับผลกระทบได้แก่ สัตว์น้ำทุกชนิด ปะการัง แพลงก์ตอน สัตว์เปลือกแข็ง นกทะเล แมวน้ำ สิงโตทะเล แต่ที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดและมีอัตราการตายสูงมักเป็นพวกนกที่หากินในน้ำและตามชายฝั่ง นกที่เปื้อนคราบน้ำมันมักตายเพราะอุณหภูมิในร่างกายสูงเกินไป เนื่องจากไม่สามารถแพร่กระจายความร้อนได้ (hypothermia) และ/หรือเป็นเพราะกินน้ำมันเข้าไปในร่างกายจากพฤติกรรมไชร้งัน โดยน้ำมันจะส่งผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของนกน้ำและการสืบพันธุ์ รวมทั้งหยุดยั้งการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในนกซึ่งจะมีเปลือกบางและไม่สามารถฟักออกเป็นตัวได้

ลักษณะของความเป็นพิษอาจเกิดจากการสัมผัสคราบน้ำมัน โดยตรงหรือเกิดจากการขาดออกซิเจน และเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกแพลงก์ตอนและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก นอกจากนี้พวกพืชน้ำบริเวณชายฝั่ง ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของนกและสัตว์น้ำอื่นๆ อาจได้รับพิษจากการดูดซึมน้ำมัน ทำให้สัตว์น้ำที่หากินพืชตายทันทีแบบเฉียบพลัน หรืออาจก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเรื้อรังต่อสิ่งมีชีวิตซึ่งดูดซึมเอาหยดน้ำมันขนาดเล็กเข้าสะสมในเนื้อเยื่อและพิษเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในระบบนิเวศน์ต่อไป เกิดการสะสมสารพิษในห่วงโซ่อาหาร คราบน้ำมันทำลายระบบนิเวศน์ป่าชายเลนซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของสัตว์นานาชนิดทั้งสัตว์น้ำและสัตว์บก เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่สมบูรณ์ เป็นแหล่งวางไข่และแหล่งอนุบาลสัตว์ในวัยอ่อน ถ้ามีคราบน้ำมันเคลื่อนตัวเข้าสู่ป่าชายเลนจะทำการขจัดได้ยากมาก เนื่องจากการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆถูกจำกัด ทำให้คราบน้ำมันคงตัวอยู่นาน สิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิดรวมทั้ง

ป่าชายเลนจะถูกทำลาย นอกจากนี้ลักษณะของป่าชายเลนยังมีความอ่อนไหวต่อน้ำมัน เนื่องจากคราบน้ำมันเคลือบรากของต้นไม้ป่าชายเลนไม่สามารถหายใจได้ทำให้ต้นไม้ตายในเวลาอันรวดเร็ว หรืออาจส่งผลต่อการเจริญเติบโต น้ำมันบางส่วนตกตะกอนทำให้ดินบริเวณนั้นเป็นพิษ

3) ผลกระทบด้านเศรษฐกิจสังคม

ผลกระทบของน้ำมันรั่วไหลต่อแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากน้ำมันมีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทำให้แหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ปลา กุ้ง และหอย เป็นตัน อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้เมื่อเกิดการปนเปื้อนของน้ำมัน นอกจากนี้เมื่อคราบน้ำมันเคลื่อนตัวเข้าหาฝั่ง บริเวณที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ความเสียหายจะเกิดขึ้นอย่างรุนแรงต่อการเพาะเลี้ยงหอยและการเลี้ยงปลาในกระชังได้เนื่องจากสัตว์น้ำเหล่านี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ออกจากบริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อน คราบน้ำมันทำลายสุนทรียภาพและความงามของแหล่งท่องเที่ยว เช่น ชายหาด ปะการัง ป่าชายเลน เป็นต้น โดยเกิดจากคราบน้ำมันหรือก้อนน้ำมันดิบที่ถูกพัดพาขึ้นฝั่งไปติดตามชายหาด ทำให้ชายหาดสกปรกส่งผลกระทบต่อแหล่งท่องเที่ยวและกิจการที่ต่อเนื่องกับการท่องเที่ยว ทำให้ไม่เหมาะสมกับการท่องเที่ยวพักผ่อน ซึ่งจะส่งผลกระทบทางตรงต่อระบบเศรษฐกิจและรายได้ของประชาชนในท้องถิ่น (กรมควบคุมมลพิษ, 2553; ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์, 2533)

2.1.4 การบำบัดการปนเปื้อนน้ำมัน

เป้าหมายการบำบัดการปนเปื้อนน้ำมัน ก็คือลดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมและเศรษฐกิจ ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เพื่อควบคุม กำจัด และเก็บกวาดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ประกอบด้วย วิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพดังต่อไปนี้

1) วิธีทางกายภาพ (physical method) เป็นวิธีควบคุม กำจัดและกวาดเก็บน้ำมัน โดยใช้อุปกรณ์เครื่องมือ ซึ่งอุปกรณ์แต่ละชนิดมีหลักการและประสิทธิภาพในการทำงานแตกต่างกัน การกักและเก็บน้ำมันด้วยเครื่องมือกลนั้นเป็นทางเลือกที่มีข้อจำกัดเนื่องจากลม กระแสน้ำและสภาพทะเล ซึ่งมักเก็บกักปริมาณน้ำมันออกได้เพียงเล็กน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่รั่วไหลออกมา การกักน้ำมันเอาไว้มักใช้ทุ่นล้อมรอบและอุปกรณ์ดูดน้ำมันนำมาใช้เพื่อดึงน้ำมันที่ลอยอยู่ที่ผิวน้ำได้ มีเครื่องดูดคราบน้ำมันอยู่หลายประเภท แต่บางประเภทมีข้อจำกัดในแง่ของความหนืด (viscosity) ของน้ำมัน อัตราการเก็บกักน้ำมันด้วยเครื่องดูดคราบน้ำมันและปริมาณการเก็บที่เป็นไปได้ขึ้นอยู่กับสภาพการณ์ของการรั่วไหลของน้ำมัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2553)

2) วิธีทางเคมี (chemical method) วิธีนี้จะใช้ภายหลังจากใช้วิธีทางกายภาพแล้วยังหลงเหลือคราบน้ำมัน จากนั้นจึงใช้สารเคมีเข้าช่วยในการกำจัดคราบน้ำมัน เป้าหมายของการใช้สารเคมีกำจัดคราบน้ำมันก็เพื่อขจัดน้ำมันออกจากผิวน้ำของน้ำทะเลอย่างรวดเร็ว และทำให้น้ำมันกระจายตัวเข้าไปในมวลน้ำ ซึ่งน้ำมันจะเจือจางอย่างรวดเร็วจนถึงระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นอันตราย จากนั้นจึงถูกย่อยสลายสลายด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ช่วงเวลาที่น้ำมันสามารถ

กระจายตัวได้เพราะสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันคือช่วง 12 ถึง 48 ชั่วโมงแรกที่น้ำมันรั่วไหล เมื่อเวลาผ่านไปน้ำมันจะกระจายตัวได้น้อยลง ทำให้ประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันลดลงด้วย ประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันจะขึ้นอยู่กับวิธีการนำไปใช้ ปริมาณเพียงพอและสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอเกิดการสัมผัสอย่างดี

ข้อดีของการใช้สารเคมีกำจัดคราบน้ำมัน คือ สามารถใช้ในสภาพทะเลที่มีคลื่นลม มีกระแสน้ำแรงในทะเลกว้าง ได้ดีกว่าการเก็บกักน้ำมันด้วยเครื่องมือกล ยับยั้งไม่ให้น้ำมันรวมตัวกับน้ำก่อตัวเป็น chocolate mousse การกำจัดคราบน้ำมันออกจากผิวน้ำช่วยหยุดยั้งการแพร่กระจายของมลพิษที่มีต่อทิศทางการเคลื่อนตัวของคราบน้ำมัน ซึ่งลมอาจทำให้คราบน้ำมันเคลื่อนตัวเข้าสู่ชายฝั่งได้ ข้อเสียของการใช้สารเคมีกำจัดคราบน้ำมัน คือ เป็นตัวชักนำให้น้ำมันรวมเข้าไปในมวลน้ำตามความลึก ซึ่งอาจเกิดผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำชนิดอื่นที่ไม่ได้สัมผัสกับน้ำมัน โดยตรง หากใช้สารเคมีกำจัดคราบน้ำมันเพื่อขจัดคราบน้ำมันบนฝั่งหรือบนชายหาด อาจทำให้น้ำมันกระจายตัวลงสู่ดิน ทราบ และตะกอนได้ ควรนำสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันมาใช้เพื่อป้องกันมลพิษชายฝั่งทะเล แต่ไม่ใช่เพื่อรับมือกับมลพิษชายฝั่งทะเล (กรมควบคุมมลพิษ, 2545)

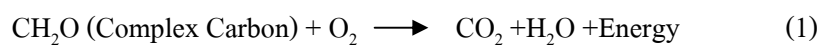
3) วิธีทางชีวภาพ (biological method) เป็นวิธีการที่ใช้จุลินทรีย์เข้าย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแล้วนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม กระบวนการนี้ใช้เวลานานในการย่อยสลายคราบน้ำมัน สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

- การกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulation) เป็นการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมมีการเจริญและมีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษได้ดีขึ้น ได้แก่ การเติมสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ธรรมชาติ (growth substrate) เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส การปรับสภาพให้มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ เช่นการให้อากาศหรือการให้ออกซิเจนลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อน รวมถึงการเติมสารลดแรงตึงผิว จะช่วยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอนทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Haigh, 1996)

- การเติมจุลินทรีย์เพื่อบำบัดสารมลพิษ (bioaugmentation) เป็นวิธีที่ช่วยส่งเสริมหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนโครงสร้าง (biotransformation) สารมลพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลงหรือไม่มีเลย หรือย่อยสลายสารพิษให้หมดไป (biodegradation หรือ mineralization) ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารนั้นๆ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเพิ่มปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการเก็บเชื้อจุลินทรีย์จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันมาทำการคัดแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายมาเพิ่มปริมาณ แล้วเติมกลับลงไป ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน และอีกวิธีคือ การพัฒนาประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์โดยการปรับปรุงสายพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetically engineered microorganism, GEM) ในการย่อยสลายสารในบริเวณพื้นที่

บَابคจึงจำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย (Watanabe, 2001) โดยวิธีการนี้มีปัจจัยหรือข้อจำกัดที่ควรคำนึงถึงสำหรับการนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปใช้ในสิ่งแวดล้อมจริง ได้แก่ จุลินทรีย์ที่จะนำไปใช้นั้นอาจไม่ใช่จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในบริเวณที่ต้องการกำจัดมลพิษ ทำให้เกิดสภาวะการแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ต่างถิ่นกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (indigenous microorganisms) ดังนั้นจุลินทรีย์ต่างถิ่นจะต้องสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (Vidali, 2001) ซึ่งการเติมจุลินทรีย์ต่างถิ่นลงไปอาจไม่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันของกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มเดิมที่มีอยู่ในพื้นที่ปนเปื้อน ทำให้มีกฎหมายของรัฐบาลที่ควบคุมการเติมจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่ไม่ใช่สายพันธุ์ท้องถิ่น เพราะอาจเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค หรืออาจส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่ดังกล่าว (พิสุทธิ และ ปฎิภาณ, 2556)

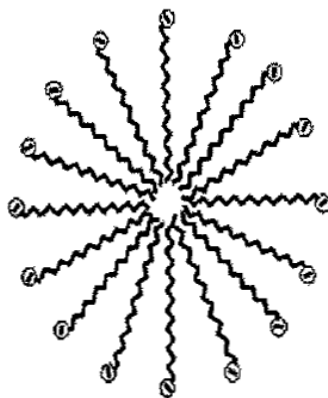
กระบวนการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (hydrocarbon assimilation) เป็นการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นอาหารพร้อมกับบริโภคเอาออกซิเจน แล้วเปลี่ยนไปเป็นพลังงานหรือเพื่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เอง และได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (mineralization) ดังสมการที่ 1 (ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์, 2533)



จุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ชนิดของน้ำมันที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อรูปแบบการเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพที่แตกต่างกัน โดยพบว่าส่วนที่อิ่มตัว (saturate content) เป็นส่วนที่สามารถย่อยสลายได้เป็นส่วนใหญ่ เช่น น้ำมันดีเซล (diesel fuel) มีส่วนที่อิ่มตัวมากกว่า 95% จึงทำให้น้ำมันประเภทนี้สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ส่วนน้ำมันที่มีองค์ประกอบที่อิ่มตัวในปริมาณน้อย ทำให้สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้น้อยมากไม่ว่าจะอยู่ในสภาวะใดก็ตาม (พิสุทธิ เพ็ชรมนกุล และปฎิภาณ ปัญญาพลกุล, 2556)

2.2 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

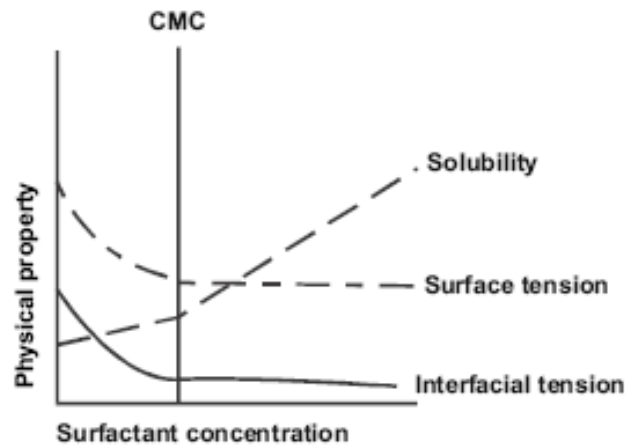
สารลดแรงตึงผิว หรือ surface active agent มีชื่อเรียกโดยทั่วไปทางวิทยาศาสตร์ว่า surfactant ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthesis surfactant) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ผลิตจากสารอินทรีย์ ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Pornsunthorntawe et al., 2008) สารลดแรงตึงผิวเดิมมีรากศัพท์มาจากภาษาเยอรมันเรียกว่า tensid ซึ่งตั้งโดยนักเคมีชาวเยอรมันในปี ค.ศ. 1960 หมายถึงสารใดๆที่มักไปรวมตัวที่รอยต่อระหว่างผิว (interface) แล้วทำให้สมบัติเชิงผิวของสารนั้นเปลี่ยนไป โดยสารลดแรงตึงผิวมีลักษณะโมเลกุลประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัวหรือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic head group) ซึ่งเป็นส่วนที่มีขั้วสามารถรวมตัวได้ดีกับน้ำมีทั้งที่เป็นประจุและไม่มีประจุ นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยหมู่ของ โมโน (mono-) ไค (di-) หรือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) หมู่คาร์บอกซิลิก กรดอะมิโน และเปปไทด์ ส่วนหางหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) เป็นส่วนที่ไม่มีขั้วสามารถรวมตัวได้ดีกับไขมัน มักเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน คือมีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนใหญ่มากจากไขมันและน้ำมันตามธรรมชาติ รวมทั้งปิโตรเลียมและโพลีเมอร์สังเคราะห์ (Lang, 2002) ด้วยโครงสร้างนี้จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวมีสมบัติที่สำคัญคือ จะไปจัดเรียงตัวอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างผิว โดยหันส่วนหัวเข้าสู่ส่วนของเฟสที่มีขั้ว และหันส่วนหางเข้าสู่เฟสที่ไม่มีขั้ว และเมื่อโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจัดเรียงตัวอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างผิวจนเต็มแล้วจะทำให้ส่วนที่เหลือจัดรวมตัวกันเป็นไมเซล (micelle) โดยหันส่วนของโมเลกุลที่เหมือนกันเข้าหากัน เช่น เมื่อละลายอยู่ในน้ำก็จะหันส่วนหางที่ไม่มีขั้วเข้าหากัน และหันส่วนที่มีขั้วสู่น้ำ (ภาพที่ 2-3)



ภาพที่ 2-3 การรวมตัวกันของส่วนหางหรือส่วนที่ชอบน้ำทำให้เกิด micelle

ที่มา : Fiechter (1992)

ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นที่ผิวของสารที่สัมผัสกันเรียกว่าค่า interfacial tension ค่าแรงตึงผิวมีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันนี้เป็นไมเซลล์ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า critical micelle concentration (CMC) ซึ่งค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย ดังภาพที่ 2-4



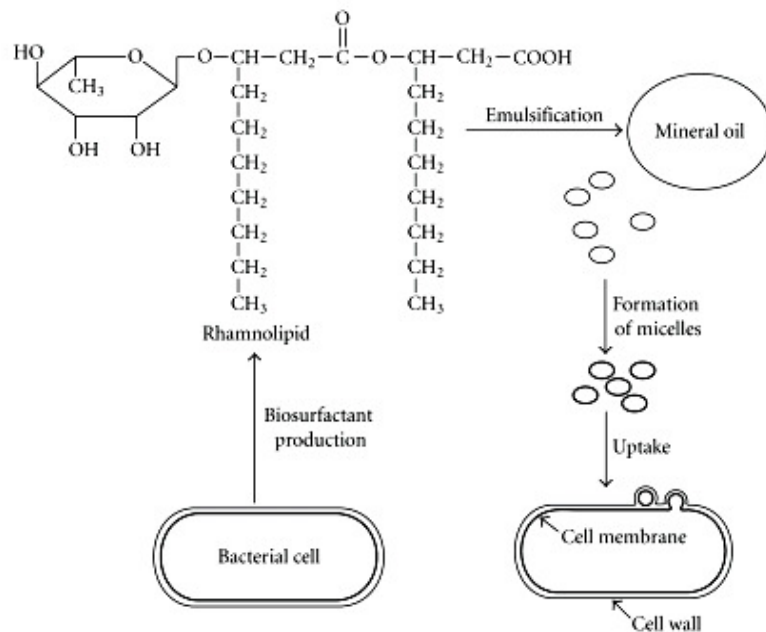
ภาพที่ 2-4 ค่าแรงตึงผิว ค่า interfacial tension และค่า critical micelle concentration (CMC)

ที่มา : Mulligan (2005)

น้ำทิ้งจากครัวเรือนและโรงงานอุตสาหกรรมล้วนมีสารลดแรงตึงผิวจากผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดด้วยกันทั้งสิ้น ผลกระทบที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิว เช่น sodium linear alkylbenzene sulfonate (LAS) ไปลื้อมจับพื้นผิวสารอินทรีย์ต่างๆที่มีในแหล่งน้ำ เมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้นทำให้กระบวนการย่อยสลายเกิดการชะงัก เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำเมื่อมีจำนวนคาร์บอนมากขึ้นความเป็นพิษยิ่งเพิ่มขึ้น (จิรสา กรงกรด, 2548) การเลือกประเภทของสารลดแรงตึงผิว ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว รวมถึงสภาวะอื่นๆ ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการใช้งานต่างๆ เป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้สารลดแรงตึงผิวทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดและไม่สร้างปัญหาให้กับสิ่งแวดล้อม สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่จะสามารถย่อยสลายได้เองในธรรมชาติ ซึ่งความสามารถในการถูกย่อยสลายขึ้นกับโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวรวมทั้งปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่เหลืออยู่จากการใช้ การใช้สารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่เหมาะสมนอกจากจะช่วยลดต้นทุนในการบำบัดแล้วยังมีส่วนช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Banat *et al.*, 1991) ซึ่งน้ำที่ถูกบำบัดโดยใช้สารลดแรงตึงผิวต้องมีสารลดแรงตึงผิวตกค้างในปริมาณที่น้อยกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะสามารถนำมาใช้บริโภคได้ (Kawamura, 2000)

2.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นสารที่หลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular) และที่อยู่ติดกับผนังเซลล์ (cell-bound) (Mulligan, 2005) มีสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active agent) หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsifying agent) และเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นจึงช่วยให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ง่ายขึ้น (คุชฎีพรรณ พงษ์สุวรรณ, 2553) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีกระบวนการคือ จุลินทรีย์จะจับกับอนุภาคน้ำมันและสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาอิมัลซิไฟด์ทำให้น้ำมันมีขนาดเล็กกลง (oil droplets) และผสมเข้ากันได้ดีกับน้ำ หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะนำน้ำมันที่มีขนาดเล็กเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน ดังภาพที่ 2-5



ภาพที่ 2-5 กระบวนการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ที่มา : Das and Chandran (2010)

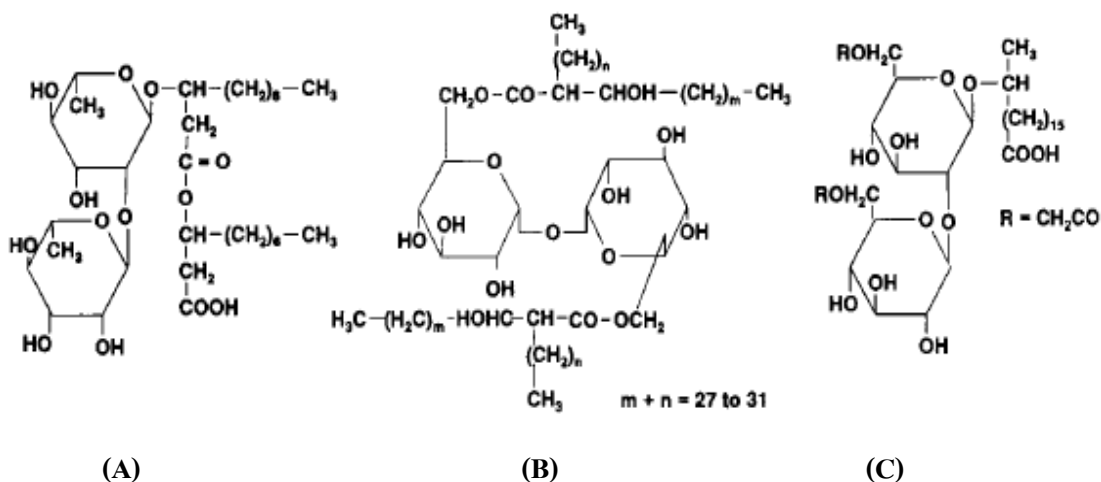
การจำแนกกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเซลล์และประเภทของสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมา สามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ดังนี้

1) ไกลโคลิปิด (glycolipid) เป็นกลุ่มสารที่เป็นที่รู้จักมากที่สุด ประกอบด้วยส่วนของคาร์โบไฮเดรตรวมตัวกับ aliphatic acid สายยาว หรือ hydroxyaliphatic acid สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิดที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่

-Rhamnolipids เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิดที่มีการศึกษากันมาก ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) 1-2 โมเลกุลเชื่อมต่อกับ β -hydroxydecanoic acid 1-2 โมเลกุล (ภาพที่ 2-6A) ส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. จากการศึกษาการผลิต rhamnolipid โดย *Pseudomonas aeruginosa* ที่เจริญในอาหารที่มี n-hexadecane สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ให้มีค่าเท่ากับ 25 ถึง 30 mN/m นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในกลุ่มของ alkane (Desai and Banat, 1997)

-Trehalolipids สารในกลุ่มนี้โครงสร้างประกอบด้วย disaccharide trehalose เชื่อมต่อกับ mycolic acid ที่เป็นสายยาว และเป็น α -branched- β -hydroxy fatty acid ที่ตำแหน่ง C-6 และ C'-6 trehalolipids สารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีขนาดและโครงสร้างของ mycolic acid จำนวนคาร์บอน และความอึดตัวของสารแตกต่างกันไป (ภาพที่ 2-6 B) โดยสารที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายได้แก่ trehalose dimycolate จาก *Rhodococcus erythropolis* สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเท่ากับ 25 จาก 40 mN/m (Desai and Banat, 1997)

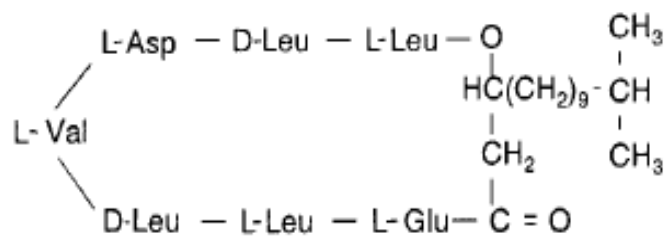
-Sophorolipids เป็นสารกลุ่มที่ผลิตจากยีสต์เป็นส่วนใหญ่ เช่น *Torulopsis petrophillum*, *T. apicola* และ *T. bombicola* (Desai and Banat, 1997) (ภาพที่ 2-6 C) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่ดี แต่ไม่มีสมบัติในการเป็นสารก่อให้เกิดอิมัลชัน (Cooper and Goldenberg, 1987)



ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิด (A) rhamnolipids จาก *Pseudomonas aeruginosa* (B) trehalolipids จาก *Rhodococcus erythropolis* (C) sophorolipids จาก *Torulopsis bombicola*

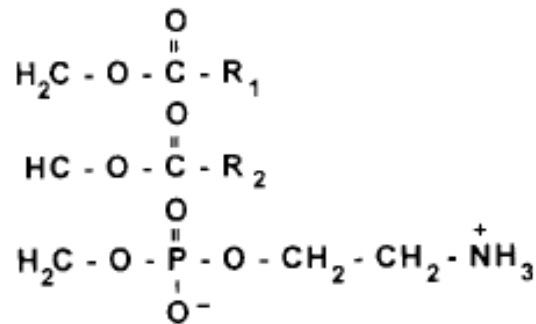
ที่มา : Desai and Banat (1997)

2) ลิโปเปปไทด์ และลิโปโปรตีน (lipopeptide and lipoprotein) โมเลกุลประกอบด้วยสาย โพลีเปปไทด์ชนิดประจุลบหรือไม่มีประจุเชื่อมกับกรดไขมัน ส่วนกรดไขมันเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และส่วนกรดอะมิโนหรือโปรตีนเป็นส่วนที่ชอบน้ำ โดยทั่วไปจะพบกรดอะมิโนประมาณ 5 ถึง 7 โมเลกุลต่อกันเป็นโครงสร้างรูปร่างแหวน (cyclic peptide) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ที่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย ได้แก่ surfactin ซึ่งเป็นลิโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวนที่ผลิต จาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (ภาพที่ 2-7) สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ให้มี ค่าเท่ากับ 27.9 mN/m โดยใช้สารลดแรงตึงผิวความเข้มข้นต่ำกว่า 0.005% (Arima *et al.*, 1968)



ภาพที่ 2-7 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* ที่มา : Desai and Banat (1997)

3) กรดไขมัน ฟอสโฟลิปิด และนิวทรัลลิปิด (fatty acid, phospholipid และ neutral lipid) เป็นสารกลุ่มที่มีไขมันรวมตัวกับ โครงสร้างของเซลล์ซึ่งมีผลต่อสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้น พบสาร กลุ่มนี้ได้ทั่วไปในแบคทีเรียและยีสต์ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี n-alkane เป็นส่วนประกอบ ที่ผลิต ได้จากเชื้อ *Acinetobacter* sp. จะสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่ม fatty acid และ phospholipid (ภาพที่ 2-8) ได้ปริมาณสูงขึ้น (Cirigliano and Carman, 1985)

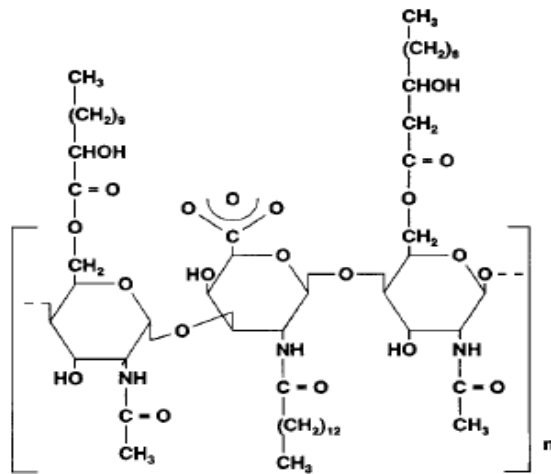


R1, R2 = alkyl group, X = hydrogen, ethylamine, inositol

ภาพที่ 2-8 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มฟอสโฟลิปิด

ที่มา : Desai and Banat (1997)

4) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอร์ (polymeric biosurfactant) เป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีนเป็นพื้นฐาน โดยมีไขมันเป็นส่วนประกอบร่วม สารในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษากันมากได้แก่ emulsan, liposan, monoprotein และ ชนิดอื่นๆ จากการศึกษาของ Rosenberg และคณะ (1979) *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 สามารถผลิต emulsan (ภาพที่ 2-9) ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี เมื่อใช้ emulsan ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.001-0.01% ในการทำให้เกิดอิมัลชัน โดยสัดส่วนของ emulsan และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 1:100 ถึง 1:1000 อย่างไรก็ตาม emulsan ไม่สามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้ถ้าใช้ aliphatic หรือ aromatic หรือ cyclic hydrocarbon เดี่ยว ๆ แต่จะเกิดอิมัลชันในกรณีที่เป็นไฮโดรคาร์บอนผสม พบว่า emulsan สามารถอิมัลซิไฟด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วน liposan ที่ผลิตจาก *Candida lipolytica* มีคุณสมบัติเป็น emulsifier ประเภท heteropolysaccharide ที่มี glucose, galactose, galactosamine และ galacturonic acid เป็นส่วนประกอบ มีคาร์โบไฮเดรต 83% และโปรตีน 17% (Cirigliano and Carman, 1985) จากการศึกษาของ Cooper และ Goldenberg (1987) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* พบเป็นโพลิเมอร์ของ D-glucosamine มีสมบัติในการเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีกิจกรรมสูงที่ pH ต่ำกว่า 7



ภาพที่ 2-9 โครงสร้างของ emulsan ผลิตโดย *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1

ที่มา : Rosenberg และคณะ (1979)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแสดงได้ในตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ

Biosurfactants	Microorganisms
Glycolipid	
Rhamnolipids	<i>P. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> sp.
Trehalolipids	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i> sp.
Sophorolipids	<i>Torulopsis apicola</i> <i>T. bombicola</i> <i>T. petrophillum</i>
Lipopeptide and lipoprotein	
Peptide-lipid	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettin	<i>Serratia macescens</i>

ตารางที่ 1-1(ต่อ) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ

Biosurfactants	Microorganisms
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>
Surfactin	<i>B. subtilis</i>
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>
Gramicidins	<i>B. brevis</i>
Polymyxins	<i>B. polymyxa</i>
Fatty acid, phospholipid and neutral lipid	
Fatty acid	<i>Candida lepus</i>
neutral lipid	<i>Nocardia erythropolis</i>
phospholipid	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Polymeric biosurfactant	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
Mannan-lipid-protein	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>C. lipolytica</i>
Carbohydrate-protein-lipid	<i>P. fluorescens</i>

ที่มา : คัดแปลงจาก Desai และ Banat (1997)

นอกจากนี้ยังจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (Ron and Rosenberg, 2001)

- สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight biosurfactant) คุณสมบัติที่สำคัญของสารกลุ่มนี้คือ การลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ได้แก่ โกลโคลิปิดและลิโปเปปไทด์ ซึ่งนอกจากคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวแล้วสารลิโปเปปไทด์บางชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์

- สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight biosurfactant) เป็นโพลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลสูงที่ติดกับพื้นผิวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำอย่างแข็งแรง ทำให้จุลินทรีย์สามารถอยู่ติดกับสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ และนำสารตั้งต้นนั้นไปเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดีขึ้น คุณสมบัติที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือ การทำให้เกิดความคงตัวของอิมัลชัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ลิโปโพลีแซคคาไรด์ และลิโปโปรตีนหรือสารละลายเชิงซ้อน

2.4 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีชั้นสเตรทไม่ละลายน้ำ (water-immiscible substrate) และใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (Healy *et al.*, 1996) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีไม่มากนัก เมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่น เช่น ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ตะกอนดินจากน้ำเสีย ตัวอย่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Gluconobacter* sp., *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแยกได้จากน้ำทะเลที่มีการรั่วไหลน้ำมันในประเทศอินเดีย ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อเลี้ยงในอาหาร marine broth ที่มีการเติม kerosene เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน นำมาคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี haemolytic activity, drop collapsing test, emulsification measurement, oil displacement test ซึ่งวิธี drop collapsing test เป็นการทดสอบทางคุณภาพ ส่วนวิธี oil displacement test และ emulsification activity เป็นการทดสอบทางปริมาณ จากแบคทีเรียทั้งหมด 20 ไอโซเลทพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. มีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันสูงสุด คือ 70.5 % และให้ค่า oil displacement มากที่สุด คือ 3.14 (Dhail *et al.*, 2012)

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันบริเวณท่าเรือในจังหวัดสงขลา สามารถแยกเชื้อได้ 200 สายพันธุ์ เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการย่อยเม็ดเลือดแดง การอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil และ drop collapsing test พบว่าเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter anitratus*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio paraheamolyticus*, *Myroides* sp. เมื่อพิจารณาการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil และ drop collapsing test พบว่าเชื้อ *Myroides* sp. มีประสิทธิภาพมากที่สุด (Maneerat and Phetrong, 2007) เชื้อแบคทีเรีย *Alcanivorax hongdengensis* แยกได้จากน้ำทะเลที่สามารถย่อยสลาย alkane และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด lipopeptide เมื่อใช้ *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน (Wu *et al.*, 2009) ส่วน *Rhodococcus rhodochrous* S-2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด โพลีแซคคาไรด์ออกมานอกเซลล์ ส่งเสริมการย่อยสลาย aromatic hydrocarbon ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบ จากการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพมากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี 15 ชนิด ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการย่อยสลายคราบน้ำมันที่เป็นสาเหตุให้เกิดมลภาวะทางทะเลได้ (Iwabuchi *et al.*, 2002)

2.5 การวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active agent) หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsifying agent) ทำให้สามารถวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้คุณสมบัติดังกล่าว

2.5.1 drop-collapse test เป็นการตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์แบบรวดเร็ว โดยนำตัวอย่างเชื้อในอาหารเหลว (culture broth) ที่ต้องการตรวจสอบปริมาณน้อย ๆ ทดสอบโดยหยด culture broth ลงบนน้ำมันที่เคลือบผิว polystyrene ของ 96-microwell หากเชื้อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหยดของ culture broth จะแบนราบและมีการแผ่ออก เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่าง culture broth กับผิว polystyrene ของ 96-microwell แต่ถ้าเชื้อไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รูปร่างของหยด culture broth จะไม่เปลี่ยนแปลง (Bodour and Miller-Maier, 1998)

วิธี drop collapse สามารถทำได้รวดเร็ว ไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และใช้สารในปริมาณน้อย (Bodour and Miller-Maier, 1998; Youssef *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2010) แต่วิธีนี้มีข้อด้อยคือมีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ ถ้าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตมีความเข้มข้นต่ำจะไม่สามารถวัดกิจกรรมด้วยวิธีนี้ได้ (Walter *et al.*, 2010)

2.5.2 oil displacement test เป็นวิธีการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยหยด culture broth ลงบนแผ่นฟิล์มน้ำมันหากมีสารลดแรงตึงผิวอยู่ในสารละลาย สารลดแรงตึงผิวจะทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างสารละลายและน้ำมัน ทำให้แผ่นฟิล์มของหยดน้ำมันกระจายออก โดยหยดน้ำมันปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 40 ไมโครลิตร ซึ่งอยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยดน้ำมันเบาๆ ถ้ามีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแผ่นฟิล์มของน้ำมันจะกระจายออก สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 30 วินาที (Morikawa *et al.*, 1993)

Youssef และคณะ (2004) เปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ โดยใช้ 3 วิธีในการทดสอบ คือ drop collapse, oil displacement, blood agar lysis โดยเปรียบเทียบกับค่าแรงตึงผิว (surface tension) พบว่าวิธี drop collapse ใช้เป็นวิธีคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หลังจากนั้นใช้วิธี oil displacement เพื่อทดสอบความเข้มข้นของสารที่ผลิตได้ ส่วนวิธี blood agar lysis ผลการเปรียบเทียบกับค่า surface tension มีความสัมพันธ์กันน้อย จึงไม่น่าเชื่อถือสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.5.3 การวัดแรงตึงผิว (surface tension) แรงตึงผิว คือ แรงดึงที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของของเหลวเมื่อสัมผัสกับพื้นผิวอื่น เช่น อากาศ หรือกับของแข็ง โดยมีพลังงานเพียงพอต่อการยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล ทำให้เกิดเป็นลักษณะคล้ายกับแผ่นบางๆ ที่สามารถต้านแรงดึงได้เล็กน้อย มีทิศทางกับผิวของเหลวและตั้งฉากกับเส้นขอบที่ของเหลวสัมผัส การเกิดแรงตึงผิวเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ แรง cohesion เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลชนิดเดียวกันและแรง adhesion เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลต่างชนิดกัน ซึ่งมีหน่วยในการวัดเป็นมิลลินิวตันต่อมิลลิเมตร (mN/m) ปกติสารลดแรงตึงผิวสามารถลดแรงตึงผิวสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 mN/m ลงมาต่ำกว่า 30 mN/m และค่า interfacial tension จะมีค่าต่ำกว่า 1 mN/m (Cooper, 1987; Desai and Banat, 1997; Youssef *et al.*, 2004)

2.5.4 การวัดการเกิดอิมัลชัน (emulsification measurement) จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาสามารถทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดเป็นอิมัลชันได้ดีขึ้น (Fiechter, 1992) การวัดการเกิดอิมัลชันนิยมวัดค่า emulsification activity (EA) และค่า emulsification index (E_{24}) การคำนวณค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) และความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน (E_{24}) ดังสมการที่ 2

$$EA \text{ หรือ } E_{24} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชันที่เกิดขึ้น}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}} \times 100 \quad (2)$$

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์

2.6.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตและนำไปใช้เพื่อสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตจึงมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอย่างมาก (Abouseoud *et al.*, 2008) แหล่งคาร์บอนที่ใช้มีทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ชนิดที่ละลายน้ำ เช่น กลูโคส กลีเซอรอล แมนนิทอลและเอทานอล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น *n*-alkanes, *n*-heptadecane น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอก

ผลการศึกษาที่ผ่านมาชนิดของแหล่งคาร์บอนกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีรายงานที่พบมากที่สุด คือ กลูโคส แม้เชื้อต่างชนิดกันก็พบว่ากลูโคสเหมาะสมที่สุด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii* และ *Bacillus mycoides* (Joshi *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Najafi *et al.*, 2010; Aparna *et al.*, 2012; Wahaibi *et al.*, 2014) ส่วนชูโครสเหมาะสำหรับเชื้อ *Streptomyces* sp. (Khopada *et al.*, 2012) จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ไม่สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน แต่สามารถใช้แอลกอฮอล์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจถูกยับยั้งได้โดยกลูโคสหรือเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) เช่น *Acinetobacter calcoaceticus* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด emulsan เมื่อใช้ชนิดแหล่งคาร์บอนกลุ่มไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ *n*-hexadecane พบว่าเป็นแหล่งคาร์บอนให้ประสิทธิภาพสูงสุด (กุลนรี เพชรรงค์, 2550) แต่พบว่าเมื่อใช้ *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อ *Bacillus subtilis* มีผลยับยั้งในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Kim *et al.*, 1997) ส่วนแหล่งคาร์บอนกลุ่มน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอกสำหรับเชื้อ *P. fluorescens* (Abouseoud *et al.*, 2008) และน้ำมันปาล์มสำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* (ดุขฎีพรรณ พงษ์สุวรรณ, 2553)

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตและนำไปใช้ใช้เพื่อเป็นส่วนประกอบในการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก แหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีทั้งแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ beef extract, yeast extract, peptone และยูเรีย แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3), แอมโมเนียมซัลเฟต (NH_4SO_4), แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NH_4HCO_3) และโซเดียมไนเตรท (NaNO_3)

ชนิดของแหล่งชนิดของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ผลการศึกษาที่ผ่านมาชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อใช้ peptone (คุชฎีพรรณ พงษ์สุวรรณ, 2553) *Streptomyces* sp. เมื่อใช้ yeast extract (Khopade *et al.*, 2012) *Bacillus subtilis* เมื่อใช้ยูเรีย (Ghribi and Ellouze-Chaabouni, 2011) ส่วนแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อใช้ NaNO_3 (Wu *et al.*, 2008; Praveesh, 2011) *Bacillus clausii* เมื่อใช้ NH_4Cl (Aparna *et al.*, 2012) *Pseudomonas fluorescens* เมื่อใช้ NH_4NO_3 (Abouseoud *et al.*, 2008) นอกจากนี้เมื่อใช้ NH_4HCO_3 เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนช่วยควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้ลดต่ำลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* และ *Bacillus subtilis* (Kim *et al.*, 1997; กุลนรี เพชรรงค์, 2550)

2.6.3 อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน

อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีไนโตรเจนเพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลจากการศึกษาเชื้อ *P. fluorescens* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM โดยมีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมี NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10, 20 และ 30 พบว่าให้ค่า emulsification activity เท่ากับ 50%, 10% และ 5% ตามลำดับ (Abouseoud *et al.*, 2008) และจากการศึกษา *P. aeruginosa* เมื่อเลี้ยงใน mineral salt medium โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมี NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่มีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 26 พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 6.8 กรัมต่อลิตร (Wu *et al.*, 2008)

2.6.4 pH เริ่มต้น

สภาวะความเป็นกรดหรือ pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมและการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลกระทบจากค่า pH โดยทั่วไปค่า pH ที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ราและยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วง pH ค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วง pH ที่มีค่าเป็นกลาง ผลการศึกษา pH ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus mycoides* ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ที่ pH ในช่วง 5 ถึง 9 และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่ pH 7.37 โดยสามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำสุดที่ 34 mN/m นอกจากนี้การศึกษาเชื้อ *B. subtilis*

และ *P. aeruginosa* ในอาหาร MSM ที่มีน้ำมัน 2% ปรับช่วง pH 6-10 พบว่าเชื้อให้ค่าแรงตึงผิว surface tension น้อยที่สุดเท่ากับ 33.9 mN/m ที่ pH เท่ากับ 8 และ 9 แต่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ปริมาณสูงสุดที่ pH เท่ากับ 9 (Yin *et al.*, 2009) ส่วนผลของ pH ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *P. aeruginosa* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ในช่วง pH 5-9 พบว่าที่ pH เท่ากับ 8 ค่าแรงตึงผิวน้อยที่สุดเท่ากับ 27 mN/m และสามารถผลิตสารได้ปริมาณสูงสุด 0.82 กรัมต่อลิตร (Lotfabad *et al.*, 2009) ส่วนเชื้อ *Streptomyces fradiae* ในอาหาร Kim medium ที่ pH 4-10 พบว่าเชื้อเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ที่ pH 5-10 แต่ที่ pH 7 จะผลิตสารได้ปริมาณสูงสุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี oil spreading โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสได้ 12.83 เซนติเมตร และมวลชีวภาพได้ 1.56 กรัมต่อลิตร (อินทิยา แกรมพัคฆ์, 2550)

2.6.5 อุณหภูมิ (temperature)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน เมื่ออุณหภูมิเจริญในอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเจริญได้เร็วและอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย ผลจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *P. aeruginosa* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุด 0.8 กรัมต่อลิตร โดยอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านี้จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่ออุณหภูมิ 30 และ 25 องศาเซลเซียส สามารถวัดมวลชีวภาพได้เพียง 0.75 และ 0.11 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แต่คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไม่เปลี่ยนแปลง (Lotfabad *et al.*, 2009) เมื่อเลี้ยง *P. aeruginosa* ในอาหาร Mckeen medium ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งอุณหภูมิที่ศึกษา คือ 25, 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าได้ค่า emulsification activity สูงสุดเท่ากับ 80% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 30 และ 25 องศาเซลเซียส ได้ค่า emulsification activity เท่ากับ 56.66 และ 57.14 % (ศุภฎีพรรณ พงษ์สุวรรณ, 2553)

2.7 การนำสารลดแรงตึงผิวไปใช้ประโยชน์

สารลดแรงตึงผิวที่เราใช้อยู่เป็นประจำทุกวันนี้ส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ ปัจจุบันจึงเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกันมากขึ้น เนื่องจากมีคุณสมบัติพิเศษ และลักษณะเฉพาะ จึงได้มีการค้นหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารที่ผลิตขึ้นอย่างต่อเนื่อง ลักษณะเด่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเพราะเป็นสารที่สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพ และมีความเป็นพิษต่ำ (Desai and Banat, 1997) จึงนำมาประยุกต์ใช้กันมากในระบบอุตสาหกรรมด้านต่างๆดังนี้

2.7.1 อุตสาหกรรมน้ำมัน

ได้มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำมัน เนื่องจากมีข้อดี คือ ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ที่มีความเฉพาะเจาะจงไปเพียงปริมาณเล็กน้อยสารก็ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นยังใช้ได้หลายสถานะ ได้มีการทดสอบการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียในระดับโรงงาน เพื่อทำความสะอาดถังน้ำมันและกู้คืนสารไฮโดรคาร์บอนจากน้ำมันเครื่องใช้แล้วขนาด 850 ลิตร จากการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาณ 2 ตัน พบว่า 91% หรือปริมาณ 744 ลิตรของน้ำมันเครื่องถูกเปลี่ยนเป็น crude oil ที่มีมูลค่าและ 76 ลิตรที่เหลือนั้นจำแนกได้ว่าเป็นสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ไฮโดรคาร์บอนและได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ในกระบวนการอื่นต่อไป (Banat *et al.*, 1991) การประยุกต์ใช้ในการเก็บเกี่ยวน้ำมันที่เหลืออยู่ในถังเก็บน้ำมันมาใช้ประโยชน์ โดยใช้เทคโนโลยี microbially-enhanced oil recovery (MEOR) เนื่องจากน้ำมันที่เหลืออยู่ในถังเก็บน้ำมันมีความหนืดสูงส่งผลให้การเคลื่อนที่ต่ำ การเก็บเกี่ยวน้ำมันส่วนที่เหลือต้องใช้วิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกัน การใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์อาจจะเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและมีราคาแพง จากการทดลองในห้องปฏิบัติการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1, และ *B. licheniformis* ที่เลี้ยงใน LB broth อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่มีกากน้ำตาล 2% (w/v) มาทดสอบการแยกสารออกเพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำมัน โดยวิธี sand pack column พบว่าสามารถเพิ่มมูลค่าของน้ำมันเครื่องเก่าได้ 25-33% (Joshi *et al.*, 2008)

2.7.2 การย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอน

การย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพช่วยในการย่อยสลาย โดยทำให้อยู่ในรูปของสารที่ละลายได้หรือการเกิดอิมัลชัน เพื่อง่ายต่อการกำจัดและเพื่อให้สารไฮโดรคาร์บอนเหล่านั้นถูกสารอินทรีย์ในดินดูดซับได้มากขึ้น เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลในประเทศไต้หวัน *P. aeruginosa* ผลิตสาร rhamnolipid และ *Bacillus subtilis* ผลิต surfactin สามารถลดค่าแรงตึงผิวจาก 72.5 mN/m ลงมาที่ 29.5 และ 27.2 mN/m ตามลำดับ ปริมาณสาร 2 % ของ rhamnolipid และ surfactin สามารถใช้แยก total petroleum hydrocarbon (TPH) 9,000 mg/k ที่ปนเปื้อนในดินได้ เมื่อตรวจสอบโดย GC-FID

ค่าเปอร์เซ็นต์ TPH ออกได้เท่ากับ 63% และ 62% ซึ่งมากกว่าสารสังเคราะห์ TritonX-100 และ Tween 80 ที่ได้ค่า 40% และ 35% ตามลำดับ (Lai *et al.*, 2009) จากการทดสอบการย่อยสลาย TPH ของ *Micrococcus luteus* BN56 ในอาหาร mineral salts medium ที่มี 2% diesel oil เป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณของ TPH ลดลง 93% เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี GC-MS (Tuleva *et al.*, 2009)

2.7.3 อุตสาหกรรมอาหาร

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกใช้เป็นสารปรุงแต่งรสชาติในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น lecithin และสารประกอบ lecithin, fatty acid ester ที่ประกอบด้วย glycerol, sorbitol หรือ ethyloxyolate ถูกนำไปใช้เป็น emulsifier ในอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป (Besson and Michel, 1992) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการพัฒนาเนื้อแป็งเพื่อผลิตเบเกอรี่และการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เนื้อ (Fiechter, 1992) นอกจากนี้สาร glycolipid และ diacylmonosylerythritol ที่ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อลิตร ผลิตโดย *Candida Antarctica* นำไปใช้เป็นสารต้านการยึดเกาะที่มาจาก การแช่แข็ง ซึ่งใช้ปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารสังเคราะห์ polyoxyethylene sorbitan diolate ปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะเดียวกัน (Kitamoto *et al.*, 2001)

2.7.4 การแพทย์และการผลิตยา

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นที่น่าสนใจอย่างมากในด้านการแพทย์และผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เช่น ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย (Haba *et al.*, 2003) ยาต้านเชื้อรา และยาต้านไวรัส (Vollenbroich *et al.*, 1997) เป็นสารตัวหลักในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน สารต้านการยึดเกาะ ผลิตวัคซีน และการรักษาด้วยยีน (อินทียา แลมพักษณ์, 2550) พบการใช้เป็นสารต้านการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคเนื่องจากมีความเหมาะสมในการใช้เป็นส่วนประกอบในตัวยาเพื่อลดจำนวนการติดเชื้อในโรงพยาบาลแทนการใช้ยาสังเคราะห์จากสารเคมี เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ fraction C ที่ผลิตจาก *Streptococcus thermophilus* ผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antibiotic) ทั้งแบคทีเรียและยีสต์ *Candida tropicalis* GB9/9 เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ (Rodrigues *et al.*, 2006) MEL เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม glycolipid ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและต้านทาน leukemia cell lines (Sudo *et al.*, 2000) มีการศึกษา rhamnolipid fraction RL-a และ RL-b จาก *P.aeruginosa* ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) และ insect cell lines (C6/36) ที่ความเข้มข้น 6.25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการทดสอบว่าทั้ง RL-a และ RL-b ที่ความเข้มข้นสูง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ไม่สามารถยับยั้ง normal cell line ได้ ดังนั้นจึงไม่มีความเป็นพิษ (Thanomsub *et al.*, 2007)

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจากบริเวณท่าเรือจำนวน 3 ท่าเรือ คือ ท่าเรือ สงขลา ท่าเรือกันตัง และท่าเรือสิเกา

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Plate count agar (ยี่ห้อ Difco) Nutrient Agar (ยี่ห้อ Difco) และ Mineral salt medium (MSM) (ภาคผนวก ข)

3.1.3 สารเคมีที่ใช้เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade)

- 1) Yeast extract ยี่ห้อ Difco
- 2) Peptone ยี่ห้อ Difco
- 3) Glucose ยี่ห้อ Lab-Scan
- 4) Lactose ยี่ห้อ Lab-Scan
- 5) Sucrose ยี่ห้อ Lab-Scan
- 6) Sodium chloride (NaCl) ยี่ห้อ Lab-Scan
- 7) Sodium nitrate (NaNO_3) ยี่ห้อ Lab-Scan
- 8) Potassium nitrate (KNO_3) ยี่ห้อ Lab-Scan
- 9) Ammonium sulphate (NH_4SO_4) ยี่ห้อ Lab-Scan

3.1.4 น้ำมันสำหรับการทดลอง ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันปาล์ม น้ำมันเครื่อง

3.1.5 เครื่องมือสำหรับการทดลอง

- 1) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) ยี่ห้อ Sartorius
- 2) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) ยี่ห้อ Sartorius
- 3) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Hettich
- 4) เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ Heidolph
- 5) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) ยี่ห้อ IKA
- 6) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ TOMY
- 7) ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert
- 8) กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Microscope) ยี่ห้อ Nikon
- 9) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Shimadzu
- 10) เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporators) ยี่ห้อ Heidolph

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล (กรมควบคุมมลพิษ, 2544)

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน บริเวณท่าเรือจำนวน 3 ท่าเรือ คือ ท่าเรือ สงขลา ท่าเรือกันตัง และท่าเรือติเกา เตรียมขวดเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 250 มิลลิลิตร โดยล้างขวดแก้วด้วยน้ำยาล้างจาน ถูขวดและฝาด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ปิดฝาขวดหลวมๆ หลังจากนั้นนำขวดไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วและอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นและปิดฝาให้แน่นสนิท ทำการเก็บตัวอย่างน้ำท่าเรือละ 3 ขวด แต่ละจุดเก็บห่างกันไม่ให้รบกวนกันระหว่างน้ำทะเล โดยการคว่ำขวดและจุ่มลงตรงๆ ไปในน้ำลึกประมาณ 30 เซนติเมตร หลังจากนั้นจึงหยางขวดโดยหันปากขวดไปในทิศทางที่น้ำไหลมาหรือถ้าไม่มีไหลให้ดันขวดไปข้างหน้าช้าๆ เพื่อไม่ให้สิ่งที่ปนเปื้อนจากมือผู้เก็บไหลเข้าไปในขวด เก็บรักษาตัวอย่างน้ำโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปทำการทดลองขั้นตอนต่อไปในห้องปฏิบัติการภายในเวลา 6 ชั่วโมง

3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนจากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมัน (Cunha *et al.*, 2004)

3.2.2.1 นำตัวอย่างน้ำทะเลมาทำการคัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate โดยเจือจางน้ำตัวอย่างด้วย sterile normal saline 0.85% (w/v) ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{-1} - 10^{-7} นำจานเพาะเชื้อที่เทอาหาร Plate count agar (PCA) ที่มีการเติม NaCl ความเข้มข้น 3% (w/v) ทิ้งไว้จนอาหารแข็งแล้วเปิดน้ำตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} - 10^{-7} มาอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัว L เกลี่ยให้เชื้อแพร่กระจาย บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ steak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ให้โคโลนีเดี่ยว

3.2.2.2 เชื้อเชื้อที่แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ 1 หลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium (MSM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันดีเซล 0.5% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.2.3 เมื่อครบกำหนดเวลาทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำมันดีเซล 1.0% (v/v) และเปิดเชื้อตัวอย่างจากข้อ 3.2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.2.4 เมื่อครบกำหนดเวลาทำการทดลองซ้ำตามวิธีข้อ 3.2.2.3 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นน้ำมันดีเซลทุกๆ 72 ชั่วโมง เป็น 1.5 และ 2.0% (v/v) ตามลำดับ

3.2.2.5 เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างเชื้อในอาหารเหลวชุดสุดท้ายมาเจือจาง (serial dilution) ด้วย sterile normal saline 0.85% (w/v) แล้วทำการ spread plate และถ่ายเชื้อลงบนอาหาร วุ้นเอียง (NA slant) แล้วเก็บรักษาเชื้อไว้ในตู้เย็นหรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการ ทดลองขั้นต่อไป

3.2.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นแรก (primary screening)

เตรียมชุดตัวอย่าง culture broth โดยนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ

3.2.2.5 แต่ละไอโซเลตมา 1 ลูบ ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีกลูโคส อยู่ 2% (w/v) นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.3.1 ทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิว ด้วยวิธี drop-collapse (Bodour and Miller-Maier, 1998) โดยทำความสะอาดหลุมขนาดเล็ก (microwells plate) โดยการชะล้างด้วยน้ำกลั่นต้มเดือด 3 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ แล้ว ปล่อยให้แห้ง ทำการเคลือบ microwells plate แต่ละหลุมให้มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ด้วยน้ำมันเครื่องปริมาณ 1.8 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้ น้ำมันเครื่องที่เคลือบไว้คงตัว ทำการปิเปตตัวอย่าง culture broth ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงตรงกลางหลุมของ microwells plate ที่เคลือบน้ำมันเตรียมไว้ แล้วสังเกตผลที่เกิดขึ้นในเวลา 1 นาที ให้แสดงผลดังนี้

- 1) ถ้าหยดน้ำมันเครื่องยังคงมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ ให้แสดงผลเป็นลบ (-)
- 2) ถ้าเกิดการสลายของหยดน้ำมันเครื่อง ให้แสดงผลเป็นบวก (+)

3.2.3.2 การทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมันด้วยวิธี oil displacement test (Morikawa *et al.*, 1993) ทำการปิเปตน้ำมันเครื่องปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำ กลั่นปริมาณ 40 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 95 มิลลิเมตร) ซึ่งจะ ทำให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ขึ้นทันที หลังจากนั้นค่อยๆ หยดตัวอย่าง culture broth ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนตรงกลางของแผ่นฟิล์มน้ำมันเครื่อง ซึ่งจะทำให้เกิดช่องว่างใสขึ้น ทำการวัด เส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมใสที่เกิดขึ้น แล้วนำไปคำนวณหาพื้นที่การกระจายน้ำมันเครื่องเป็น ตารางเซนติเมตร oil displacement area (ODA) ดังสมการที่ 3

$$ODA = 22/7 (\text{รัศมี})^2 \quad \text{ตารางเซนติเมตร} \quad (3)$$

ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พิจารณา จากการสลายของหยดน้ำมัน โดยวิธี drop-collapse ที่ให้ผลเป็นบวก (+) และได้ค่า ODA สูง มาทำ การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นสองต่อไป

3.2.4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นสอง (secondary screening)

3.2.4.1 การทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (emulsification activity) (Cooper and Goldenberg, 1987)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกขั้นแรกจากข้อ 3.2.3 แต่ละไอโซเลทมา 1 ลูบ ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมกลูโคส 2% (w/v) และนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 108 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่าง culture broth เพื่อแยกเอา เซลล์แบคทีเรียออก ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการแยกส่วนใส (supernatant) หลังจากนั้นทำการเปิดน้ำมันเครื่องปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี supernatant อยู่ 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่ระดับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งพักไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) โดยการคำนวณหาค่า emulsification index (E_{24}) ดังสมการที่ 4

$$E_{24} = \frac{\text{ความสูงของของเหลวที่เกิดอิมัลชัน} \times 100}{\text{ความสูงของของเหลวทั้งหมด}} \quad (4)$$

แล้วทำการคัดเลือกเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชันสูงมาทำการศึกษาต่อไป

3.2.4.2 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2.4.1 เชื้อเชื้อมา 1 ลูบ ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคสอยู่ 2% (w/v) นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรีย โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี pour plate โดยนำ suspension ของแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ใส่จานเพาะเชื้อแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลวลงไป เขย่าให้เชื้อแพร่กระจาย ทิ้งไว้ให้แข็ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำจำนวนแบคทีเรียที่นับได้มาเขียนกราฟการเจริญเติบโตระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml.) เทียบกับเวลา (ชั่วโมง)

เนื่องจากการทดลองกับเชื้อแบคทีเรีย ทุกขั้นตอนหลังทำการทดลองต้องฆ่าเชื้อเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อแบคทีเรียจากการทดลองปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม

3.2.5 การเทียบเคียงและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก

นำแบคทีเรียคัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 มาศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม ความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility) ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) ได้แก่ การทดสอบแคตาเลส (catalase test) การทดสอบลิซิทีเนส (lecithinase test) การทดสอบการหมักย้อยน้ำตาลแมนนิทอล (ferment mannitol) การทดสอบความสามารถการย่อยสลายเม็ดเลือด (hemolysis) เพื่อเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียโดยเทียบกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Brown, 1939) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบส 16S rDNA ประมาณ 500 เบสในการเปรียบเทียบ ทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.2.6 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นของปัจจัยศึกษา

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกัน จึงต้องทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาช่วงชั้นของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยมีปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน ทำการเตรียมเชื้อตั้งต้นจากแบคทีเรียคัดเลือกตามวิธีข้อ 3.2.4

3.2.6.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ในการสร้างพลังงานและเซลล์ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอน และน้ำมันพืช กลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่เลือกใช้ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแลคโตส กลุ่มไฮโดรคาร์บอนที่ใช้คือน้ำมันดีเซล กลุ่มน้ำมันพืชที่ใช้คือน้ำมันปาล์ม เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจลนทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่าย ซูโครสและแลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ มีความเป็นไปได้ในการใช้ในอุตสาหกรรม คือ กากน้ำตาล และเวย์ ตามลำดับ น้ำมันปาล์มราคาถูกกว่าเมื่อเทียบกับน้ำมันพืชชนิดอื่น น้ำมันดีเซลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีความสนใจในการศึกษา จึงเป็นที่มาในการกำหนดชนิดแหล่งคาร์บอน

ทำการถ่ายเชื้อตั้งต้น 2.5% (v/v) ลงในอาหาร MSM 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่เติมแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 5 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส แลคโตส ปริมาณ 2.0% (w/v) น้ำมันปาล์ม และน้ำมันดีเซล ปริมาณ 2.0% (v/v) นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการแยกส่วน supernatant เพื่อหาค่า E_{24} วิธีการตามข้อ 3.2.2.2 โดยเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า E_{24} สูงที่สุด

3.2.6.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ peptone และ yeast extract แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ NaNO_3 , KNO_3 และ NH_4SO_4 ทำการถ่ายเชื้อตั้งต้น 2.5% (v/v) ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.6.1 ปริมาณ 1.0% (w/v) หรือ 1.0% (v/v) เติมแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด คือ peptone, yeast extract, NaNO_3 , KNO_3 และ NH_4SO_4 ที่ความเข้มข้น 0.1 % (w/v) นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการแยกส่วน supernatant เพื่อหาค่า E_{24} วิธีการตามข้อ 3.2.2.2 โดยเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า E_{24} สูงที่สุด

3.2.6.3 อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายเชื้อตั้งต้น 2.5% (v/v) ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.6.2 ปริมาณ 0.1% (w/v) และเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.6.1 อัตราส่วนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ถึง 50:1 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการแยกส่วน supernatant เพื่อหาค่า E_{24} วิธีการตามข้อ 3.2.2.2 โดยเลือกอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า E_{24} สูงที่สุด

3.2.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นของปัจจัยศึกษาจะได้ชนิดแหล่งคาร์บอน ชนิดแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน หลังจากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้เทคนิค response surface methodology (RSM) วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken เพื่อศึกษาผลของตัวแปรอิสระ (independent variable) ต่อค่าตอบสนองหรือตัวแปรตาม (dependent variation) ซึ่งตัวแปรอิสระที่ทำการศึกษามี 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และ pH เริ่มต้น ส่วนค่าตอบสนองคือ ค่า emulsification index ซึ่งนำผลการทดสอบเบื้องต้นอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนมากำหนดค่าระดับของปัจจัยของความเข้มข้นกลูโคสและความเข้มข้นไนโตรเจน โดยศึกษาในอาหาร MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็ว 165 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง การกำหนดระดับของปัจจัยทั้ง 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) ทำให้ได้

หน่วยการทดลองทั้งหมด 17 หน่วย แล้วทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (ภาคผนวก ค)

3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ

3.2.7.1 นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 มาเลี้ยงในอาหาร MSM เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีความขุ่นเท่ากับ 0.5) เพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อ

3.2.7.2 ถ่ายก้ำเชื้อปริมาณ 2.0 % (v/v) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำทะเลจากบริเวณเดียวกันกับจุลินทรีย์ที่คัดเลือก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำมันดีเซล 2.0 % (v/v) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 165 รอบ/นาที ทำการเก็บตัวอย่างที่ 7 วัน ทดสอบการย่อยสลายน้ำมัน โดยวิธีการชั่งน้ำหนักน้ำมันดีเซลที่หายไป (weight loss method) โดยสกัดน้ำมันที่เหลืออยู่ด้วยเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:1 ทำการสกัด 2 ครั้ง แล้วนำส่วนของตัวทำละลายมากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำสารที่ได้อบในโถดูดความชื้นเพื่อลดความชื้นที่เหลืออยู่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักสารที่ได้ (Shirai *et al.*, 1995) จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดังสมการที่ 5

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน (\%)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100 \quad (5)$$

$$W_1 = \text{น้ำหนักของน้ำมันเริ่มต้น}$$

$$W_2 = \text{น้ำหนักของน้ำมันที่เหลือจากการใช้จุลินทรีย์}$$

3.2.7.3 ทดสอบทางคุณภาพเพื่อยืนยันการย่อยสลายน้ำมันดีเซลด้วยเครื่อง Gas chromatograph with mass spectrometry (GC-MS) โดยการสกัดน้ำมันดีเซลที่เหลืออยู่ในชุดตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อวันที่ 0 และหลังเติมเชื้อเป็นเวลา 7 วันด้วยเฮกเซน โดยทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟชุดตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อวันที่ 0 และหลังเติมเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้สภาวะดังแสดงในตาราง 3-1

ตารางที่ 3-1 สภาวะในการวิเคราะห์สารไฮโดรคาร์บอนด้วยเครื่อง GC-MS

Gas Chromatograph	Mass Spectrometer
Inlet temperature : 280 °C, Split 10:1	Ionization mode : Electron Ionization
Oven temperature : 60 °C, 2 min. Ramp to 300 °C 12 °C/min, hold for 10 min	Acquisition mode : Scan, 29-500 amu Ion source temp. : 280 °C
Constant Flow : 1.0 ml/min	Transferline temp. : 280 °C
Column : Tr-5MS, length 30 m., 0.32 mm I.D, film thickness 0.25 µm	Solvent delay time : 3 min

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณท่าเรือจำนวน 3 ท่าเรือ คือ ท่าเรือสงขลา ท่าเรือกันตัง และท่าเรือสิเกา จังหวัดตรัง มาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่มีการเติม NaCl 3% (w/v) ได้แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จำนวน 12 ไอโซเลท ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate บนอาหาร NA และนำเชื้อที่บริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทมาคัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลที่ระยะเวลา บ่มทุกๆ 72 ชั่วโมง จากความเข้มข้น 0.5 เป็น 1.0 1.5 และ 2.0 % (v/v) พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันดีเซลเป็นองค์ประกอบทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากท่าเรือสงขลา (S) จำนวน 3 ไอโซเลท ท่าเรือกันตัง (K) จำนวน 3 ไอโซเลท และท่าเรือสิเกา (T) จำนวน 4 ไอโซเลท จากจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลเดิมเพียง 12 ไอโซเลท ซึ่งเป็นจำนวนที่น้อย เนื่องจากตัวอย่างน้ำทะเลที่ทำการเก็บมีปริมาณน้อย ควรเพิ่มปริมาณและเพิ่มจำนวนพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ส่วนขั้นตอนการคัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนทำการทดลองเติมน้ำมันดีเซล 2.0 % (v/v) ในอาหาร MSM เมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จึงเปลี่ยนเป็นค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลให้เชื้อได้มีการปรับตัวกับสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ

แบคทีเรียคัดแยกที่สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งไม่มีแหล่งคาร์บอนอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนและนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ จึงใช้เป็นวิธีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมาในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่มีการเติมน้ำมันเครื่องความเข้มข้น 2% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 71 ไอโซเลทที่สามารถใช้น้ำมันเครื่องเป็นแหล่งคาร์บอน โดยวัดจากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (Borah and Yadav, 2014) และการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเลในประเทศอิหร่าน โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันบนอาหาร mineral salt agar ที่เติมน้ำมันดิบความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ 10 ไอโซเลท (Safary *et al.*, 2010)

4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.2.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชั้นที่ 1

เนื่องด้วยแบคทีเรียใดๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชั้นที่ 1 ใช้วิธีการทดสอบ 2 วิธี คือวิธี drop-collapse ซึ่งเป็นวิธีทดสอบทางคุณภาพ นิยมใช้ในการคัดกรองเบื้องต้น ซึ่งส่วนใหญ่ทำควบคู่กับการทดสอบทางปริมาณ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธี oil displacement test เมื่อนำแบคทีเรียคัดแยกจำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop-collapse ผลจากการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 5 ไอโซเลทที่ให้ผลเป็นบวก คือ K1 T1 T4 S1 และ S2 (ตารางที่ 4-1) และนำมาทดสอบ oil displacement test พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 5 ไอโซเลท ที่ได้ค่า ODA สูงสุด คือ S1 S2 T1 K1 และ T4 โดยมีค่าเท่ากับ 4.57 4.57 4.57 3.86 และ 2.27 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) เมื่อพิจารณาจากวิธี drop-collapse ที่ให้ผลบวก และค่า ODA สูง พบว่ามีแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท คือ K1 T1 T4 S1 และ S2 ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว โดยวิธี drop-collapse และวิธี oil displacement test อาศัยหลักการของการลดแรงตึงผิวของฟิล์มของน้ำมันเครื่องที่เคลือบอยู่ เมื่อหยดตัวอย่าง culture broth ที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำให้เกิดการสลายของหยดน้ำมันเครื่อง จึงนำแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทมาทำการคัดเลือกแบคทีเรียในขั้นที่สองต่อไป จากผลการทดสอบด้วยวิธี drop-collapse ที่ให้ผลลบและให้ค่า ODA ต่ำ อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อที่ทำการทดสอบมีระดับต่ำ เมื่อทดสอบด้วยวิธี drop-collapse จึงไม่สามารถวัดกิจกรรมด้วยวิธีนี้ได้ เนื่องจากมีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ (Walter *et al.*, 2010)

ในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นการใช้น้ำมันเครื่องในการทดสอบ เนื่องจากเป็นน้ำมันที่สามารถเกิดกิจกรรมอิมัลชันและวัดค่าความสูงที่เกิดขึ้นได้ชัดเจนกว่าน้ำมันชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ (น้ำมันเตา น้ำมันก๊าด น้ำมันปาล์ม น้ำมันดีเซล และน้ำมันเบนซิน) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด เช่นการศึกษาของ กุลนรี เพชรรงค์ (2550) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* สามารถเกิดกิจกรรมอิมัลซิไฟด์ไฮโดรคาร์บอนได้ทั้งชนิด aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon แต่มีความจำเพาะกับ aromatic hydrocarbon มากกว่า aliphatic hydrocarbon โดยสามารถอิมัลซิไฟด์ toluene ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4-1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop-collapse และ oil displacement test ของแบคทีเรียคัดแยก 10 ไอโซเลท

ไอโซเลท	Drop collapse	Oil displacement area (cm ²)
S1	+	4.57±0.09 ^c
S2	+	4.57±0.09 ^c
S3	-	0.15±0.02 ^a
K1	+	3.86±0.10 ^d
K2	-	0.13±0.02 ^a
K3	-	0.19±0.02 ^a
T1	+	2.32±0.08 ^c
T2	-	0.13±0.02 ^a
T3	-	0.89±0.09 ^b
T4	+	4.57±0.09 ^c

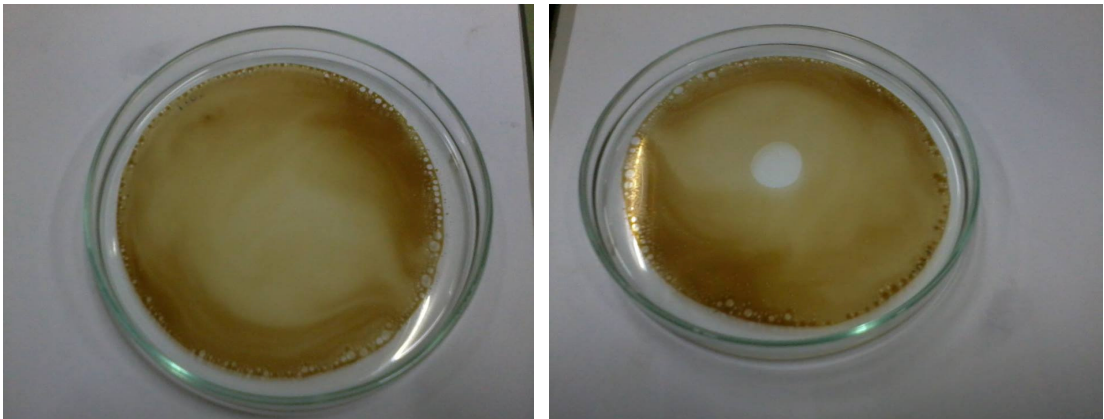
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05)

S คือ ทำเรือสงขลา K คือ ทำเรือกันตัง และ T คือ ทำเรือสิเกา

+ คือ เกิดการสลายตัวของหยดน้ำมันเครื่อง, - คือ ไม่เกิดการสลายตัวของหยดน้ำมันเครื่อง



ภาพที่ 4-1 ลักษณะหยดน้ำมันเครื่องเมื่อทดสอบด้วยวิธี drop-collapse แล้วยังคงเม็ดกลมๆ ไม่เกิดการสลายตัวของหยดน้ำมันเครื่อง (ด้านซ้าย) และเกิดการสลายตัวของหยดน้ำมันเครื่อง (ด้านขวา)



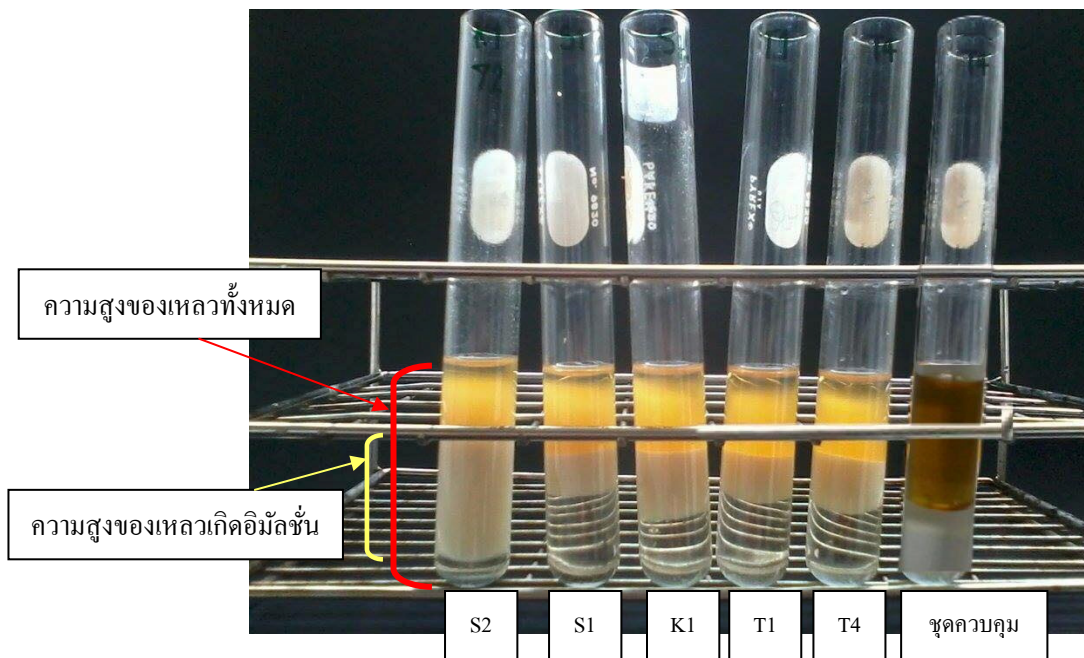
(a)

(b)

ภาพที่ 4-2 ลักษณะแผ่นฟิล์มน้ำมันในการทดสอบด้วยวิธี oil displacement (a) ก่อนหยด culture broth (b) หลังหยด culture broth

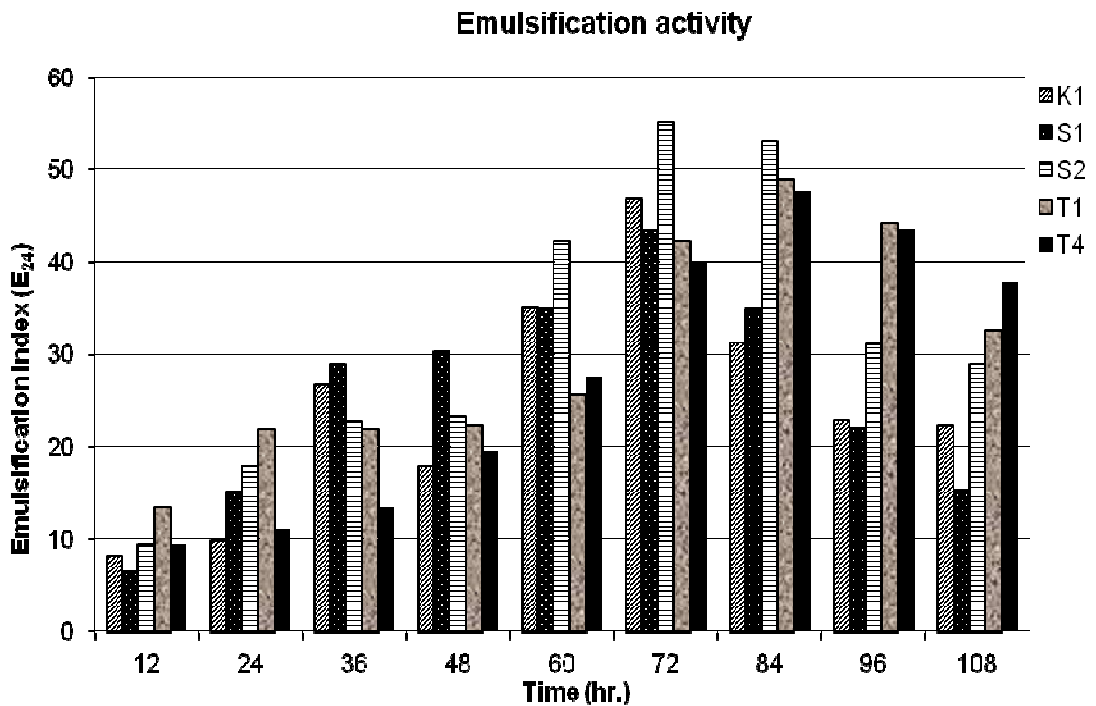
4.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียชั้นที่ 2

จากการคัดเลือกแบคทีเรียชั้นที่ 1 ได้แบคทีเรีย จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ K1 T1 T4 S1 และ S2 นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดจากค่า E_{24} โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 108 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท S2 ให้ค่า E_{24} สูงสุดเท่ากับ 55.10 % เมื่อเวลา 72 ชั่วโมงดังภาพที่ 4-3 ไอโซเลท T1 ให้ค่า E_{24} สูงสุดเท่ากับ 48.89 % เมื่อเวลา 84 ชั่วโมง ไอโซเลท T4 ให้ค่า E_{24} สูงสุดเท่ากับ 47.73 % เมื่อเวลา 84 ชั่วโมง ไอโซเลท K1 ให้ค่า E_{24} สูงสุดเท่ากับ 46.67 % เมื่อเวลา 72 ชั่วโมง และไอโซเลท S1 ให้ค่า E_{24} สูงสุดเท่ากับ 43.33 % เมื่อเวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-3 ลักษณะการเกิดกิจกรรมอิมัลชันของแบคทีเรียคัดเลือก 5 ไอโซเลทที่ 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยน้ำมันเครื่อง

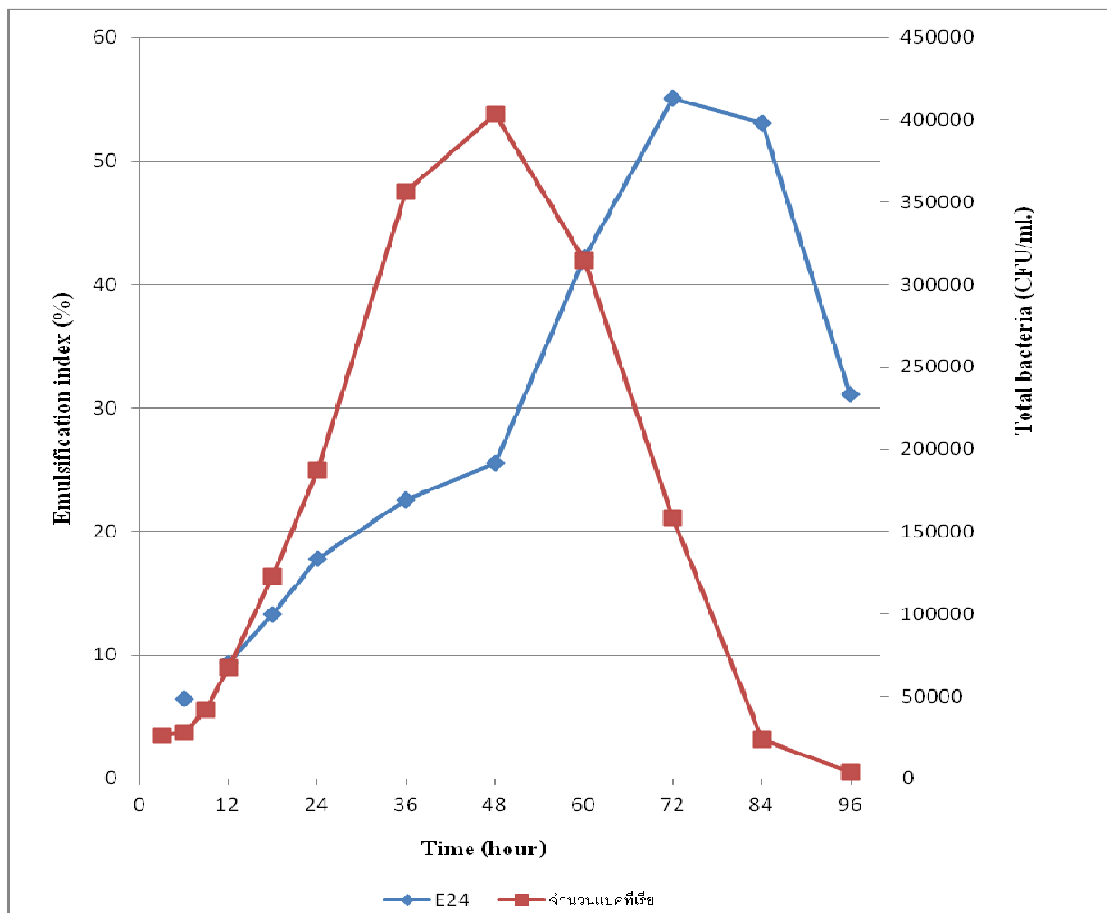
ผลการคัดเลือกแบคทีเรียชั้นที่ 2 โดยพิจารณาจากค่า E_{24} พบว่าเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท S2 มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด ซึ่งให้ค่า E_{24} มากที่สุด 55.10 % เมื่อเวลา 72 ชั่วโมง จึงเลือกไอโซเลท S2 เป็นแบคทีเรียคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อพิจารณาระยะเวลาการบ่มเชื้อในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีประสิทธิภาพดีที่สุดในเวลา 72 ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Praveesh และคณะ (2011) ศึกษาระยะเวลาในการบ่มเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. โดยศึกษา ระยะเวลาในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 0-144 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมงสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด rhamnolipid ได้มากที่สุด



ภาพที่ 4-4 ผลของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันแบบที่เรียกคัดเลือก 5 ไอโซเลท ทดสอบด้วยน้ำมันเครื่อง

วิธีที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นที่ยอมรับ ได้แก่ วิธี drop collapse test, oil displacement test, emulsification test ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ (Tugrul and Cansunar, 2005; Thavasi *et al*, 2009; Walter *et al*, 2010 Praveesh *et al*, 2011; Dhail and Jasuja, 2012; Khopade *et al*, 2012) ผลการศึกษาของ อรรถมล ฤคดี (2555) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างน้ำเสียที่มีน้ำมันปาล์มปนเปื้อน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 808 ไอโซเลท นำมา primary screening โดยใช้วิธี drop collapsing test พบเชื้อแบคทีเรียที่เกิดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวจำนวน 72 ไอโซเลท จากนั้นนำมา secondary screening โดยวัดความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) ค่าความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน (E_{24}) และวัดค่าแรงตึงผิว สามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดจำนวน 14 ไอโซเลท ส่วนการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณท่าเรือประเทศอินเดียได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท เมื่อนำมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้วิธี drop collapse test, oil displacement test, emulsification test และการย่อยสลายเม็ดเลือด พบว่าเชื้อแบคทีเรีย 6 ไอโซเลทที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Dhail and Jasuja, 2012)

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก S2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียคัดเลือกมาศึกษาอัตราการเจริญเติบโต นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA โดยวิธี pour plate แล้วนำจำนวนแบคทีเรียที่นับได้มาเขียนกราฟการเจริญเติบโตระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml.) เทียบกับเวลา (ชั่วโมง) และค่า E_{24} (ภาพที่ 4-5) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย S2 มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง และให้ค่า E_{24} มากที่สุดที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาที่เกิดกิจกรรมอิมัลชันมากที่สุดเป็นการเจริญเติบโตช่วง decline phase เป็นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ (biosurfactant production by growing cell under growth-limiting condition) ในภาวะที่จำกัดปริมาณของแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญลักษณะการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นลักษณะการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างสารที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ตัวอย่างเช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P. aeruginosa* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจนถึงภาวะที่ปริมาณของไนโตรเจนในอาหารหมดจะมีผลทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงมากขึ้น (Robert *et al.*, 1989)



ภาพที่ 4-5 กราฟการเจริญเติบโตและกิจกรรมการเกิดอิมัลชันของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก S2

4.3 การเทียบเคียงและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2 ที่คัดเลือกได้พบว่ามีลักษณะโคโลนีกลม (circular) นูน (convex) ผิวหน้าเรียบ (smooth) ขอบเกลี้ยง (entire) สีขาวขุ่น (off white) เมื่อทำการย้อมสีแกรม เพื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง (rod) สร้างสปอร์อยู่กลางเซลล์ไม่ทำให้ป่องตรงกลาง (central spores, sporangium wall not enlarged) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเชื้อสกุล *Bacillus* เมื่อทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์ catalase มีการสร้างเอนไซม์ lecithinase ไม่มีการหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอล และสามารถย่อยสลายเมล็ดเลือดได้ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกับเชื้อ *Bacillus cereus* (ตาราง 4-2) เมื่อทดสอบทางอนุวิทยา โดยใช้ลำดับเบส 16S rDNA ประมาณ 500 เบสในการเปรียบเทียบ พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงเชื้อ *Bacillus cereus* strain ATCC14579 (T) 99.86%

ตารางที่ 4-2 คุณสมบัติของแบคทีเรียคัดเลือก

Characteristics	Isolation S2	<i>B. cereus</i>
Gram reaction	positive	positive
Cell shape	rod	rod
Spore	+	+
Motility	-	-/+
Rhizoid colony	-	-
Parasporal crystal	-	-
Lecithinase	+	+
Ferment mannitol	-	-
Catalase	+	+
Hemolysis	+	+

หมายเหตุ : + คือ เกิดปฏิกิริยา, - คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา, +/- คือ เกิดหรือไม่เกิดปฏิกิริยา

เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมได้ โดยสปอร์จะทนต่อความร้อนสูงและยังช่วยให้แบคทีเรียสามารถแพร่กระจายไปกับดิน น้ำ และอากาศได้ดีขึ้น (Nicholson *et al.*, 2000)

โดยเชื้อสกุล *Bacillus* sp. ที่มีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *B.megaterium*, *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.mycoideus*, *B.sonorensis* (Youssef et al., 2004) ส่วนเชื้อ *Bacillus cereus* ที่มีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นการศึกษาของ Nasr และคณะ (2009) ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจำนวน 102 ไอโซเลท มาคัดเลือกแบคทีเรียเบื้องต้นโดยใช้ 3 วิธี คือ hemolytic activity, oil displacement test และ drop collapse นำมาคัดเลือกแบคทีเรียที่ลดแรงตึงผิวต่ำกว่า 40 mN/m และมีกิจกรรมอิมัลชันมากกว่า 50 % พบว่ามี 2 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพกิจกรรมดังกล่าว เมื่อใช้ลำดับเบส 16S rDNA ในการเปรียบเทียบ คือ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* ส่วนการคัดแยกแบคทีเรียโดยเติมน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการคัดเลือกแบคทีเรียด้วยวิธี oil displacement test และวัดค่า emulsification index (E_{24}) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Jaysree et al., 2011)

4.4 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นของปัจจัยศึกษา

4.4.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างกัน 5 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส แลคโตส ปริมาณ 2.0% (w/v) น้ำมันปาล์ม และน้ำมันดีเซล ปริมาณ 2.0% (v/v) พบว่าค่า E_{24} สูงสุดอยู่ที่ 56.51 % เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือ ซูโครส มีค่าเท่ากับ 37.19 % ส่วนน้ำมันดีเซล แลคโตส และน้ำมันปาล์ม มีค่าเท่ากับ 33.74 29.51 และ 24.80 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4-3) ดังนั้นจึงเลือกกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจึงทำให้ง่ายต่อการที่เชื้อแบคทีเรียนำไปใช้ เป็นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้สารตั้งต้นที่ละลายน้ำได้ ในการวิจัยเพิ่มเติมควรทำการศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำและมีราคาถูก เช่น กากน้ำตาลซึ่งโดยทั่วไปมีส่วนประกอบเป็นซูโครสประมาณร้อยละ 30-50 เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยมีความเป็นไปได้ในการนำกากน้ำตาลมาใช้เนื่องจากผลการทดลองเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่า E_{24} รองลงมาจากกลูโคส จากการศึกษาที่ผ่านมาในการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Aparna และคณะ (2012) ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *Bacillus clausii* โดยมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และกากน้ำตาล พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น คือ 2.11 กรัมต่อลิตร และให้ค่า surface tension เท่ากับ 30.21 mN/m เช่นเดียวกับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM พบว่าเมื่อใช้กลูโคสปริมาณ 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 7.5 กรัมต่อลิตร ให้ค่า surface tension เท่ากับ 26.5 mN/m และให้ค่า E₂₄ เท่ากับ 74 % เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น คือ กลูโคส กลีเซอรอล ซูโครส น้ำมันมะกอก และน้ำมันถั่วเหลือง (Wu *et al.*, 2008)

ตารางที่ 4-3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ *B. cereus* จากแหล่งคาร์บอนต่างๆ

Carbon source	Emulsification index (%)
Glucose	56.51±0.70 ^c
Sucrose	37.19±0.53 ^d
Lactose	29.51±0.42 ^b
Palm oil	24.80±0.70 ^a
Diesel oil	33.74±0.70 ^c

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในสมมุติเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05)

4.4.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 1.0% (w/v) แล้วเติมแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 5 ชนิด คือ peptone yeast extract NaNO₃ KNO₃ และ NH₄SO₄ ที่ความเข้มข้น 0.1 % (w/v) พบว่าค่า E₂₄ สูงสุดอยู่ที่ 57.99 % เมื่อใช้ NaNO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจน รองลงมาคือ KNO₃ มีค่าเท่ากับ 45.93 % ส่วน NH₄SO₄, Peptone และ Yeast extract มีค่าเท่ากับ 37.92 36.93 และ 36.89 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4-4) ดังนั้นจึงเลือก NaNO₃ ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wu และคณะ (2008) เมื่อเลี้ยง *P. aeruginosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ได้แก่ NH₄Cl, NaNO₃, yeast extract, urea ความเข้มข้น 0.1% (w/v) พบว่าเมื่อใช้ NaNO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถให้ค่า surface tension (ST) น้อยที่สุดเท่ากับ 28 mN/m และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ rhamnolipid ได้ 8.6 กรัมต่อลิตร มากกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ได้แก่ NaNO₃, NH₄SO₄, KNO₃ และยูเรีย พบว่าเมื่อใช้ NaNO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 6.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น (Praveesh *et al.*, 2011)

ตารางที่ 4-4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ *B. cereus* จากแหล่งไนโตรเจนต่างๆ

Nitrogen source	Emulsification index (%)
Peptone	36.93±0.75 ^a
Yeast extract	36.89±0.53 ^a
NaNO ₃	57.99±0.58 ^c
KNO ₃	45.93±0.70 ^b
NH ₄ SO ₄	37.92±0.72 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในสมรภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05)

4.4.3 อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* S2 ในอาหาร MSM ที่เติม NaNO₃ 0.1% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ถึง 50:1 พบว่าค่า E₂₄ สูงสุดที่ 63.47 % เมื่ออัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 รองลงมาคือ อัตราส่วนเท่ากับ 20:1 มีค่าเท่ากับ 58.74 % อัตราส่วนเท่ากับ 30:1 40:1 และ 50:1 มีค่าเท่ากับ 56.51 51.63 และ 46.75 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4-5) ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นเดียวกับการศึกษาเชื้อ *P. fluorescens* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM โดยมีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมี NH₄NO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 10 ให้ค่า emulsification activity มากที่สุดเท่ากับ 50% (Abouseoud *et al.*, 2008)

ตารางที่ 4-5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *B. cereus* S2 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่างๆ

The ratio of carbon to nitrogen source	Emulsification index (%)
10:1	63.47±0.62 ^c
20:1	58.74±0.72 ^d
30:1	56.51±0.70 ^c
40:1	51.63±0.70 ^b
50:1	46.75±0.70 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในสมรภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05)

4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นของปัจจัยศึกษา พบว่าการใช้กลูโคสเป็นชนิดของแหล่งคาร์บอน NaNO_3 เป็นชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 มีความเหมาะสมที่สุด จึงใช้เทคนิค response surface methodology (RSM) ที่มีการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากผลการทดสอบเบื้องต้นที่พบว่าอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 เป็นค่าช่วงชั้นที่เหมาะสมจึงเป็นที่มาของการกำหนดระดับของความเข้มข้นกลูโคส และความเข้มข้นของ NaNO_3 จากการวัด pH ของน้ำทะเลตัวอย่างพบว่าอยู่ในช่วง 7.0-7.5 ซึ่งเป็นช่วง pH กลางถึงต่ำเล็กน้อย จึงกำหนดระดับ pH เริ่มต้นในการศึกษา คือ 6-8 ดังนั้นระดับของตัวแปรอิสระที่ทำการศึกษาคือ ความเข้มข้นของกลูโคส 1.0-3.0% (w/v) ความเข้มข้นของ NaNO_3 0.1-0.5% (w/v) และ pH เริ่มต้น 6-8 ดังตารางที่ 4-6 ซึ่งคำตอบสนองหรือตัวแปรตาม คือ emulsification activity โดยวัดจากค่า E_{24} มีหน่วยทดลองทั้งหมด 17 หน่วย ผลดังตารางที่ 4-7

ตารางที่ 4-6 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

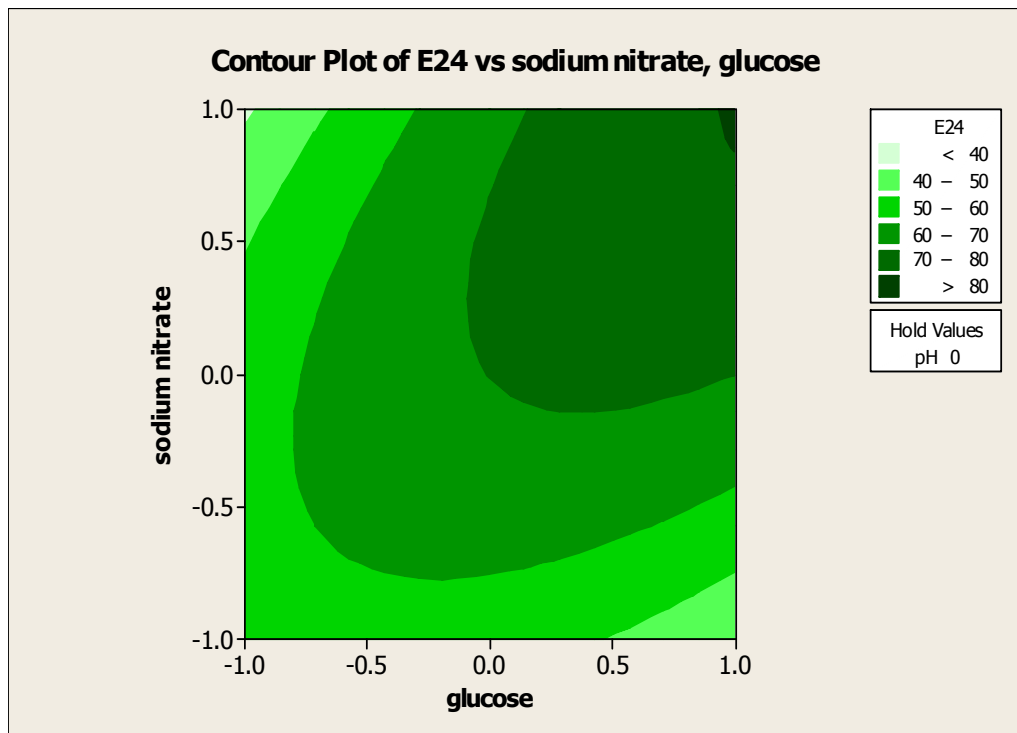
ปัจจัย	ระดับ		
	-1	0	1
ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน(X1) %(w/v)	1	2	3
ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (X2) %(w/v)	0.1	0.3	0.5
pH เริ่มต้น (X3)	6	7	8

ตารางที่ 4-7 ผลของปัจจัยต่อค่า emulsification index (E_{24})

ลำดับ การ ทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา			emulsification index (E_{24})
	ความเข้มข้นของกลูโคส % (w/v)	ความเข้มข้นของ NaNO_3 % (w/v)	pH เริ่มต้น	
1	2	0.3	7	70.44±0.73
2	2	0.3	7	63.47±0.62
3	3	0.1	7	38.65±0.61
4	2	0.3	7	76.95±0.61
5	1	0.3	8	40.78±0.62
6	3	0.3	8	42.91±0.62
7	3	0.3	6	85.46±0.61
8	2	0.5	6	79.08±0.62
9	3	0.5	7	82.97±0.63
10	2	0.1	6	68.57±0.85
11	2	0.5	8	38.49±0.57
12	1	0.3	6	58.74±0.72
13	2	0.1	8	33.80±0.41
14	2	0.3	7	73.95±0.89
15	1	0.1	7	50.71±0.61
16	1	0.5	7	40.78±0.62
17	2	0.3	7	65.50±0.80

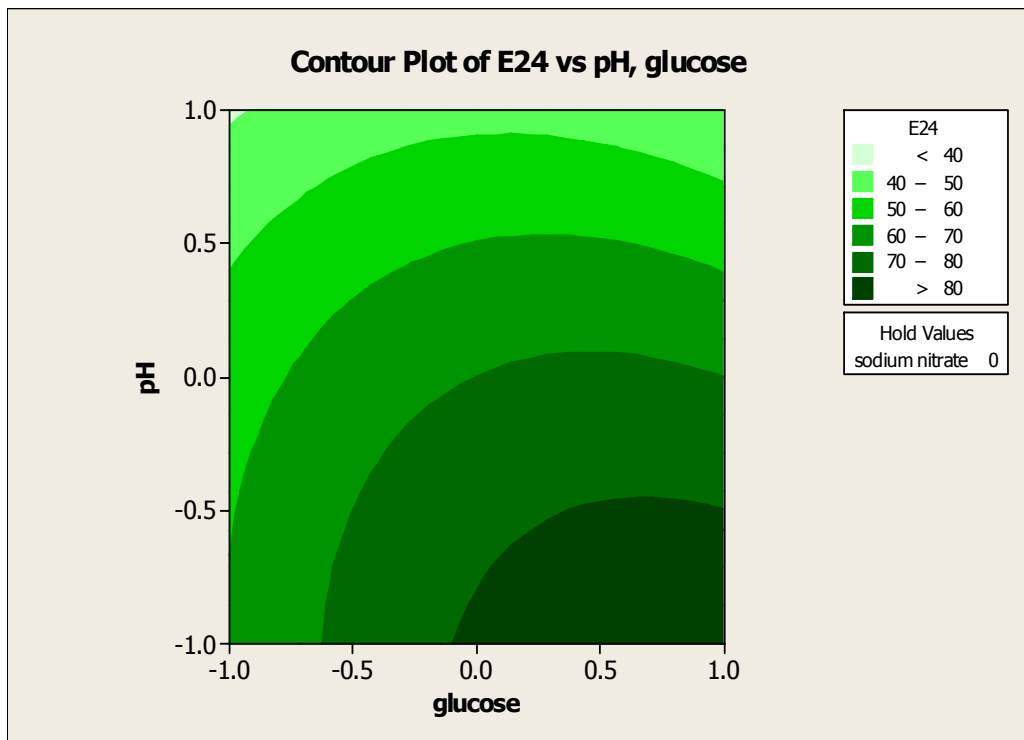
เมื่อทำการทดลองทั้ง 17 หน่วยทดลอง แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง พบว่าการทดลองเป็นไปตามสมมติฐาน ค่าความแปรปรวนมีเสถียรภาพ เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) มีค่าเท่ากับ 0.9595 หมายความว่า ตัวแปรต้น (ความเข้มข้นกลูโคส ความเข้มข้น NaNO_3 และ pH) สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม (กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน) ได้ร้อยละ 95.95 เมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า ค่า P-value มีค่าเท่ากับ 0.005 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ที่กำหนด เมื่อทดสอบความเหมาะสมของสมการถดถอย (lack of fit) พบว่าค่า P-value มีค่าเท่ากับ 0.565 ซึ่งมีค่ามากกว่าที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังแสดงในภาคผนวก ค

เมื่อนำมาสร้างกราฟโครงร่าง ภาพที่ 4-7 กำหนดให้ pH เริ่มต้นอยู่ที่ระดับกลาง จะเห็นความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกลูโคสและความเข้มข้น NaNO_3 มีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง (non linear effect) โดยที่เส้นโค้งทางขวาสุดมีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเท่ากับ 80% ส่วนโค้งที่ถัดออกเริ่มลดลง คือ 70, 60, 50 และ 40% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชันเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นกลูโคสและความเข้มข้น NaNO_3 อยู่ในระดับสูง



ภาพที่ 4-7 กราฟโครงร่างระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและความเข้มข้น NaNO_3
หมายเหตุ : ค่าปัจจัยความเข้มข้น NaNO_3 -1, 0, 1 คือ 0.1, 0.3 และ 0.5 (w/v) ตามลำดับ
ค่าปัจจัยความเข้มข้นกลูโคส -1, 0, 1 คือ 1, 2 และ 3 (w/v) ตามลำดับ

เมื่อกำหนดให้ระดับของความเข้มข้น NaNO_3 อยู่ที่ระดับกลาง ความสัมพันธ์ของ ความเข้มข้นกลูโคสกับ pH เริ่มต้น ในกิจกรรมการเกิดอิมัลชันมีลักษณะที่ไม่เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4-8 โดยที่เส้นโค้งทางขวาบนสุดของกราฟแสดงถึงกิจกรรมการเกิดอิมัลชันได้เท่ากับ 80% ส่วน โค้งถัดออกเริ่มลดลง คือ 70, 60, 50 และ 40% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน เพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นกลูโคสอยู่ที่ระดับสูงและ pH เริ่มต้นอยู่ที่ระดับต่ำ

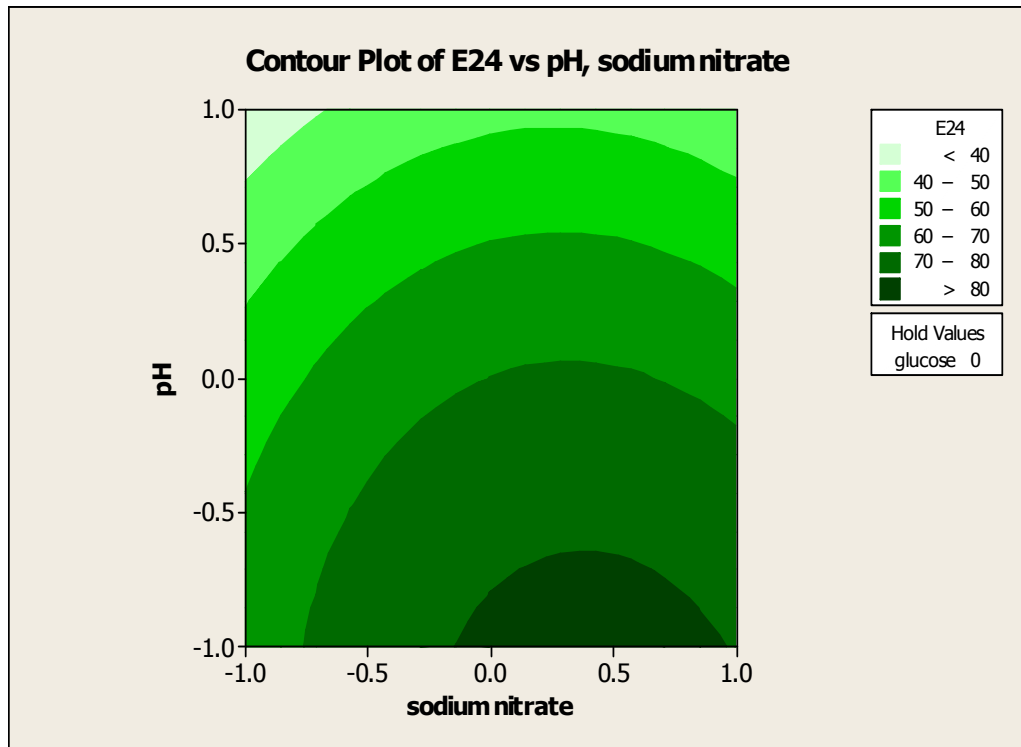


ภาพที่ 4-8 กราฟโครงร่างระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและ pH เริ่มต้น

หมายเหตุ : ค่าปัจจัย pH เริ่มต้น -1, 0, 1 แทนค่า คือ 6, 7 และ 8 ตามลำดับ

ค่าปัจจัยความเข้มข้นกลูโคส -1, 0, 1 คือ 1, 2 และ 3 (w/v) ตามลำดับ

เมื่อกำหนดให้ระดับของความเข้มข้นกลูโคสอยู่ที่ระดับกลาง จะเห็น ความสัมพันธ์ของความเข้มข้น NaNO_3 กับ pH เริ่มต้นในกิจกรรมการเกิดอิมัลชันมีลักษณะที่ไม่ เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4-9 โดยที่เส้นโค้งทางขวาล่างสุดของกราฟแสดงถึงกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน ได้เท่ากับ 80% ส่วน โค้งถัดออกเริ่มลดลง คือ 70, 60, 50 และ 40% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า กิจกรรมการเกิดอิมัลชันเพิ่มมากขึ้นเมื่อ pH เริ่มต้นอยู่ที่ระดับต่ำ และความเข้มข้น NaNO_3 อยู่ที่ ระดับสูง



ภาพที่ 4-9 กราฟโครงร่างระหว่างความเข้มข้น NaNO_3 และ pH เริ่มต้น

หมายเหตุ : ค่าปัจจัย pH เริ่มต้น -1, 0, 1 แทนค่า คือ 6,7 และ 8 ตามลำดับ

ค่าปัจจัยความเข้มข้น NaNO_3 -1, 0, 1 คือ 0.1, 0.3 และ 0.5 (w/v) ตามลำดับ

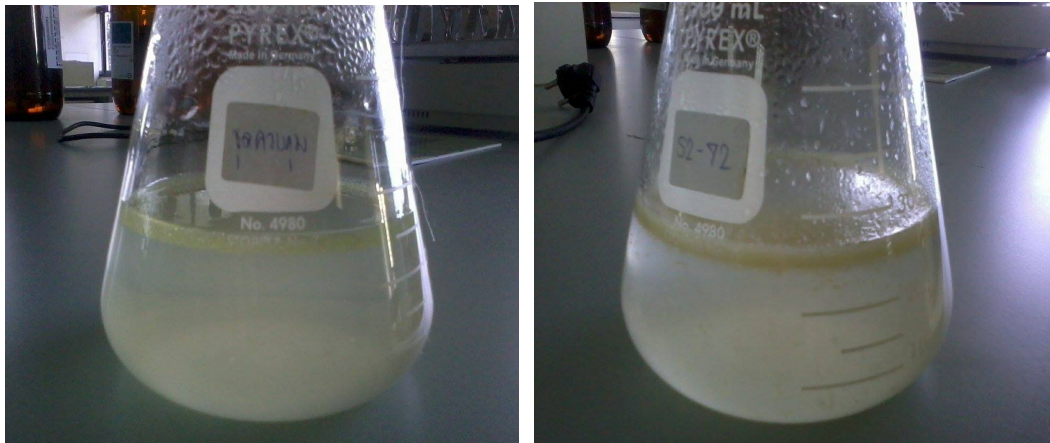
ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าความเข้มข้นกลูโคสที่ 1 ความเข้มข้น NaNO_3 ที่ 1 และ pH เริ่มต้นที่ -1 หรือเมื่อแปลงค่าจริงแล้ว สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ความเข้มข้นกลูโคส 3% (w/v) ความเข้มข้น NaNO_3 0.5% (w/v) และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์อื่นจากผลวิจัยที่ผ่านมา เช่น *Bacillus mycoides* พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 2% (w/v) และ pH เริ่มต้น 7.37 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Najafi *et al.*, 2010) ส่วนการศึกษาเชื้อ *P.aeruginosa* พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 3% (w/v) และความเข้มข้น NaNO_3 เท่ากับ 0.5 % (w/v) เป็นค่าปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Wu *et al.*, 2008)

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก *Bacillus cereus* S2 ในระดับห้องปฏิบัติการ ชุดตัวอย่างเป็นน้ำทะเลจากบริเวณที่คัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ เติมน้ำมันดีเซล 2.0 % (v/v) และเติมกล้ำเชื้อ 2.0 % (v/v) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ เมื่อครบเวลา 7 วันทำการเก็บตัวอย่างทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันโดยวิธีการชั่งน้ำหนักน้ำมันดีเซลที่หายไป (weight loss method) พบว่าชุดตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเท่ากับ 40.46% ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเท่ากับ 0.61% (ตารางที่ 4-9) จากการสังเกตลักษณะของชุดตัวอย่างที่เติมเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะบุนขาวลอยอยู่ในน้ำตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ปริมาณน้ำมันที่เกาะอยู่ที่ผิวและข้างขวดรูปชมพู่มีปริมาณลดลง (ภาพที่ 4-17) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาทำให้เกิดกิจกรรมอิมัลชันระหว่างน้ำมันดีเซลกับน้ำ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่มีน้ำมันลอยอยู่ที่ผิวน้ำและข้างขวดรูปชมพู่ จากผลการทดลองในชุดควบคุมมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลมีค่าต่ำ อาจเนื่องจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเป็นการนำตัวอย่างน้ำทะเลมาทดสอบในปริมาณน้อย จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียท้องถิ่นที่อยู่ในน้ำทะเลตัวอย่างมีปริมาณน้อย ทำให้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในชุดควบคุมมีค่าต่ำ

ตารางที่ 4-8 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระดับห้องปฏิบัติการ

ชุดทดลอง	ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซล (%)
ชุดควบคุม	0.61±0.17
ชุดตัวอย่าง	40.46±0.58

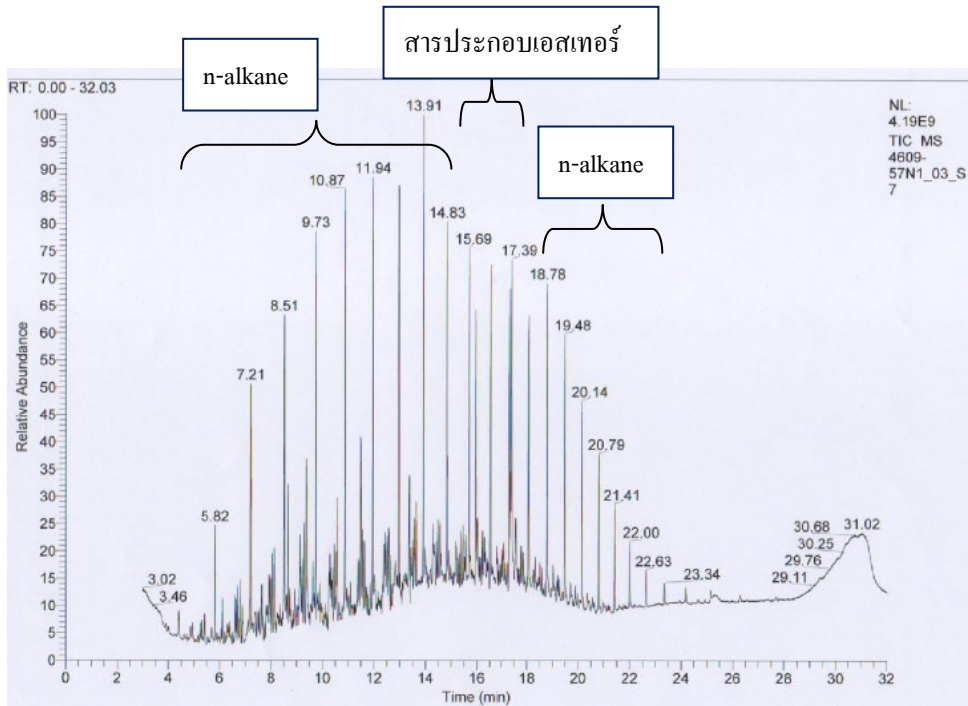


(a)

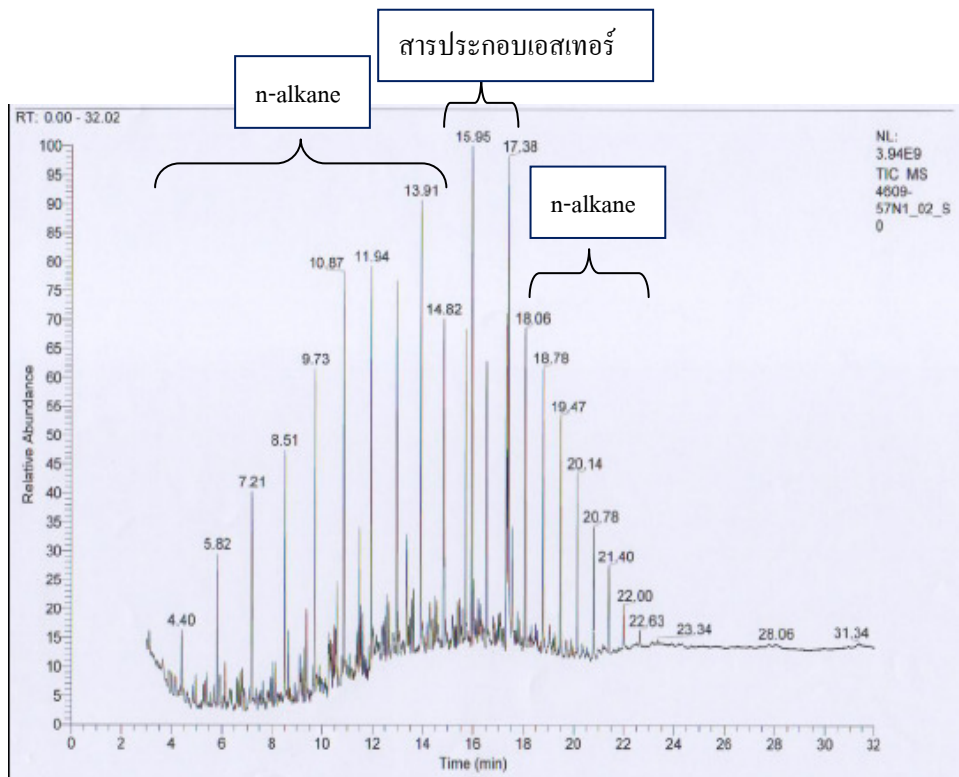
(b)

ภาพที่ 4-10 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกเป็น เวลา 7 วัน (a) ชุดควบคุมที่ไม่มี การเติมเชื้อ (b) ชุดตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ

เมื่อนำชุดตัวอย่างทดสอบทางคุณภาพเพื่อยืนยันการย่อยสลายน้ำมันดีเซลหลังเติม culture broth ของแบคทีเรียคัดเลือก 0 วันและ 7 วัน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatograph with mass spectrometry (GC-MS) ผลจากโครมาโตแกรมในชุดตัวอย่าง (ภาพที่ 4-11) เมื่อพิจารณาจากพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ในแต่ละ retention time (RT) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า น้ำมันดีเซลที่ใช้ทดลองเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภท n-alkanes และสารประกอบเอสเทอร์ ส่วนของ RT ที่มี peak area ลดลง ได้แก่ 7.21 ถึง 14.82 และ 18.78 ถึง 21.40 ซึ่งเป็นสารประกอบ alkanes ตั้งแต่ C_{11} - C_{28} แสดงให้เห็นว่าเกิดกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (C_{11} - C_{28}) ส่วน RT ที่มี peak area เพิ่มขึ้น ได้แก่ 4.40 ถึง 5.82 ซึ่งเป็นสารประกอบ alkanes ชนิด C_9 - C_{10} และ RT 15.96 และ 17.39 ซึ่งเป็นสารประกอบเอสเทอร์ $C_{17}H_{34}O_2$ และ $C_{19}H_{36}O_2$ แสดงให้เห็นว่าเกิดกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นสารประกอบเอสเทอร์ และ n-alkanes โมเลกุลต่ำ ดังนั้นสามารถยืนยันผลได้ว่าเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีเซล



(a)



(b)

ภาพที่ 4-11 โครมาโตแกรมการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยเชื้อ *Bacillus cereus* วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS (a) น้ำตัวอย่างวันที่ 0 (b) น้ำตัวอย่างวันที่ 7

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกในการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระดับห้องปฏิบัติการเป็นการเติมกล้าเชื้อโดยตรงในการทดสอบ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วกว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบสกัด จากการนำน้ำทะเลมาทดสอบเพื่อใกล้เคียงสภาพแวดล้อมจริง พบการลดลงของปริมาณน้ำมันดีเซลน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรียทดสอบเช่นเดียวกัน อาจเป็นเพราะน้ำทะเลมีปริมาณสารอาหารน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้ระยะเวลาน้อยกว่า ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันน้อยกว่า Borah และ Yadav (2014) รายงานว่าการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม 3 ชนิด คือ น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบและน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว โดยเชื้อ *Bacillus cereus* เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร BH agar ที่เติมน้ำมันปิโตรเลียม 2 % (v/v) เมื่อครบเวลา 28 วัน ทดสอบการย่อยสลายโดยใช้วิธีการชั่งน้ำหนักน้ำมันที่หายไป พบว่าน้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่องใช้แล้วมีการย่อยสลายเท่ากับ 77%, 67% และ 16% ตามลำดับ ยืนยันการย่อยสลายโดยวิเคราะห์ gas liquid chromatography พบการลดลงของน้ำมันปิโตรเลียมทั้ง 3 ชนิด ส่วนการศึกษาของ Tuleva และคณะ (2009) ที่ทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดีเซลโดยเชื้อ *Micrococcus luteus* ในอาหาร MSM ที่เติมน้ำมันดีเซล 2 % (v/v) และเติมกล้าเชื้อ 10% (v/v) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบการย่อยสลาย total petroleum hydrocarbons 93% ซึ่งมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงเนื่องจากการทดสอบที่มีการควบคุมอุณหภูมิ และมีการเติมกล้าเชื้อปริมาณมากกว่าทำให้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงกว่า

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลในระดับห้องปฏิบัติการของแบคทีเรียคัดเลือกเท่ากับ 40.46% ในเวลา 7 วัน แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกไปศึกษาการขยายกำลังผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้ปริมาณมาก หรือปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันมากขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมแทนการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีความอ่อนไหวทางทรัพยากรสิ่งแวดล้อม เช่น ป่าชายเลน ชายหาด พื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น

ในปัจจุบัน ได้มีผลิตแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าสำหรับกำจัดคราบน้ำมันทางชีวภาพ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของเหลว ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม 8 สายพันธุ์ ผสมสารประกอบเกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) สารรักษาสภาพจุลินทรีย์ (preservatives) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biodegradable surfactant) ซึ่งมีการใช้งานยาวนานเป็นที่ยอมรับ ลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม เช่น *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp.

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันดีเซลเป็นองค์ประกอบ โดยเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลจากความเข้มข้น 0.5 ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากท่าเรือสงขลา (S) จำนวน 3 ไอโซเลท ท่าเรือกันตัง (K) จำนวน 3 ไอโซเลท และท่าเรือสเกา (T) จำนวน 4 ไอโซเลท เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นที่ 1 (primary screening) พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 5 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกสำหรับวิธี drop-collapse และได้ค่า oil displacement area (ODA) สูง คือ K1 T1 T4 S1 และ S2 จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียขั้นที่ 2 (secondary screening) ทดสอบ emulsification activity พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S2 ให้ค่า emulsification index มากที่สุด 55.10% เมื่อเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการเทียบเคียงและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย โดยใช้ลักษณะฐานฐานวิทยา ทดสอบทางชีวเคมีบางประการ และใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rDNA ประมาณ 500 เบสในการเปรียบเทียบ พบว่าแบคทีเรีย S2 มีความใกล้เคียงเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ 99.86 % ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นของปัจจัยศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าให้ค่า emulsification index มากที่สุด เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 เมื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เทคนิค response surface methodology (RSM) ที่มีการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken เพื่อศึกษาผลของตัวแปรอิสระ 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของกลูโคส 1.0-3.0% (w/v) ความเข้มข้นของ NaNO_3 0.1-0.5% (w/v) และ pH เริ่มต้น 6-8 ต่อค่าตอบสนองหรือตัวแปรตาม คือ กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (emulsification activity) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ ความเข้มข้นกลูโคส 3 % (w/v) ความเข้มข้น NaNO_3 0.5% (w/v) และ pH เริ่มต้น เท่ากับ 6

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียคัดเลือก *Bacillus cereus* ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างน้ำทะเลจากบริเวณที่คัดแยกเชื้อได้ เติมน้ำมันดีเซล 2.0 % (v/v) และเติมกลูโคส 2.0 % (v/v) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ เมื่อครบเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน โดยวิธีการชั่งน้ำหนักน้ำมันดีเซลที่

หายไป (weight loss method) พบว่าชุดตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเท่ากับ 40.46% ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเท่ากับ 0.61% เมื่อนำชุดตัวอย่างทดสอบทางคุณภาพเพื่อยืนยันการย่อยสลายน้ำมันดีเซลหลังการเติมเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกเป็นเวลา 0 วัน และ 7 วัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatograph with mass spectrometry (GC-MS) พบว่าน้ำมันดีเซลที่ใช้ทดลองเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภท n-alkanes และสารประกอบเอสเทอร์ เมื่อพิจารณาจากผล peak area ในแต่ละ retention time (RT) พบว่า RT ที่มี peak area ลดลง ได้แก่ 7.21 ถึง 14.82 และ 18.78 ถึง 21.40 ซึ่งเป็นสารประกอบ alkanes ตั้งแต่ C₁₁-C₂₈ แสดงให้เห็นว่าเกิดกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (C₁₁-C₂₈) ส่วน RT ที่มี peak area เพิ่มขึ้น ได้แก่ 4.40 ถึง 5.82 ซึ่งเป็นสารประกอบ alkanes ชนิด C₉- C₁₀ และ RT 15.96 และ 17.39 ซึ่งเป็นสารประกอบเอสเทอร์ C₁₇H₃₄O₂ และ C₁₉H₃₆O₂ แสดงให้เห็นว่าเกิดกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นสารประกอบเอสเทอร์ และ n-alkanes โมเลกุลต่ำ (C₉- C₁₀)

5.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยเพิ่มเติม

5.2.1 ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำควรเพิ่มปริมาณน้ำและจุดเก็บตัวอย่างน้ำ เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียคัดแยกจำนวนมาก

5.2.2 ในการเทียบเคียงสายพันธุ์ของเชื้อควรเพิ่มการวิเคราะห์ 16s rDNA แบบ full length ประมาณ 1,500 bp หรืออาจใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ มาช่วย เช่น DNA-DNA hybridization

5.2.3 ศึกษาวิธีการสกัดและทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus cereus* และศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

5.2.4 ศึกษาวิธีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบสกัดมาทดสอบการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันดิบ น้ำมันเตา น้ำมันเครื่อง เป็นต้น และศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบสกัดที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันในระดับห้องปฏิบัติการ

5.2.5 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus cereus* ในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. 2544. *คู่มือการเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทะเล*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2545. *คู่มือการใช้สารเคมีขจัดคราบน้ำมัน*. กรุงเทพฯ: กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2553. *การคาดการณ์การเคลื่อนที่ของคราบน้ำมันในทะเล ผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติ และแนวทางจัดการแก้ไข*. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด กชกร พับลิชชิ่ง.
- กระทรวงพลังงาน. 2554. รายงานประจำปี 2554. http://www.energy.go.th/sites/all/file/annual_report_2011.pdf. (ค้นเมื่อ 24 สิงหาคม 2557)
- กุลนรี เพชรรงค์. 2550. การผลิตและการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus* SM7 ที่แยกได้จากทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จิรสา กรงกรด. 2548. สารลดแรงตึงผิว. http://www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/cp_7_2548_surfactant.pdf. (ค้นเมื่อ 16 กุมภาพันธ์ 2554)
- ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. 2533. *น้ำมัน*. กองวิเคราะห์ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม: สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ.
- ศุภฤทธิพรณ พงษ์สุวรรณ. 2553. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปส โดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นิรันดร์ วิชัยสกุล. 2544. การศึกษาปุ๋ยละลายน้ำมันในการกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำทะเล ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- พิสุทธิ เพ็ชรมนกุล และณัฐวิญญ์ ชวลีศพรศิยา. 2557. *น้ำมันรั่วไหล : ในอีกมุมที่ทุกคนควรรู้*. http://www.eng.chula.ac.th/sites/default/file/chula_engineering_oil_spill_article.pdf. (ค้นเมื่อ 7 พฤศจิกายน 2557)

- พิสุทธิ์ เพ็ชรมนกุล และปฎิภาณ ปัญญาพลกุล. 2556. ภาพรวมของสารเคมีที่มีการประยุกต์ใช้งานในภาชนะน้ำมันรั่วไหล (Oil spill) ลงสู่ทะเล. <http://www.eng.chula.ac.th/en/node/843>. (ค้นเมื่อ 6 สิงหาคม 2556).
- อรกมล ฤคดี. 2555. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม สภาวะที่เหมาะสมและคุณลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อินทิยา แฉมพยัคฆ์. 2550. การตรวจสอบลักษณะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดิน. วิทยานิพนธ์ดุขยภูิบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1): 143-151.
- Aparna, A., Srinikethan, G. and Hegde, S. 2012. Isolation, screening and production of biosurfactant by *Bacillus clausii* 5B. *Research in Biotechnology*, 3(2): 49-56.
- Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura, G. 1968. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 31(3): 488-494.
- Banat, I., Samarah, N., Murad, M., Horne, R. and Banerjee, S. 1991. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(1): 80-88.
- Besson, F. and Michel, G. 1992. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: Evidence for amino acid activating enzymes. *Biotechnology letters*, 14(11): 1013-1018.
- Bodour, A. A. and Miller-Maier, R. M. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3): 273-280.
- Borah, D. and Yadav, R. 2014. Biodegradation of Diesel, Crude Oil, Kerosene and Used Engine Oil by a Newly Isolated *Bacillus cereus* Strain DRDU1 from an Automobile Engine in Liquid Culture. *Int. J. Environ. Res*, 8(4): 1287-1294.
- Brown, J. H. 1939. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 29(4): 404-405.

- Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4): 846-850.
- Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2): 224-229.
- Cunha, C., Do Rosario, M., Rosado, A. and Leite, S. 2004. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry*, 39(12): 2277-2282.
- Das, N. and Chandran, P. 2010. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, Volume 2011. doi:10.4061/2011/941810
- Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1): 47-64.
- Dhail, S. and Jasuja, N. D. 2012. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 6(6): 263-266.
- Fiechter, A. 1992. Integrated systems for biosurfactant synthesis. *Pure and Applied Chemistry*, 64(11): 1739-1743.
- Geyer, R. 1980. Marine environmental pollution, 1st edition. *Elsevier scientific publishing*.
- Ghribi, D. and Ellouze-Chaabouni, S. 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology research international*, Volume 2011. doi:4061/2011/653654
- Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M., Infante, M. R. and Manresa, A. 2003. Physico-chemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and bioengineering*, 81(3): 316-322.
- Haigh, S. D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Science of the Total Environment*, 185(1): 161-170.
- Healy, M., Devine, C. and Murphy, R. 1996. Microbial production of biosurfactants. *Resources, conservation and recycling*, 18(1): 41-57.

- ITOPF. 2014. Fate of marine oil spills. <http://www.itopf.com.knowledge-resources/document-guides/document/tip-2-fate-of-marine-oil-spills/>, (Retrieved April 17, 2014)
- Iwabuchi, N., Sunairi, M., Urai, M., Itoh, C., Anzai, H., Nakajima, M. and Harayama, S. 2002. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5): 2337-2343.
- Jaysree, R., Basu, S., Singh, P. P., Ghosal, T., Patra, P. A., Keerthi, Y. and Rajendran, N. 2011. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples. *Pharmacologyonline Newsletter*, 3: 1427-1433.
- Joshi, S., Bharucha, C. and Desai, A. J. 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource technology*, 99(11): 4603-4608.
- Kawamura, S. 2000. *Integrated design and operation of water treatment facilities*: John Wiley & Sons, New York, pp. 326.
- Khopade, A., Ren, B., Liu, X.-Y., Mahadik, K., Zhang, L. and Kokare, C. 2012. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *Journal of colloid and interface science*, 367(1): 311-318.
- Kim, H.-S., Yoon, B.-D., Lee, C.-H., Suh, H.-H., Oh, H.-M., Katsuragi, T. and Tani, Y. 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of fermentation and bioengineering*, 84(1): 41-46.
- Kitamoto, D., Ikegami, T., Suzuki, G. T., Sasaki, A., Takeyama, Y.-i., Idemoto, Y. and Yanagishita, H. 2001. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosyl erythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnology letters*, 23(20): 1709-1714.
- Lai, C.C., Huang, Y.C., Wei, Y.H. and Chang, J.S. 2009. Biosurfactant enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1): 609-614.
- Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1): 12-20.
- Loncar, E. S., Petrovic, S., Malbaca, R. and Verac, R. 2000. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Food/Nahrung*, 44(2): 138-139.

- Lotfabad, T. B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., Adelzadeh, M. R. and Noghabi, K. A. 2009. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69(2): 183-193.
- Maneerat, S. and Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J Sci Technol*, 29(3): 781-791.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of bacteriology*, 175(20): 6459-6466.
- Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2): 183-198.
- Najafi, A., Rahimpour, M., Jahanmiri, A., Roostaazad, R., Arabian, D. and Ghobadi, Z. 2010. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 163(3): 188-194.
- Nasr, S., Soudi, M. and Mehrnia, M. 2009. Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus* spp. isolated from petroleum contaminated soil. *Iranian Journal of Microbiology*, 1(2): 54-61.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. and Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3): 548-572.
- Parker, C., Freegarde, M. and Hatchard, C. 1970. The effect of some chemical and biological factors on the degradation of crude oil at sea: *Water Pollution by Oil*, 233-244.
- Pornsunthorntawee, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M. and Rujiravanit, R. 2008. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource technology*, 99(6): 1589-1595.
- Praveesh, B., Soniyamby, A., Mariappan, C., Kavithakumari, P., Palaniswamy, M. and Lalitha, S. 2011. Biosurfactant Production by *Pseudomonas* sp. from Soil Using Whey as Carbon Source. *New York Science Journal*, 4(4): 99-103.

- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., van der Mei, H. C. and Oliveira, R. 2006. Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(1): 105-112.
- Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnol. Lett.* 11: 871-874.
- Ron, E. Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental microbiology*, 3(4): 229-236.
- Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. and Gutnick, D. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(3): 402-408.
- Safary, A., Ardakani, M. R., Suraki, A. A., Khiavi, M. A. and Motamedi, H. 2010. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Caspian Sea. *Biotechnology*, 9(3): 378-382.
- Shirai, K., Hanzawa, N. and Katsuta, M. 1995. Heavy-oil-degrading bacteria isolated by long-term enrichment in alumina columns containing heavy oil C. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(11): 2159-2161.
- Sudo, K., Ema, H., Morita, Y. and Nakauchi, H. 2000. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 192(9): 1273-1280.
- Thanomsub, B., Pumeechockchai, W., Limtrakul, A., Arunrattiyakorn, P., Petchleelaha, W., Nitoda, T. and Kanzaki, H. 2007. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. *Bioresource technology*, 98(5): 1149-1153.
- Tugrul, T. and Cansunar, E. 2005. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7): 851-853.
- Tuleva, B., Christova, N., Cohen, R., Antonova, D., Todorov, T. and Stoineva, I. 2009. Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56. *Process Biochemistry*, 44(2): 135-141.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7): 1163-1172.

- Vollenbroich, D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R. M. and Pauli, G. 1997. Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25(3): 289-297.
- Walter, V., Syldatk, C. and Hausmann, R. 2010. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Biosurfactants Springer*, 1-13.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 12(3): 237-241.
- Wu, J.-Y., Yeh, K.-L., Lu, W.-B., Lin, C.-L. and Chang, J.-S. 2008. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource technology*, 99(5): 1157-1164.
- Wu, Y., Lai, Q., Zhou, Z., Qiao, N., Liu, C. and Shao, Z. 2009. *Alcanivorax hongdengensis* sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(6): 1474-1479.
- Yin, H., Qiang, J., Jia, Y., Ye, J., Peng, H., Qin, H. and He, B. 2009. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry*, 44(3): 302-308.
- Youssef, N. H., Duncan, 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 microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3): 339-347.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Mineral salts medium (MSM) (Thavasi *et al.*, 2010)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.001	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
NH_4SO_4	0.5	กรัม
NaCl	30.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วและอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 15 นาที ส่วนในขั้นตอนทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าช่วงชั้นปัจจัยศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน ทำการเติมแหล่งไนโตรเจนตามชนิดที่ศึกษาแทน NH_4SO_4

2. Nutrient agar

Glucose	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Peptone	2.0	กรัม
Agar	16.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วและอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 15 นาที

3. Plate count agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปมาเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วและอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 15 นาที

4. วิธีทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

4.1 ความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility) นำเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเย็บเชื้อและแทงลงในหลอดอาหาร motility test บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน ถ้าเชื้อกระจายจากแนวที่แทงเชื้อไว้ แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการเคลื่อนที่

4.2 การทดสอบแคตาเลส (catalase test) ทำการทดสอบโดยหยด H_2O_2 3 % จำนวน 1 หยด ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและแห้ง เย็บเชื้อที่จะทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง ลงไป 1 ลูปผสม หากเกิดฟองแก๊สขึ้นทันทีแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

4.3 การทดสอบลิซิทีเนส (lecithinase test) โดยสังเกตการเจริญบนอาหาร egg yolk agar หลังจากบ่มเชื้อ 1-2 วัน ถ้ามีบริเวณขุ่นที่บอบๆ โคลโลนิ แสดงว่ามีการสร้างสาร lecithinase ให้ผลทดสอบเป็นบวก

4.4 การทดสอบการหมักย้อยน้ำตาลแมนนิทอล (ferment mannitol) โดยเย็บเชื้อทดสอบลงในอาหาร basal medium ที่มีน้ำตาลแมนนิทอลเป็นเวลา 2 วัน สังเกตการเกิดกรดจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

4.5 ทดสอบความสามารถการย่อยสลายเม็ดเลือด (hemolysis) เลี้ยงเชื้อโดย streak บนอาหาร blood agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตรอบๆ โคลโลนิของเชื้อ หากเกิดวงใสขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยสลายเม็ดเลือด ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

5. วิธีการทดสอบทางอณูวิทยา โดยทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วย Genomic DNA mini kit, Taiwan) แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ 2 primer คือ 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3') และ 1500 R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3') โดยตั้งโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

Innital denaturation	94 °C	3 นาที	
Denature	94 °C	1 นาที	25 รอบ
Annealing	50 °C	1 นาที	
Extension	72 °C	2 นาที	
Final extension	72 °C	3 นาที	

แล้วทำการวิเคราะห์ผลและทำบริสุทธิ์ด้วย GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับขั้นตอนต่อไป ใช้ ABI Prism® 3730XL DNA Sequence (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบผลลำดับเบสจากยีน 16S rDNA ใช้โปรแกรม BLASTN คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเปรียบเทียบกัน

ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์

1. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียคัดเลือก

เอกสารแนบ / Attached document 2			
ลำดับนิวคลีโอไทด์ / Nucleotide sequence(s)			
ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Sample No.	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide region of	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3') Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	S2	16S rDNA	>S2 AGGATGAACGGTGGCCGCTCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAATGGATTAAAGACTTGGCTTATGAACT TAGCCGGGACGGGTGAGTAAACACGTGGTTACCTGCCATTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT AATACCGGATAGNATTTTGAACNGCATGGTTCCGAAATGAAAGGCGCGCTTCGGCTGTCACTTATGATGGAC CCGCTCGCATAGCTAGTTGGTGAAGTACGGCTCACCAGGCAACGATCGCTAGCCGACTGAGAGGGTG ATCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAAGCTAGTGGGAATCTTCGCGCATCG ACGAAGTCTGACGGAGCAAGCCGCGTCACTGATGAGGGTTTCGCGTCGTAAGACTCTGTTGTTAGCGAA GACAACTGCTAGTTGAATAAGCTGGCCTTCAAGGTAACCTAACCGGAAAGCCACGACTAAGTACTGTCGCA GCAGCCGGTATGACTAGGTGGCAAGCGTTATCCGAAATTAATGGGCTAAAGGCGCCGCGAGTGGTTTC TTAACTCTGATGTGAAAGCCACGCTCAACCGTGGAGGCTCATTCGAAACTGGGAGACTTCAGTCCGAGAG AGGAACTGGAAATCCCATGGTGAAGCGTGAAGGCTAGAGATATGGAAGAACACCACTGGCGAAGGAGACT TTCCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCTGAAAGGCTAGAGATATGGAAGAACACCACTGGCGAAGGAGACT GCGCTAAAGGATGAGTGTGATGTTAGAGGGTTTCGGCCCTTAGTGTGAGTTAACCCATTAAAGCACTC CCGCTGGGATAGCGCCGCAAGGCTGAACTCAAGGAATGACGGGGCCCGGCAAGCGGTGGAGCATG TCGTTTAAATCGAAGCAAGCGGAGAACCTTACCAAGGCTCTTGACATCCCTGACAAACCTAGAGATAGGGCT TCTCCTTCGGGAGCAGAGTGAAGGCTGGTGGATGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG CCGCAACAGCGCAACCTTGAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG AAGCGGAGGAGGTTGGGATGACGTCAATCATCATGCGCTTATGACCTGGGCTACACAGCTGCGCATGAT GGACGGTACAAAGAGTGCAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAACCGTTCCTCAATGCGATGATGATG GCTGCAACTCGCTACATGAGGTGGAATCGCTAGTAATCGGGATCGCATGCGCGGTGAATAGCTTCCG GGGCTTGTACACACCGCCGCTGAC

ภาพที่ ข-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ /Nucleotide sequence (s) แบคทีเรียคัดเลือก S2

Strain: S2

Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt
1	<i>Bacillus anthracis</i>	ATCC 14578(T)	Cohn 1872	AB190217	100.00	0/1303
2	<i>Bacillus anthracis</i>	Ames	Cohn 1872	AED16879	99.93	1/1391
3	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579(T)	Frankland and Frankland 1887	AED16877	99.86	2/1391
4	<i>Bacillus toyonensis</i>	BCT-7112(T)	Jiménez et al. 2014	CP006863	99.64	5/1391
5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792(T)	Berliner 1915	ACNFF01000156	99.64	5/1391
6	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	DSM 12442(T)	Nakamura 1998	ACNXX01000133	99.57	6/1391
7	<i>Bacillus mycoides</i>	DSM 2048(T)	Flügge 1886	ACMU01000002	99.50	7/1391
8	<i>Bacillus bingmayongensis</i> (Invalid name)	FJAT-13831(T)	Uu et al. 2013	JN885201	99.48	7/1355
9	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	WSBC 10204(T)	Lechner et al. 1998	Z84578	99.41	8/1367
10	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	KBA84	Lechner et al. 1998	CP000903	99.35	9/1391
11	<i>Bacillus goeakensis</i> (Invalid name)	BL3-6 KCTC 13318(T)	Jung et al. 2010	FJ416489	99.01	13/1310
12	<i>Bacillus maniponensis</i> (Invalid name)	BL4-6(T)	Jung et al. 2011	FJ416490	98.07	26/1345
13	<i>Bacillus cytotoxicus</i>	NVH 391-98(T)	Guinebretière et al. 2013	CP000764	97.99	28/1391
14	<i>Bacillus marisflavi</i>	TF-11(T)	Yoon et al. 2003	AF483624	95.53	62/1387

ภาพที่ ข-2 ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์แบคทีเรียคัดเลือก S2

ภาคผนวก ค
ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ

เมื่อใช้เทคนิค response surface methodology (RSM) ที่มีการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง ดังแสดงในตาราง ค-1

ตารางที่ ค-1 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

Std Order	Run Order	Pt Type	Blocks	X1	X2	X3
13	1	0	1	0	0	0
16	2	0	1	0	0	0
2	3	2	1	1	-1	0
14	4	0	1	0	0	0
7	5	2	1	-1	0	1
8	6	2	1	1	0	1
6	7	2	1	1	0	-1
10	8	2	1	0	1	-1
4	9	2	1	1	1	0
9	10	2	1	0	-1	-1
12	11	2	1	0	1	1
5	12	2	1	-1	0	-1
11	13	2	1	0	-1	1
17	14	0	1	0	0	0
1	15	2	1	-1	-1	0
3	16	2	1	-1	1	0
15	17	0	1	0	0	0

การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติแบ่งออกเป็น 6 ส่วน คือ การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การสร้างสมการทำนายกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน การสร้างพื้นผิวตอบสนองของกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน และการหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

เป็นการตรวจสอบข้อมูลที่ได้จากการทดลองก่อนนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองต้องเป็นไปตามสมมติฐาน 3 ข้อ คือ (1) ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ (3) ค่าความแปรปรวนมีเสถียรภาพ ถ้าหากค่าส่วนตกค้างเป็นไปตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ จะถือว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน

2) การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination)

เป็นการวิเคราะห์ว่าการออกแบบที่ใช้การทดลองมีความเหมาะสมหรือไม่ ซึ่งในการทดลองทุกครั้งจะต้องมีความผันแปรที่อธิบายไม่ได้หรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ การออกแบบการทดลองที่ดีจะต้องทำให้เกิดความผันแปรที่อธิบายไม่ได้ให้น้อยที่สุด โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) สามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ} = \frac{\text{ความผันแปรที่อธิบายได้}}{\text{ความผันแปรทั้งหมด}}$$

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ยิ่งมีค่าใกล้ 1.00 มากเท่าใด แสดงว่าสามารถอธิบายค่าของตัวแปรตามได้ดี เนื่องจากตัวแปรต้นกับตัวแปรตามมีความสัมพันธ์กันมาก แต่ถ้ามีค่าใกล้ 0 แสดงว่าสมการถดถอยสามารถอธิบายค่าของตัวแปรตามได้ไม่ดี หรือกล่าวโดยสรุปได้ว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันน้อย

3) การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลอง โดยพิจารณาจากค่า P-value ของเทอมต่างๆ ในตารางของการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ได้เปรียบเทียบกับค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด

4) การสร้างสมการทำนายกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน

การสร้างสมการทำนายกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน โดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันมาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการ

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_1X_2 + A_5X_2X_3 + A_6X_1X_3 + A_7X_1^2 + A_8X_2^2 + A_9X_3^2$$

Y = ค่าตอบสนองที่เกิดจากการแปรค่าตัวแปร

A_0 = ค่าคงที่

A_n = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

X_n = ตัวแปรอิสระ

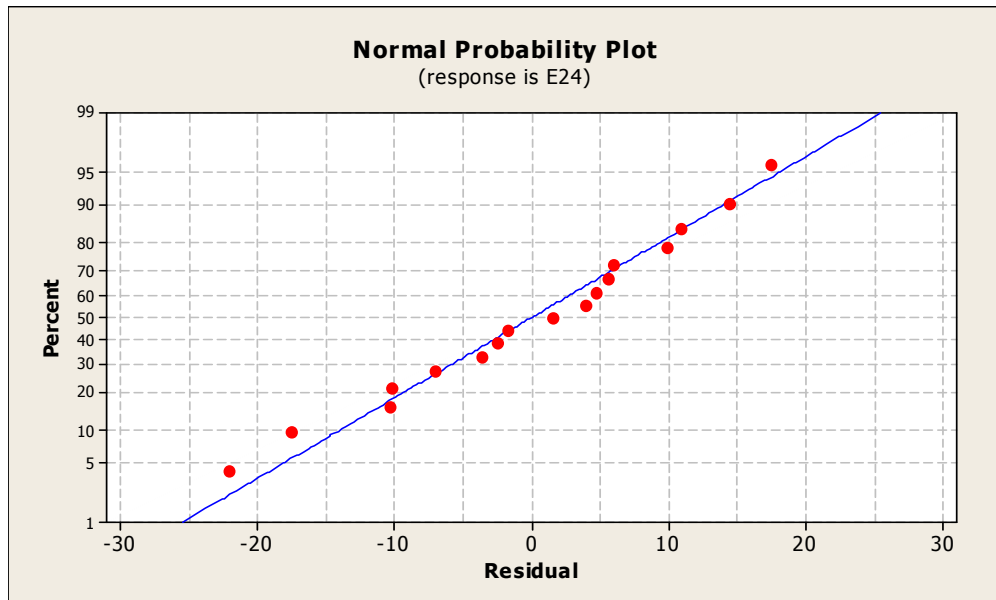
5) การสร้างพื้นผิวตอบสนองของกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันเทียบกับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง คือ ความเข้มข้นกลูโคส ความเข้มข้น NaNO_3 และ pH เริ่มต้น โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

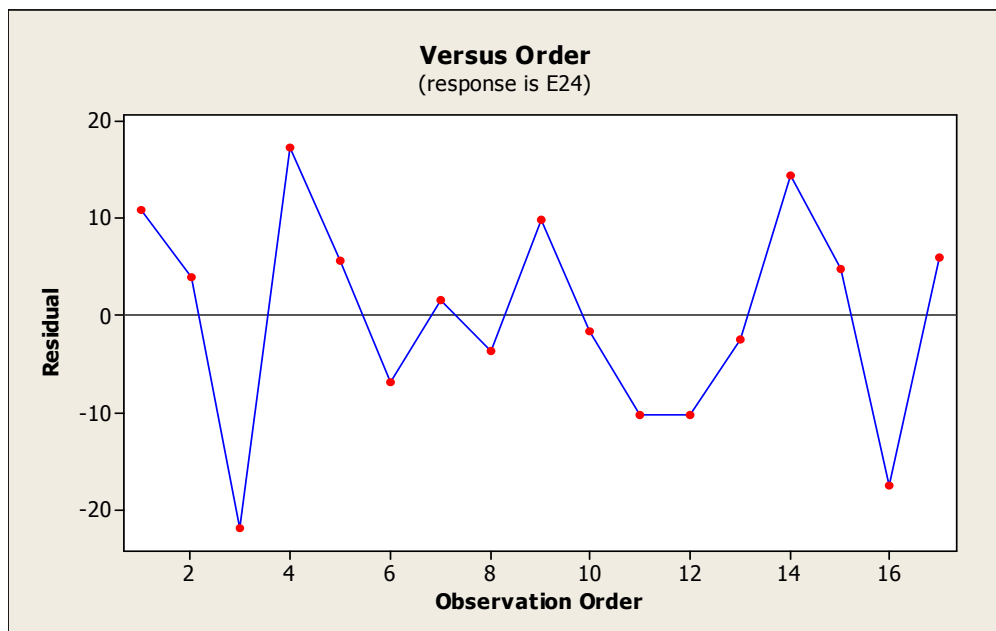
6) การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้กิจกรรมการเกิดอิมัลชันมากที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer ซึ่งเป็นฟังก์ชันที่ใช้หาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยและใช้วัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบ (composite desirability: D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ถ้า D มีค่าเท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์ แต่ถ้า D มีค่าเท่ากับ 0 หมายถึงผลตอบตัวใดตัวหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งตัวอยู่นอกขอบของขีดจำกัดการยอมรับ

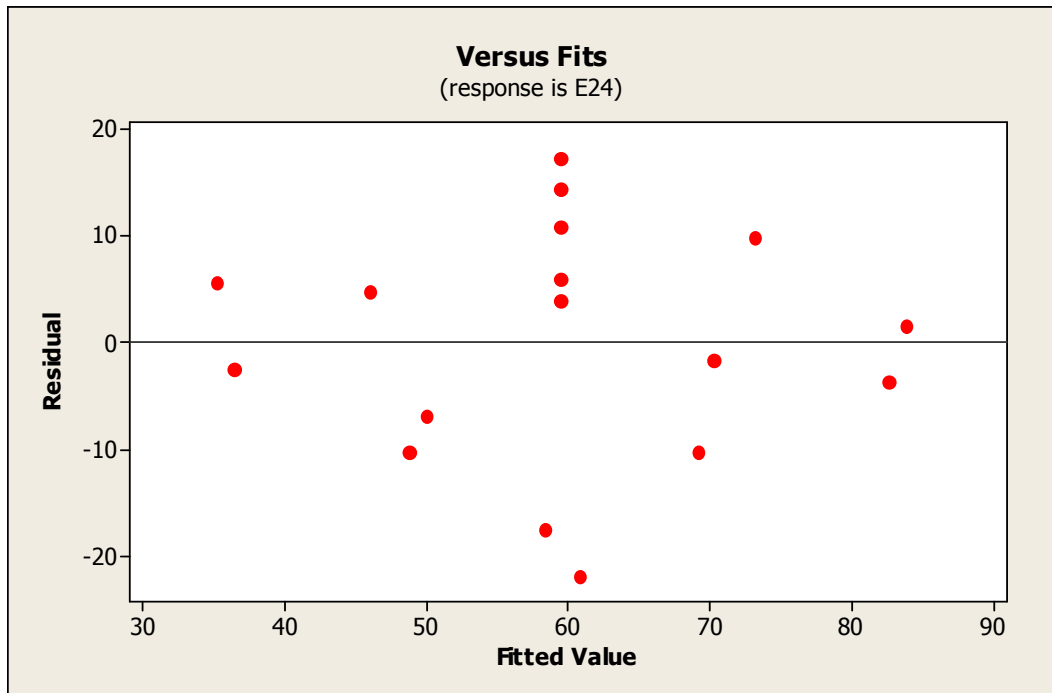
2. ผลการวิเคราะห์หาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด



ภาพที่ ค-1 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง



ภาพที่ ค-2 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูล



ภาพที่ ค-3 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละดับของปัจจัย

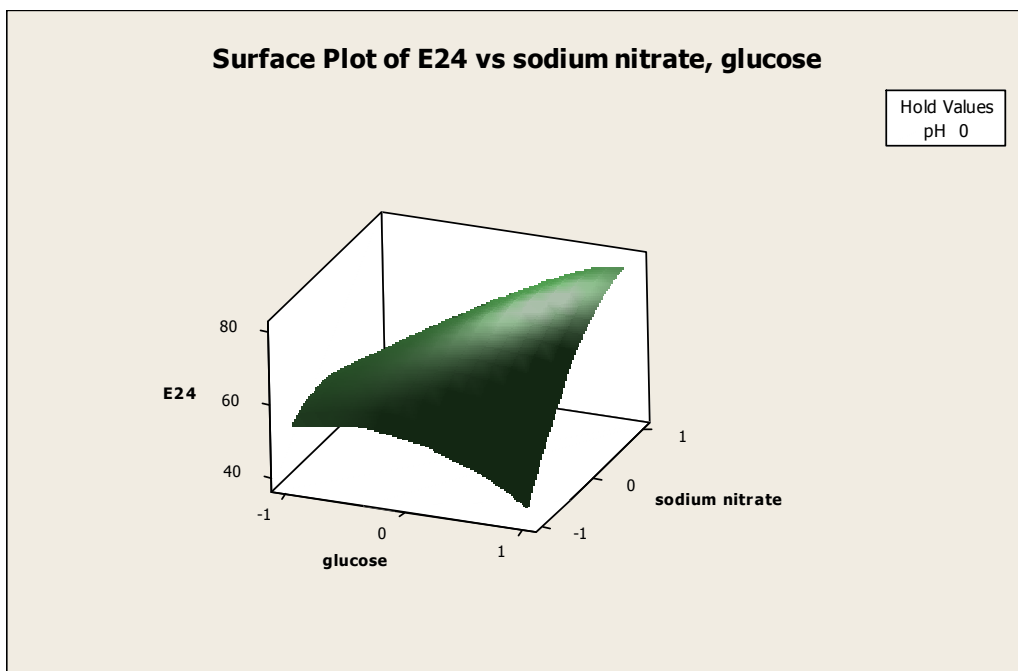
ตารางที่ ก-2 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนอง

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	70.062	2.396	29.238	0.000
Glucose	7.366	1.894	3.888	0.006
Sodium nitrate	6.199	1.894	3.272	0.014
pH	-16.977	1.894	-8.962	0.000
glucose*glucose	-7.405	2.611	-2.836	0.025
sodium nitrate* sodium nitrate	-9.380	2.611	-3.592	0.009
pH*pH	-5.697	2.611	-2.182	0.065
glucose*sodium nitrate	13.562	2.679	5.062	0.001
glucose*pH	-6.135	2.679	-2.290	0.056
sodium nitrae*pH	-1.455	2.679	-0.543	0.604

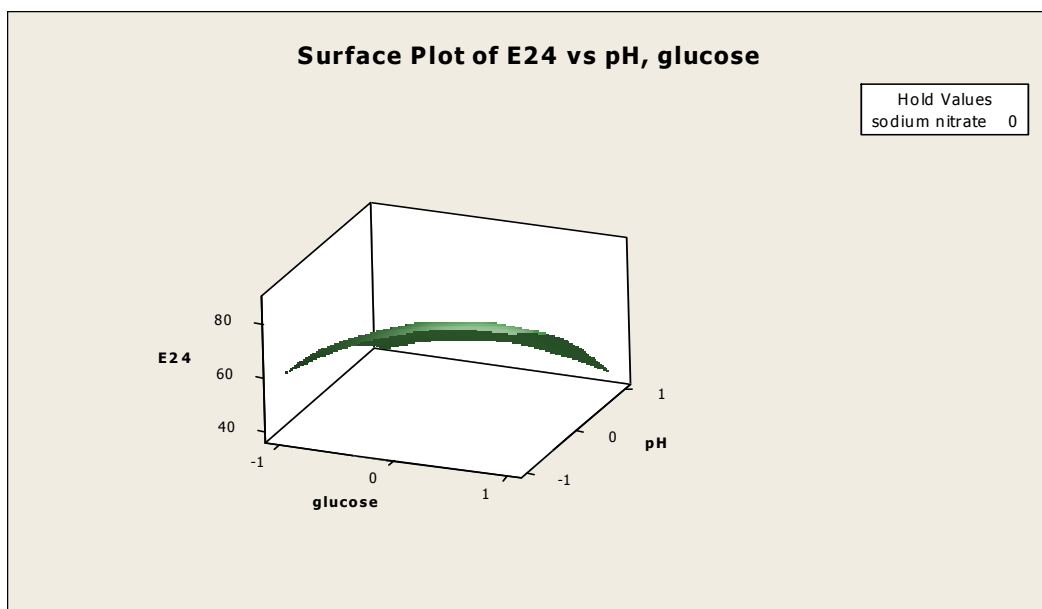
S = 5.35823, R-Sq = 95.95%, R-Sq(Adj) = 90.74%

ตารางที่ ก-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน

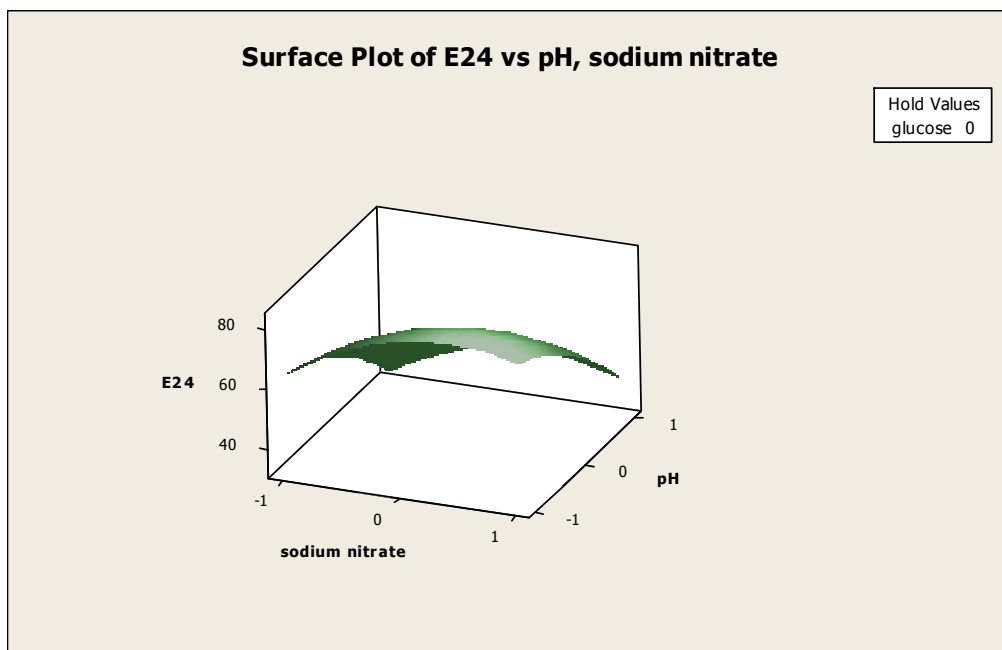
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	4762.16	4762.16	529.13	18.43	0.000
Linear	3	3047.37	3047.37	1015.79	35.38	0.000
Square	3	820.00	820.00	273.33	9.52	0.007
Interaction	3	894.79	894.79	298.26	10.39	0.006
Residual Error	7	200.97	200.97	28.71		
Lack-of-Fit	3	74.00	74.00	24.67	0.78	0.565
Pure Error	4	126.97	126.97	31.74		
Total	16	4963.13				



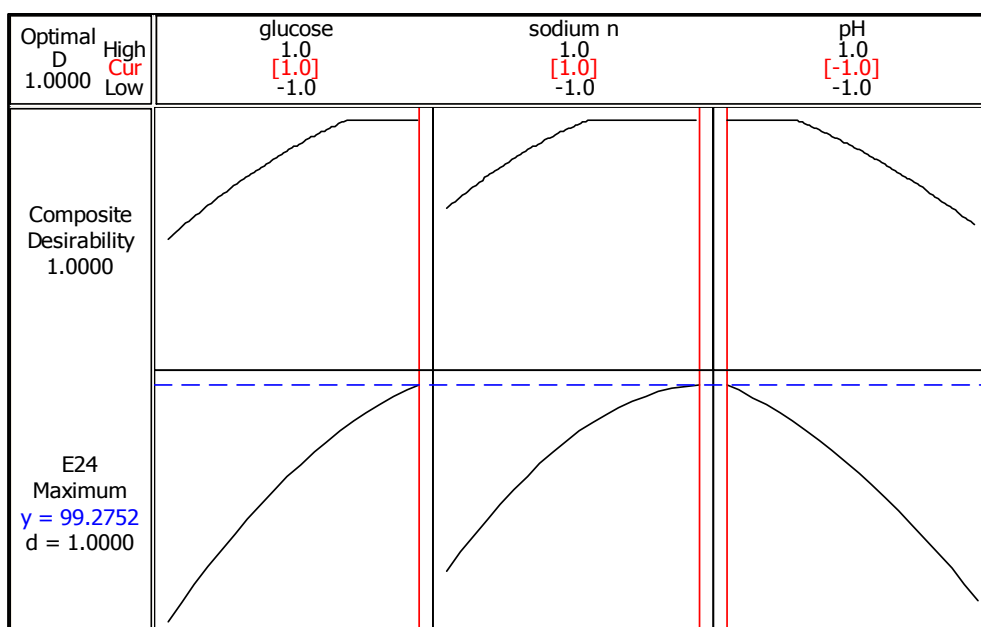
ภาพที่ ค-4 พื้นผิวผลตอบสนองของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและความเข้มข้น NaNO_3



ภาพที่ ค-5 พื้นผิวผลตอบสนองของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและpH เริ่มต้น



ภาพที่ ค-6 พื้นผิวผลตอบสนองของกิจกรรมการเกิดอิมัลชันระหว่างความเข้มข้น NaNO_3 และ pH เริ่มต้น



ภาพที่ ค-7 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยเพื่อให้ได้กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวศัลยา มานะกล้า
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5310920050
 วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	2547

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ศัลยา มานะกล้า ธีรวิทย์ เตชะภักทวรกุล และอรมาศ สุทธิสุนัน. 2557. การคัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนน้ำมัน เพื่อประยุกต์ใช้บำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาระดับชาติ 2014: 55 ปี มจพ. ก้าวไกลสู่สากล. 29 สิงหาคม 2557.