สำนักหอสมุด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ๒๕๔๗

รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การผลิต Biosurfactant จากเชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน
BIOSURFACTANT PRODUCTION BY ISOLATED ACTINOMYCETES FROM SOIL CONTAMINATED HYDROCARBON

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2544
จำนวน 168,800.00 บาท

หัวหน้าโครงการ ฐปน ซื่นบาล
ผู้ร่วมโครงการ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง
ภาณรินทร์ ปรีชาวัฒนากร

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
วันที่ 24/06/2547

1373/47

กิตติกรรมประกาศ

โครงการ " การผลิต Biosurfactant จาก เชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารไฮโครคาร์บอน" ได้รับการจัดสรรงบประมาณการวิจัยในปี 2544 จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ งานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานสำหรับการจัดการสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นปัญหาที่มากขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต

คณะผู้ทำงานวิจัยหวังว่า งานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางการพัฒนาศักยภาพของเชื้อ Actinomycetes ที่คัดแยกได้ในท้องถิ่น เพื่อผลดีต่อสิ่งแวดล้อมของประเทศต่อไป

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2547

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	8
วันเวลาและสถานที่ทำการวิจัย	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
อุปกรณ์ทำการวิจัย	9
วิธีการวิจัย	10
ผลการทดลองและวิจารณ์	12
สรุปผลการทดลอง	25
งานวิจัยขั้นต่อไป	26
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	29

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ชนิดของ biosurfactant จุลินทรีย์ที่ผลิต แหล่งของคาร์บอนที่ใช้ และค่าแรงตึงผิว	7
2 แหล่งตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลตที่แยกได้	13
3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของเชื้อแอคติโนมัยซีส จำนวน 20 ไอโซเลต ที่ทดสอบด้วยวิธี xylene emulsification assay	15
4 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการผลิต biosurfactant ใน อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 4 ชนิด	16

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 วงใส (clear zone) ที่เกิดจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแอคติโนมัยซีสบน blood agar	14
2 ค่าแรงตึงผิว(mN/m)ของไอโซเลต BS_1A_{67} เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	18
3 ค่าแรงตึงผิว (mN/m) ของไอโซเลต BS_1A_{69} เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	18
4 ค่าแรงตึงผิว (mN/m) ของไอโซเลต BS_3A_2 เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	19
5 ค่าแรงตึงผิว(mN/m)ของไอโซเลต BS_4A_3เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	19
6 ค่าแรงตึงผิว(mN/m)ของไอโซเลต $BS_{13}A_5$ เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	20
7 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ของไอโซเลต BS_1A_{67} เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	20
8 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ของไอโซเลต BS_1A_{69} เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	21
9 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ของไอโซเลต BS_3A_2 เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	21
10 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ของไอโซเลต BS_4A_3 เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	22
11 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ไอโซเลต $BS_{13}A_5$ เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน	22
12 ลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิต biosurfactant (1000X)	23
13 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิต biosurfactant ที่เจริญบนอาหาร YMA	24

การผลิต Biosurfactant จากเชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY ISOLATED ACTINOMYCETES FROM SOIL CONTAMINATED HYDROCARBON

ฐปน ชื่นบาล ศรีกาญจนา คล้ายเรือง และ ภาณรินทร์ ปรีชาวัฒนากร

Tapana Cheunbarn Srikanjana Kluyruang and Panarin Prechawattanakorn

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างดิน 14 แหล่งตัวอย่าง ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสได้จำนวน 163 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิต biosurfactant เบื้องต้น โดยดูจากคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่ามี 20 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัตินี้ จึงนำเชื้อดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหาร mineral salt medium ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ กลูโคส กลีเซอรอล และ hexadecane หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบการทำให้เกิด emulsion โดยวิธี xylene emulsification assay ซึ่งเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สามารถใช้ในการคัดเลือกเชื้อที่ผลิต biosurfactant จากขั้นตอนนี้มีเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิด emulsion คือ BS_1A_{67} BS_1A_{69} และ BS_4A_3 เมื่อใช้ กลูโคส และ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน BS_3A_2 จะเกิดได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $BS_{13}A_5$ จะเกิดได้ดีในอาหารที่มี กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าแรงตึงผิว พบว่า เชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารลงได้ แต่จะให้ผลดีที่สุดกับการใช้ hexadecane โดย BS_1A_{67} ลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด จากการจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลต BS_1A_{67} ดังกล่าว พบว่าอยู่ในจีนัส *Streptomyces* เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิต biosurfactant โดยใช้ hexadecane สามารถสรุปได้ว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต จะมีการปลดปล่อย biosurfactant ได้ดี ในการเจริญระยะ stationary phase เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางอย่างคือ โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และฟอสฟอรัส พบว่า BS_3A_2 และ $BS_{13}A_5$ ผลิต biosurfactant ที่ประกอบด้วย โปรตีน และน้ำตาล ในขณะที่ BS_1A_{67} BS_1A_{69} และ BS_4A_3 ประกอบด้วย โปรตีน น้ำตาล และฟอสฟอรัส

Abstract

This study was conducted to isolate actinomycetes from fourteen soil samples in Chiang Mai and Lampun provinces. The results showed that one hundred and sixty three actinomycetes were obtained from soil samples. Blood haemolysis was used as an initial selection criterion for the primary isolation of surfactant-producing actinomycetes. Which twenty actinomycetes isolates show this characteristic. After that twenty haemolytic isolates were cultured in mineral salt medium containing three different carbon sources (glucose, glycerol, and hexadecane) and their screened for biosurfactant production by xylene emulsification assay. The results demonstrate that three isolates (BS_1A_{67}, BS_1A_{69}, and BS_4A_3) had a high emulsification activity in glucose, while BS_3A_2 had a high emulsification in glucose and $BS_{13}A_5$ had a high emulsification in glycerol. All five isolates can reduce the surface tension of mineral salt medium but they gave the best result in medium containing hexadecane. All three isolates had a high emulsification activity and were also good at reducing surface tension. BS_1A_{67} gave the highest result in reducing surface tension and identified as *Strepomyces*. When studying the relationship between growth and biomass production, using hexadecane and oil as carbon sources, all five isolates released biosurfactant well during stationaty phase. BS_3A_2 and $BS_{13}A_5$ produced biosurfactant composing of protein and sugar while BS_1A_{67}, BS_1A_{69} and BS_4A_3 produced biosurfactant composing of protein, sugar and phosphorus, when analyzed the chemical components of culture broth.

คำนำ

ปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมัน ได้แก่ ของเสียจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และพวก น้ำมันหล่อลื่น สารทำความเย็นของเครื่องจักร เป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญและควรได้รับการแก้ไข น้ำมันจัดเป็นของเสียอันตรายประเภทหนึ่งจากการแบ่งประเภทของเสียอันตรายโดยสำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ น้ำมันปิโตรเลียมประกอบด้วยสารเคมีต่าง ๆ หลายชนิด แต่องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งคุณสมบัติของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่สำคัญ คือ สารประกอบที่มีค่าการละลาย (solubility) ที่สูงกว่าจะถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้เร็วกว่าและมีสารตกค้างน้อยกว่า ดังนั้นสารประกอบ mono-aromatic เช่น benzene toluene ethylbenzene และ xylene (สารประกอบ BTEX) จะถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้เร็วกว่าสารประกอบที่มี two-ring ขึ้นไป เช่น naphthalene ดังนั้นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภท poly-aromatic (PAH) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของน้ำมันปิโตรเลียม และมีคุณสมบัติเป็น non-polar hydrophobic molecules ที่มีค่าการละลายต่ำมาก เมื่อสารประกอบนี้ปนเปื้อนสู่ดิน สาร PAH จะดูดซับกับดินที่มีสารอินทรีย์สูงได้ดี เนื่องจากดินประเภทนี้จะมีค่า octanol/water partition coefficient (K_{ow}) สูง ซึ่งจะทำให้สาร PAH จะมีค่าความเข้มข้นในดินมากกว่าในน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถสะสมในปลาและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในน้ำ ซึ่งสาร PAH นี้เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และมีพิษต่อยีนในสิ่งมีชีวิต

เมื่อน้ำมันปนเปื้อนลงสู่ดิน จะเคลื่อนที่สู่ชั้น unsaturated zone ซึ่งประกอบด้วย 4 phase คือ 1) air 2) adsorbed 3) aqueous 4) liquid โดยน้ำมันจะปนเปื้อนอยู่ทั้ง 4 phase ในรูปแบบต่าง ๆ กัน คือ air phase น้ำมันจะอยู่ในรูปไอระเหย (vapor) ใน pore space ; adsorbed phase น้ำมันจะดูดซับอยู่บนผิวของอนุภาคดิน ; aqueous phase น้ำมันจะละลายอยู่ในน้ำ ; liquid phase น้ำมันจะอยู่ในรูป non aqueous phase liquids (NAPL) และเนื่องจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันมีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำจึงจัดอยู่ในประเภท light non aqueous phase liquids (LNAPLs) เมื่อสารประเภทนี้ปนเปื้อนลงสู่ดิน จะแพร่ในแนวดิ่งก่อน และการแพร่ในแนวนอนจะเกิดขึ้นเมื่อน้ำมันที่แพร่ในแนวดิ่งแพร่ถึงน้ำใต้ดิน น้ำมันจะแพร่บนผิวของน้ำใต้ดินและปรากฏการณ์ขึ้นลงของน้ำใต้ดินซึ่งขึ้นอยู่กับฤดูกาลจะทำให้มีการแพร่กระจายของน้ำมันไปสู่ชั้น subsurface และองค์ประกอบที่ละลายได้ก็จะละลายลงในน้ำแล้วเคลื่อนที่ไปกับน้ำใต้ดิน ส่วนองค์ประกอบที่เป็น heavy hydrocarbon เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าคลอรีน (chlorinated hydrocarbon) ก็จะจมลงไปเรื่อย ๆ จนกว่าจะถึงชั้นที่ไม่สามารถผ่านไปได้

จากเหตุผลที่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเมื่อมีการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมแล้วส่วนใหญ่จะดูดซับอยู่กับอนุภาคดิน และในสภาวะปกติการดึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากอนุภาคดินให้อยู่ในรูปสารละลายซึ่งสามารถย่อยสลายได้ด้วยขบวนการทางชีวภาพนั้นยากมาก ดังนั้นจึงมีการนำสาร surfactant มาช่วยในการดึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากสารที่ดูดซับ โดยมีแนวความคิดจากการใช้สาร surfactant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพขบวนการ oil recovery ในอุตสาหกรรมน้ำมัน ในขบวนการ oil recovery ระยะที่ 1 และ 2 ซึ่งใช้น้ำและความดันในขบวนการสามารถนำน้ำมันกลับได้เพียง 20 – 40 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น แต่เมื่อมีการใช้สาร surfactant ในระยะที่ 3 (enhanced oil recovery) จะสามารถนำน้ำมันกลับได้ 40 – 80 เปอร์เซ็นต์ และในการศึกษาประสิทธิภาพของสาร surfactant 22 ชนิด ในการเคลื่อนย้าย (mobilizing) น้ำมันดีเซลจากดินที่มีการปนเปื้อน ก่อนเข้าสู่ขบวนการ bioremediation พบว่าสาร ionic surfactant มีผลทำให้มีการเคลื่อนที่ (solubilization) น้ำมันดีเซลเป็นจำนวนมาก ในขณะที่สาร anionic surfactant จะทำให้เกิดประจุลบที่ผิวของหยดน้ำมันซึ่งจะถูกผลักออกจากอนุภาคดินซึ่งเป็นการเพิ่มการเคลื่อนที่ของน้ำมันเช่นเดียวกัน (Peter *et al*, 1992)

การใช้ surfactant ในขบวนการ soil remediation นั้นจะขึ้นอยู่กับ 2 กลไก คือ 1. การละลาย (solubilization) คือการทำให้สารไฮโดรคาร์บอนที่ดูดซับบนอนุภาคดิน บางส่วนกลายเป็นส่วน hydrophobic interior ของ surfactant micelles 2. การเคลื่อนที่ (mobilization) คือการทำให้สารไฮโดรคาร์บอนหลุดออกจากอนุภาคดิน ซึ่งประสิทธิภาพของขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของ surfactant ที่จะลดแรงตึงระหว่างผิว (IFT) และกลไกที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพในขบวนการ oil recovery คือ การเคลื่อนที่ ซึ่งสามารถนำหลักการนี้มาใช้ในการชะล้าง (washing) ดินที่มีการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic organic compounds) และมีค่าการละลายต่ำ ทำให้มีการเคลื่อนที่ได้ต่ำในสิ่งแวดล้อม Laha และคณะ (1991) ศึกษาผลของ nonionic surfactant 3 ชนิด ในการ desorb และย่อยสลาย [^{14} C] phenantherene ในถังปฏิกริยาที่ใส่น้ำและดิน และใส่น้ำเพียงอย่างเดียว พบว่าประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการ desorb สาร phenantherene จะเกิดขึ้นเมื่อ surfactant มีความเข้มข้นที่ CMC level แต่ที่ความเข้มข้นระดับนี้การย่อยสลายทางชีวภาพของสาร phenantherene จะถูกยับยั้ง ซึ่ง Laha และคณะ สรุปว่าการยับยั้งการย่อยสลายทางชีวภาพนี้มีสาเหตุจากปฏิกิริยาของ nonionic surfactant ต่อโปรตีนในเยื่อหุ้มเซล หรือผลของการแก่งแย่งระหว่าง surfactant กับ phenantherene เพื่อที่จะเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ และ Laha และคณะ (1992) ได้ทำการทดลองเพื่อหาสาเหตุที่แท้จริงของการยับยั้งการย่อยสลายของ phenantherene พบว่า

nonionic surfactant มีผลในการยับยั้งการย่อยสลายสาร phenantherene ซึ่งสาเหตุของการยับยั้งขบวนการย่อยสลายคาดว่าจุลินทรีย์สามารถใช้ surfactant เป็นแหล่งอาหารได้ง่ายกว่า phenantherene

นอกจากนี้ Aronstein และคณะ (1991) ทำการศึกษาโดยใช้สาร surfactant ที่มีค่าความเข้มข้นต่ำ (ต่ำกว่าระดับ CMC) เพื่อย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติดที่ดูดซับกับอนุภาคดิน ผลการศึกษาพบว่า biosurfactant ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในขบวนการย่อยสลายได้

Tsomides (1995) มีการขยายผลของ nonionic surfactant ที่มีต่อค่าการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดิน พบว่า สาร PAHs และสาร ประกอบ hydrophobic ชนิดอื่นๆ จะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นถ้าใช้ nonionic surfactant ที่มีความเข้มข้นมากกว่าระดับ CMC ถึงแม้ว่า nonionic surfactant ที่มีค่าสูงกว่าระดับ CMC จะมีผลในการยับยั้งขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของสาร PAH อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา nonionic surfactant 7 ชนิด พบว่า Triton X-100 เพียงชนิดเดียวที่ไม่ยับยั้งขบวนการย่อยสลาย phenantherene โดย phenantherene จะถูกดึงออกจากดิน 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 9 วัน และสามารถย่อยสลายได้ 50-60เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 12 วัน

จากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า synthetic surfactant สามารถเพิ่มค่าการละลายของสารประกอบที่ดูดซับกับอนุภาคดิน แต่ข้อเสียของการใช้สาร synthetic surfactant ก็มีหลายประการเช่น 1. ในกรณีที่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ดึงออกมาจาก solid phase สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สาร synthetic surfactant อาจมีผลกระทบต่อขบวนการย่อยสลาย 2. สาร synthetic surfactant อาจมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อม 3. ขบวนการผลิต synthetic surfactant บางชนิดเป็นแหล่งกำเนิดของมลพิษ เช่น ขบวนการผลิต sodium dodecylbenzene sulfonate (SDS) จะก่อให้เกิดสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อนและสารมลพิษบางชนิด ดังนั้นจึงมีการนำสาร biosurfactant ซึ่งเป็น extracellular metabolic products ของจุลินทรีย์ และมีจำนวนหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ สาร biosurfactant นั้นสามารถย่อยสลายได้ง่ายเมื่อใช้แล้วจึงไม่มีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อม

Biosurfactant คือ สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ซึ่งเป็นสารที่มี surface active สูง สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โมเลกุลประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ (hydrophilic) และส่วนที่ละลายน้ำไม่ได้ (hydrophobic) โดยส่วน

ใหญ่ส่วนของ hydrophobic จะประกอบไปด้วยสารพวกไฮโดรคาร์บอนที่มีรูปแบบทั้งแบบเส้นตรง (linear) และแบบแตกกิ่งก้านสาขา (Daytner, 1983) biosurfactant จัดว่าเป็นextracellular metabolic products ของจุลินทรีย์ ที่มีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เป็น lipid มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารของจุลินทรย์ ได้แก่ glycolipids lipopeptides phospholipid และ lipopolysaccharides (Georgiou และคณะ, 1992)

การผลิตสาร biosurfactant สามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และ รา ที่ล้วนมีความหลากหลายและมีอยู่มากมายในธรรมชาติ ซึ่งการนำคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ จะมีคุณค่าต่อการพัฒนาเศรษฐกิจ สังคม เกษตรกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมทางด้านการกำจัดมลพิษจากน้ำมัน ในแหล่งน้ำเสียซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ที่กำลังต้องการแก้ไขอย่างเร่งด่วน โดยเชื้อแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีผู้สนใจวิจัยอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Corynobacterium lepus* (Duvnjak และ Kosaric, 1980) , *Rhodococcus ruber* (Ivshina และคณะ, 1998) , *Serratia macescen* (Pruthi และ Cameotra, 1997) และ *Pseudomonas aeruginosa* (Venkata และคณะ, 1989)

Duvnjak และ Kosaric (1985) ศึกษาการผลิตสาร biosurfactant ของ *Corynobacterium lepus* ในอาหารที่มีกลูโคส และhexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสาร biosurfactant ที่เกิดขึ้นในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะติดอยู่กับเซลล์ ในขณะที่ใช้hexadecaneเป็นแหล่งคาร์บอน สาร surfactant จะถูกสร้างแล้วปล่อยออกจากเซลล์ ดังนั้นจึงได้ศึกษาการผลิตสาร biosurfactant ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้มีการ ปลดปล่อยสาร biosurfactant ที่ผลิตได้ออกจากเซลล์ โดยการเติม alkane ได้แก่ hexadecane , เตตระเดกเคน , เดกเคน และ ออกเทน ลงไปหลังจากที่เชื้อเจริญ ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าhexadecaneและเตตระเดกเคนมีผลช่วยให้ surfactant ถูกปลดปล่อยออกมา ส่วนเดกเคนและออกเทนมีผลน้อยมาก

สาร biosurfactant ส่วนใหญ่ประกอบด้วย lipids และแบ่งได้ 5 ประเภท คือ 1. glycolipids 2. lipopolysaccharides และ polysaccharide lipid 3. lipopeptides 4. phospholipids 5. fatty acids และ neutral lipids จากการศึกษาของ Georgiou และคณะ (1992) พบว่าสาร biosurfactant ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นพวก glycolipids lipopeptides และ fatty

acids และจุลินทรีย์ที่ผลิตส่วนใหญ่จะเป็นพวก *Rhodococcus sp. Nocardia sp. Bacillus sp.* และ *Pseudomonas sp.* (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดของ biosurfactant จุลินทรีย์ที่ผลิต แหล่งของคาร์บอนที่ใช้ และค่าแรงตึงผิว (Georgiou และคณะ, 1992)

biosurfactants	จุลินทรีย์	แหล่งของคาร์บอน	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
glycolipids	*Rhodococcus aurantiacus*	n - alkanes	26
glycolipids	*Torulopsis apicola*	alkane/carbohydrate	30
pentasaccharide lipid	*Nocardia corynebacteroides*	n - alkane	26
rhamnolipid	*Pseudomonos aeruginosa*	glucose	29
rubiwettins	*Serratia rubidaea*	glycerol	25.5 - 25.8
sophorolipids	*Torulopsis bombicola*	glucose/oleic acid	33
lipopeptides/aminolipids	*Bacillus licheniformis JF2*	glucose	27
lipopeptides	*Bacillus licheniformis 86*	glycerol	27
viscosin	*Pseudomonos fluorescens*	glycerol	26.5
serrawettin	*Serratia marcescens*	glycerol	28.8 - 33.9
surfactin	*Bacillus subtilis*	glycerol	27 - 32
fatty Acids/neutral lipids	*Corynebacterium lepus*	Kerosene/alkanes	< 30
fatty Acids + neutral lipids	*Nocardia erythropolis*	hexadecane	32
protein – carbohydrate complex	*Pseudomonos fluorescens 378*	sucrose	27
phosphatidylethanolamines	*Rhodococcus erythropolis*	n - alkane	30

การใช้สาร biosurfactant ในขบวนการ soil bioremediation สามารถเพิ่มการละลายและอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ Oberbremer คณะ (1990) พบว่าอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในระบบที่ประกอบด้วยดิน 10 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (tetradecane,petadecane,1,2,4-trimethylcyclohexane, pristane, phenyldecane และ naphthalene ผสมใน mineral salt medium) 1.35เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Falatko และ Novak (1992) พบว่า biosurfactant ที่ผลิตโดย mixed culture ของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบเร่งตะกอน (activated sludge)ที่นำมาเลี้ยงโดยใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน จะเพิ่มค่าการละลายของ toluene m-xylene 1,2,4-trimethylbenzene (TMB) และ naphthalene และยังเพิ่มอัตราการย่อยสลายของสารที่กล่าวมาแล้วด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า biosurfactant ที่ผลิตโดยใช้น้ำมันเป็นแหล่ง

คาร์บอนจะมีประสิทธิภาพมากกว่าใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน Sood (1997) ศึกษาผลของ biosurfactant ที่ผลิตโดย *Nocardia amarae* ที่มีต่อ phenantherene ใน ดิน จากการศึกษาพบว่า การใช้สาร biosurfactant จะพบ phenantherene ใน liquid phase ถึง 80เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีใช้น้ำกลั่น ซึ่งจะพบ phenantherene ใน liquid phase เพียง 23เปอร์เซ็นต์

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่จัดว่าความหลากหลายทางชีวภาพสูง ซึ่งได้แก่ พืช สัตว์ และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการสุ่มหาเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเสียบริเวณปั๊มน้ำมัน บ่อบำบัดน้ำเสีย โรงอาหาร และฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เพื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการ ผลิตสาร biosurfactant เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

4.1 คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดิน ที่สามารถผลิตสาร biosurfactant ได้

4.2 เพื่อหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต biosurfactant ได้ดีที่สุด

4.3 ศึกษาช่วงการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิต biosurfactant ได้มากที่สุด

วัน เวลา และสถานที่ทำการวิจัย

วันเริ่มทำการทดลอง 1 กุมภาพันธ์ 2544

วันเสร็จการทดลอง 24 มิถุนายน 2547

สถานที่ทำการทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.1 ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิต biosurfactant

6.2 สามารถนำ biosurfactant ที่ผลิตได้ ไปใช้ในขบวนการ bioremediation ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์การทำวิจัย

1. ตัวอย่างดินจากบริเวณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ พื้นที่โดยรอบ และบางพื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 14 ตัวอย่าง

2. เครื่องมือ
   - ตู้บ่มเชื้อ
   - เครื่องเขย่า (shaker)
   - เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
   - หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
   - ตู้อบ (hot air oven)
   - ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
   - กล้องจุลทรรศน์
   - เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
   - เครื่องวัดแรงตึงผิว (tensiometer)
   - เครื่องแก้วต่างๆ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยก และเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส
   - Actinomycetes isolation agar (Atlas, 1995)
   - Starch-casein agar M3 (Labeda และ Shearer, 1990)
   - Kenknight and Munaier's medium (วิทยา, 2526)
   - Yeast malt extract agar : YMA (สมบูรณ์, 2529)
   - Blood agar (ดวงพร, 2537)
   - Mineral salt medium

4. สารเคมีที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิต biosurfactant โดยวิธี xylene emulsification assay
   - Xylene
   - Tris (hydroxy methyl) aminomethane
   - กรดไฮโดรคลอริก

8. วิธีการวิจัย

1. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดิน รวมทั้งหมด 14 ตัวอย่าง หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ ten-fold dilution นำสารละลายที่ได้มาทำ spread plate method บนอาหารสำหรับแยกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีส ได้แก่ Actinomycetes isolation agar (Atlas, 1995) Starch-casein agar M3 (Labeda และ Shearer, 1990) และ Kenknight and Munaier's medium หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน สังเกตการเกิดโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งมีลักษณะแห้งหยาบและเป็นปุยแน่นสั้นๆประกอบกับการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วจึงแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร YMA เก็บเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้บน YMA slant เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant

2.1 การทดสอบเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant เบื้องต้นโดยดูความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Carrillo และคณะ., 1996)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยปลูกเชื้อบน blood agar โดยวิธี point inoculation แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ตรวจสอบผลการสังเกตวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส หากเกิดวงใสขึ้นแสดงว่าเชื้อนั้นสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ผลการทดสอบเป็นบวก

2.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant ของเชื้อแอคติโนมัยซีสโดยวิธี xylene emulsification essay (Banat และคณะ, 1991)

2.2.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เกิดวงใสบน blood agar ลงบน YMA หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน

2.2.2 นำเชื้อจากข้อ 2.2.1 ซึ่งเจาะด้วย pasteur pipette เป็นวงกลมจำนวน 1 วง (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ใส่ในอาหาร mineral salt medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส, กลีเซอรอล และ hexadecane ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 4 วัน

2.2.3 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิด emulsion ของ xylene โดยใส่ Tris buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ขนาด 16X150 มิลลิเมตร เติม culture broth และ xylene ลงไปอย่างละ 35 ไมโครลิตร ให้อากาศ (2.0 ลิตรต่อนาที) นาน 45 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง(Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2.3 วัดประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวโดยเครื่อง Tensiometer

2.3.1 เตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบตามรายละเอียดข้อ 8.2.2.1-8.2.2.2

2.3.2 นำเชื้อที่ได้ถ่ายลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี mineral salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 4 วัน

2.3.3 เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) ไปวัดค่าแรงตึงผิวโดยเครื่อง Tensiometer

3 การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญกับการผลิต biosurfactant

ศึกษาช่วงการเจริญที่จะผลิต biosurfactant ได้ดีที่สุด โดยนำเชื้อแอคติโนมัยซีส ไอโซเลตที่ผลิต biosurfactants ได้ดี มาเลี้ยงในถังปฏิกิริยา (ขวดแก้วขนาด 8 ลิตร) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อ (growth curve) และการสร้าง biosurfactant

3.1 เตรียมกล้าเชื้อ (starter) ใน mineral salts medium อายุ 72 ชั่วโมง

3.2 inoculate กล้าเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังปฏิกิริยาที่บรรจุ mineral salts medium 3 ลิตร โดยใช้ปริมาณ inoculum 5 เปอร์เซ็นต์

3.3 ทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อวัดค่าแรงตึงผิว ปริมาณน้ำหนักแห้ง และนำส่วนใสมาวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานทางเคมี

4. การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตสาร biosurfactant

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกได้มาทำการบ่งบอกชนิดโดยการทำ slide culture และนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์เทียบกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9thed. (Holt และคณะ, 1994)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสตัวอย่างน้ำเสีย

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างดิน 14 ตัวอย่าง ได้เชื้อแอคติโนมัยซีสทั้งสิ้น 163 ไอโซเลต ดังตารางที่ 2นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเหล่านี้ไปคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต biosurfactant โดยการประเมินด้วยการทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดง (haemolysis) ตามสมมุติฐานและข้อมูลจากการทดลองของ Carrillo และคณะ(1996) ซึ่งได้สรุปไว้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างสาร biosurfactant จะมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จึงสามารถใช้คุณสมบัตินี้ในการคัดเลือกเชื้อที่ผลิต biosurfactant ได้

ตารางที่ 2 แหล่งตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลตที่แยกได้

ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลต
มหาวิทยาลัยแม่โจ้	82
พิพิธภัณฑ์เกษตรแม่โจ้	15
สวนสมุนไพร (ป่าบ้านโป่ง)	13
คลองชลประทานหลังมหาวิทยาลัยแม่โจ้	7
อ่างเก็บน้ำห้วยโจ้	3
บ่อน้ำพุร้อนสันกำแพง จ.เชียงใหม่	6
ป่าบ้านโป่ง	2
ทุ่งกระเจียว (วิปัสสนาเกษตรใหม่)	12
สวนป่ารุกชาติบุญศรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้	7
ทางขึ้นดอยสุเทพ จ.เชียงใหม่	1
อ่างแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2
ศาลเจ้า ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	7
แปลงทดลองปลูกข้าวโพด มหาวิทยาลัยแม่โจ้	5
นาข้าว	1
รวม	163

2 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant

จากการทดสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่าจากเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้งหมด 163 ไอโซเลตมีเพียง 20 ไอโซเลต เท่านั้นที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ โดยสังเกตจากการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนี (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 วงใส (clear zone) ที่เกิดจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแอคติโนมัยซีสบน blood agar

เมื่อประเมินความสามารถในการผลิต biosurfactant เบื้องต้นโดยดูจากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และพบว่ามี 20 ไอโซเลต ที่ให้ผลในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง แล้วทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral salt โดยมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ กลูโคส กลีเซอรอล และ hexadecane หลังจากนั้นนำมาวัดความสามารถในการผลิต biosurfactant จากการทำให้เกิด emulsionโดยวิธี xylene emulsification assay ดังที่ได้มีการศึกษาแล้วว่าผลการทดสอบ xylene emulsification assay ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้สูงจะมีระดับการกระจายตัวใน xylene ได้สูงซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีสารลดแรงตึงผิวสูงและหากแสดงผลค่าการดูดกลืนแสงต่ำก็จะมีระดับสารลดแรงตึงผิวได้ต่ำ (Banat และคณะ, 1991) ซึ่งผลการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จะให้ค่าดังตารางที่ 3

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 20 ไอโซเลต ที่ทดสอบด้วยวิธี xylene emulsification assay

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร		
	แหล่งคาร์บอน (2 เปอร์เซ็นต์)		
	กลูโคส	กลีเซอรอล	hexadecane
BS_1A_{23}	0.081	0.023	0.011
BS_1A_{30}	0.062	0.041	0.071
BS_1A_{54}	0.009	0.031	0.046
BS_1A_{55}	0.021	0.029	0.047
BS_1A_{67}	0.117	0.047	0.140
BS_1A_{68}	0.019	0.016	0.034
BS_1A_{69}	0.202	0.041	0.104
BS_1A_{71}	0.032	0.024	0.092
BS_1A_{73}	0.011	0.008	0.021
BS_1A_{80}	0.058	0.024	0.052
BS_2A_7	0.044	0.030	0.048
BS_2A_{14}	0.013	0.028	0.032
BS_3A_2	0.115	0.071	0.083
BS_3A_9	0.020	0.023	0.030
BS_3A_{11}	0.048	0.032	0.030
BS_4A_3	0.114	0.055	0.102
BS_8A_{12}	0.029	0.035	0.015
BS_9A_3	0.063	0.041	0.078
BS_9A_6	0.043	0.057	0.063
$BS_{13}A_5$	0.052	0.120	0.049

จากตารางผลการทดสอบ xylene emulsification assay ทั้ง 20 ไอโซเลต พบว่า มีเชื้อ แอคติโนมัยซีสเพียง 5 ไอโซเลต คือ BS_1A_{67} BS_1A_{69} BS_3A_2 BS_4A_3 และ $BS_{13}A_5$ ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า 0.1 จากการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน โดย

ไอโซเลต BS_1A_{67} ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.117 และ 0.104 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส และ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ ในขณะที่ BS_1A_{69} ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.202 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.104 ในอาหารที่มี hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน ขณะที่ไอโซเลต BS_3A_2 ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.115 เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับไอโซเลต BS_4A_3 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.114 และเมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.102 และไอโซเลต $BS_{13}A_5$ ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.120 (ตารางที่ 3)

หลังจากได้ข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวแล้วจึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลต BS_1A_{67} BS_1A_{69} BS_3A_2 BS_4A_3 และ $BS_{13}A_5$ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต biosurfactant วัดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสนาน 4 วัน ก่อนนำมาวิเคราะห์ ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการผลิต biosurfactant ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 4 ชนิด

ไอโซเลต	กลูโคส		กลีเซอรอล		hexadecane	
	OD_{660}	SR(%)	OD_{660}	SR(%)	OD_{660}	SR(%)
BS_1A_{67}	0.117	7.55	0.047	3.81	0.140	20.92
BS_1A_{69}	0.202	16.60	0.041	1.90	0.104	8.16
BS_3A_2	0.115	3.77	0.071	4.76	0.083	5.61
BS_4A_3	0.114	3.77	0.055	2.86	0.102	8.16
$BS_{13}A_5$	0.052	5.66	0.120	6.67	0.049	5.61

หมายเหตุ : SR (%) หมายถึง การลดลงของค่าแรงตึงผิว (surface tension reduction)(%)
มีค่าเท่ากับ $\frac{\text{ค่าแรงตึงผิวของก่อนการเจริญ – ค่าแรงตึงผิวหลังการเจริญ}}{\text{ค่าค่าแรงตึงผิวของก่อนการเจริญ}} \times 100$

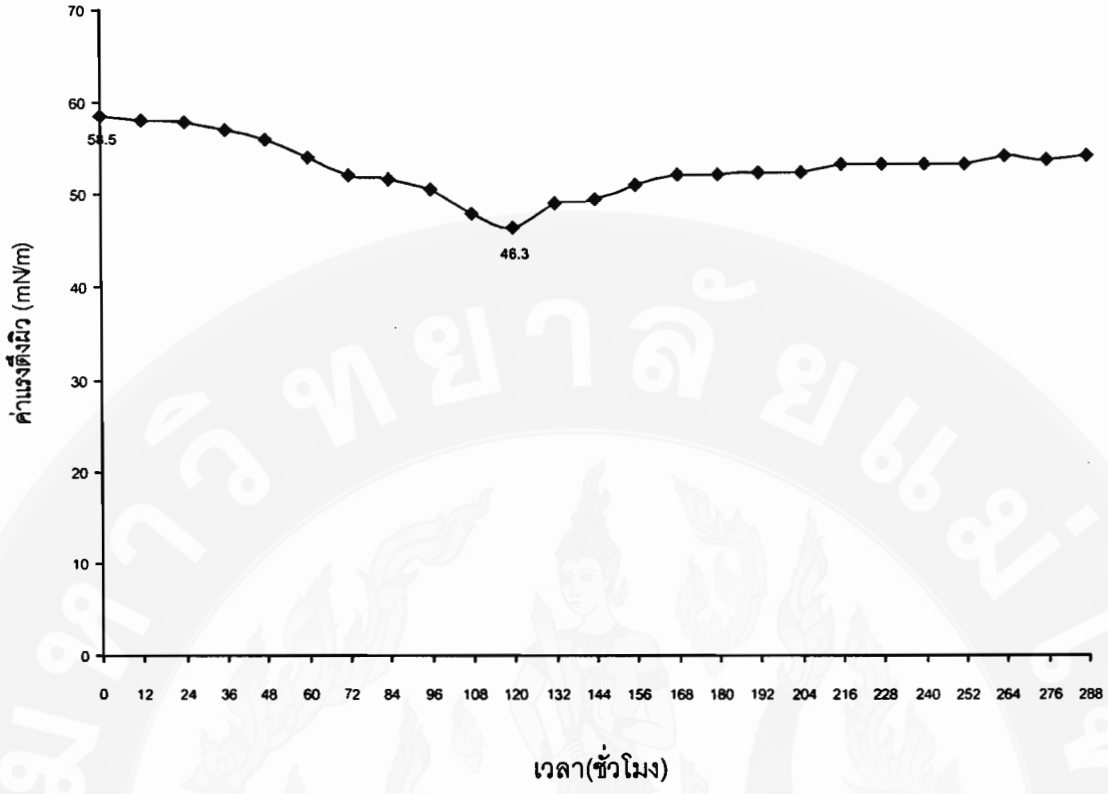
OD_{660} หมายถึงค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร โดยวิธี xylene emulsification assay

จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี hexadecane โดยไอโซเลต BS_1A_{67} สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อลงได้ 20.92 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต BS_1A_{69} และ BS_4A_3 ลดลงได้ 8.16 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต BS_3A_2 และ $BS_{13}A_5$ ลดลงได้ 5.61 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต BS_1A_{69} ลดค่าแรงตึงผิวของอาหารลงได้ 16.60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนการลดลงของค่าแรงตึงผิว ส่วนใหญ่เกิดขึ้นได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกที่จะใช้ hexadecane ในการศึกษาขั้นต่อไป

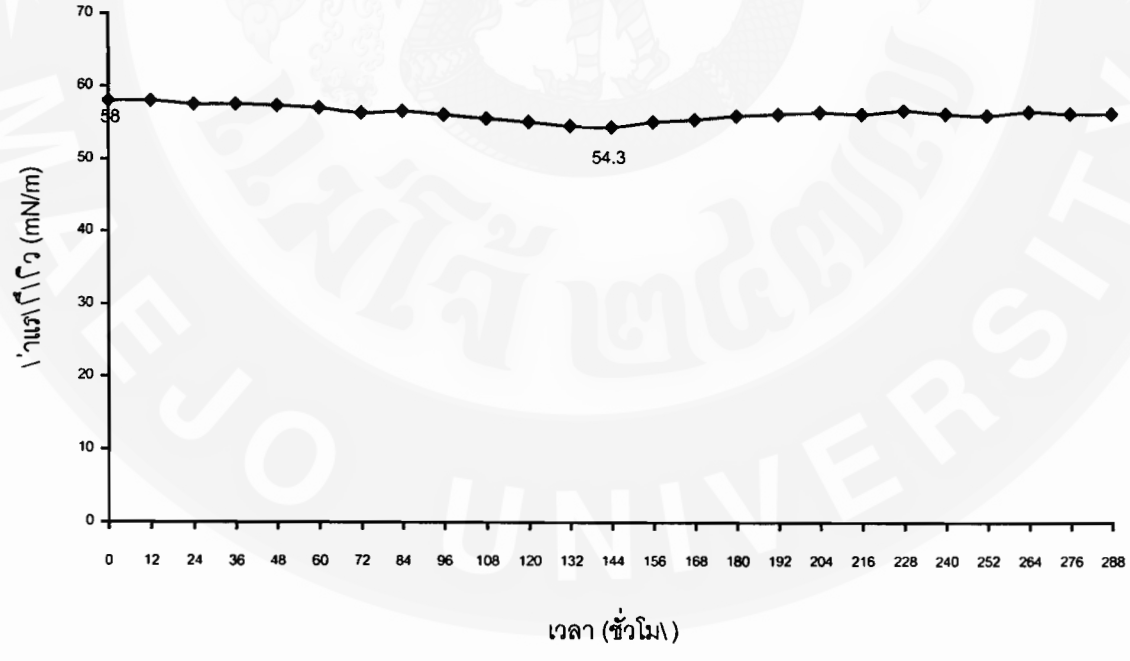
3 การศึกษาช่วงการเจริญและการผลิต biosurfactant ของเชื้อแอคติโนมัยซีส

จากการทดสอบการผลิต biosurfactant ของเชื้อแอคติโนมัยซีส ได้ข้อมูลดังกล่าวข้างต้น แล้วจึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 5 ไอโซเลต ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิต biosurfactant ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน มาศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิต biosurfactant ในสับสเตรตดังกล่าว

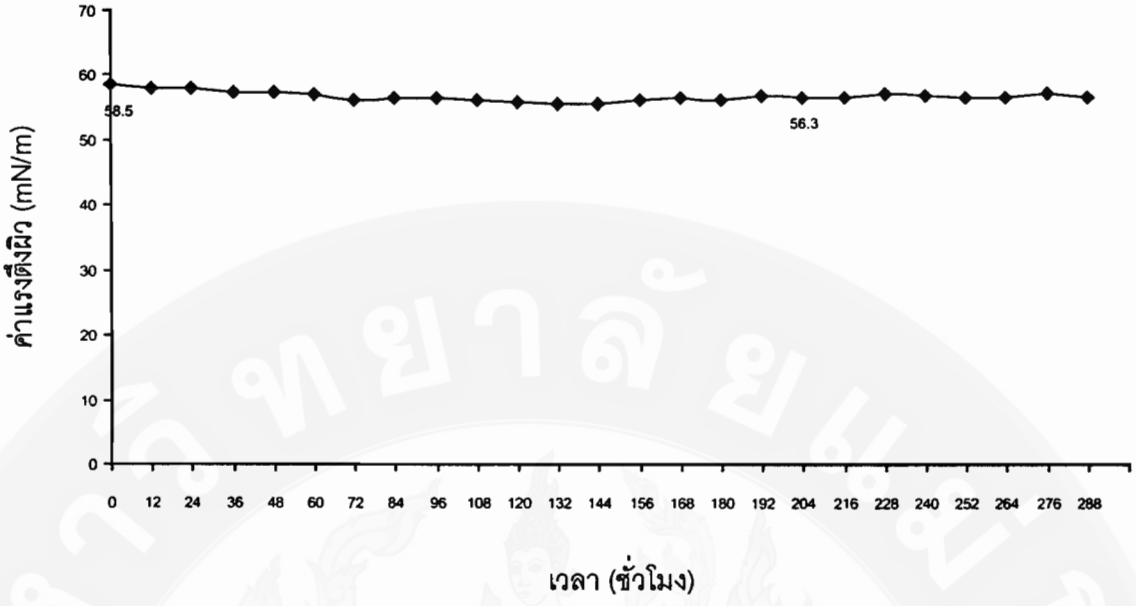
เชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลต BS_1A_{67} สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารที่มี hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอนจาก 58.5 mN/m ลงเหลือ 46.3 mN/m คิดเป็นการลดลงของค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 20.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 120 ชั่วโมง สำหรับ BS_1A_{69} ลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 58.5 mN/m ลงเป็น 54.3 mN/m คิดเป็นการลดลง 8.16 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 144 ส่วน BS_3A_2 จะลด แรงตึงผิวจาก 58.5 mN/m ลงเหลือ 55.5 mN/m ในเวลา 132 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 5.61 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ BS_4A_3 ลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 58.5 mN/m ลงเป็น 54.0 mN/m คิดเป็นการลดลง 8.16 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 216 และ 228 ส่วน $BS_{13}A_5$ จะลดแรงตึงผิวจาก 58.5 mN/m ลงเหลือ 55.5 mN/m ในเวลา 108 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 5.61 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2 – 6) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการผลิต biosurfactant กับ การเจริญของแบคทีเรีย พบว่าระยะของการเจริญที่มีการปลดปล่อย biosurfactant ได้ดีอยู่ในช่วง stationary phase (ภาพที่ 7 – ภาพที่ 11) โดยไอโซเลต BS_1A_{67} มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้สูงที่สุด รองลงมา คือ BS_1A_{69} BS_4A_3 และ BS_3A_2 $BS_{13}A_5$ ตามลำดับ



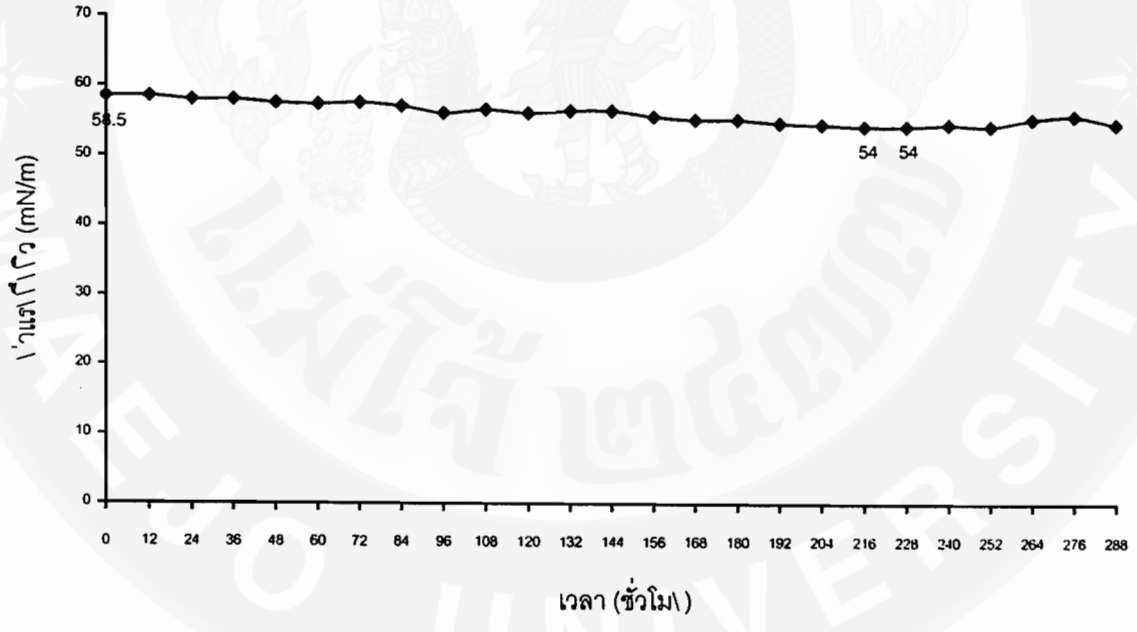
ภาพที่ 2 ค่าแรงตึงผิว(mN/m)ของไอโซเลต BS_1A_{67} เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



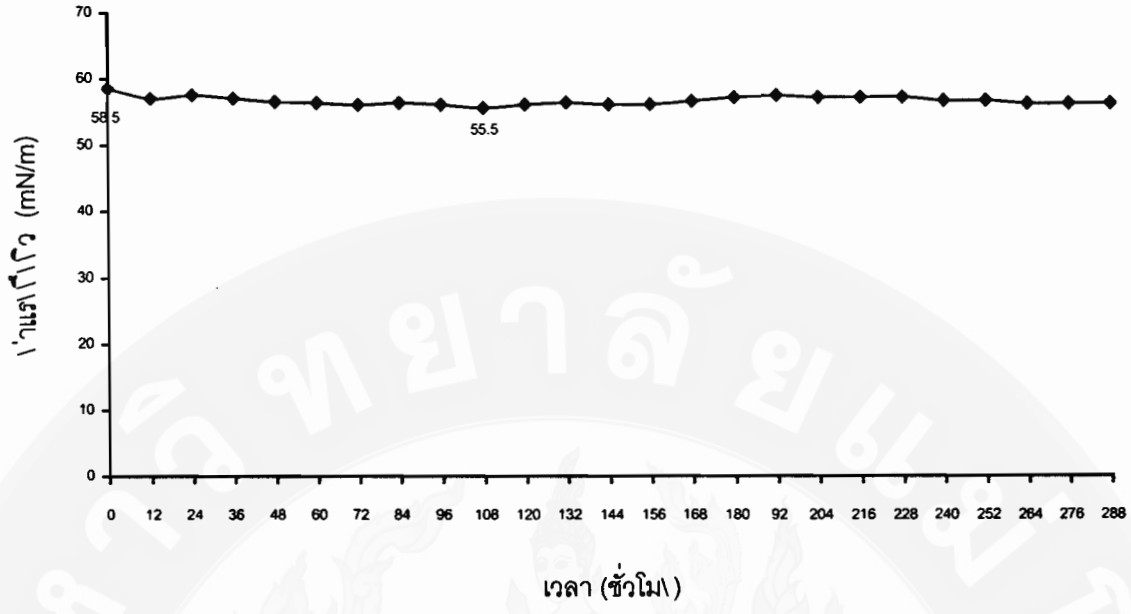
ภาพที่ 3 ค่าแรงตึงผิว (mN/m) ของไอโซเลต BS_1A_{69} เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



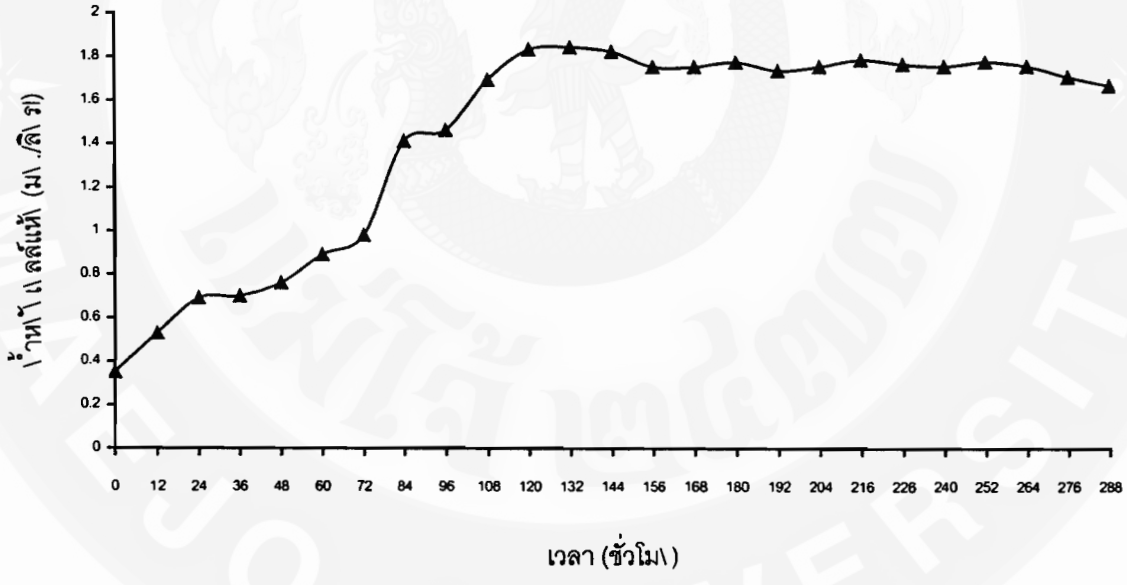
ภาพที่ 4 ค่าแรงตึงผิว (mN/m) ของไอโซเลต BS_3A_2 เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



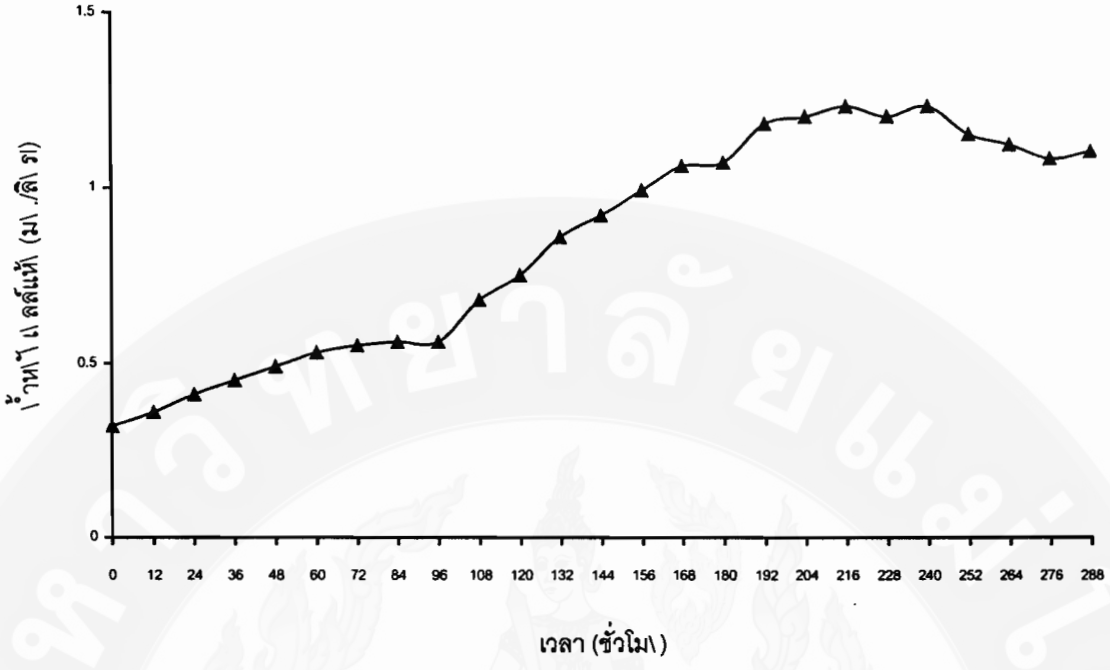
ภาพที่ 5 ค่าแรงตึงผิว(mN/m)ของไอโซเลต BS_4A_3เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



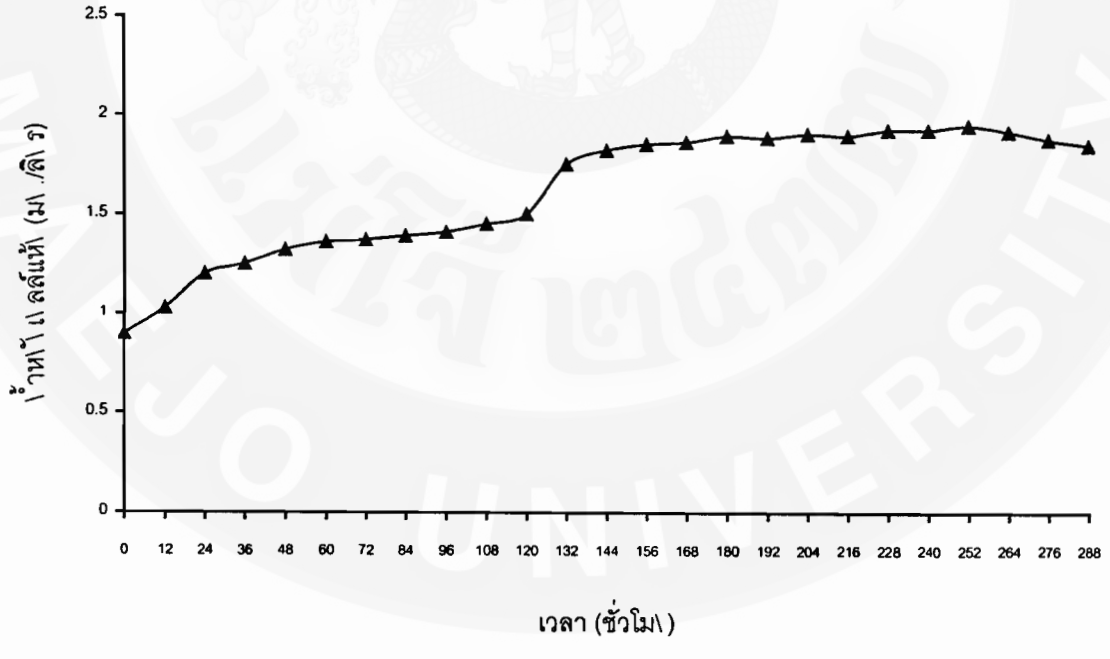
ภาพที่ 6 ค่าแรงตึงผิว(mN/m)ของไอโซเลต $BS_{13}A_5$ เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



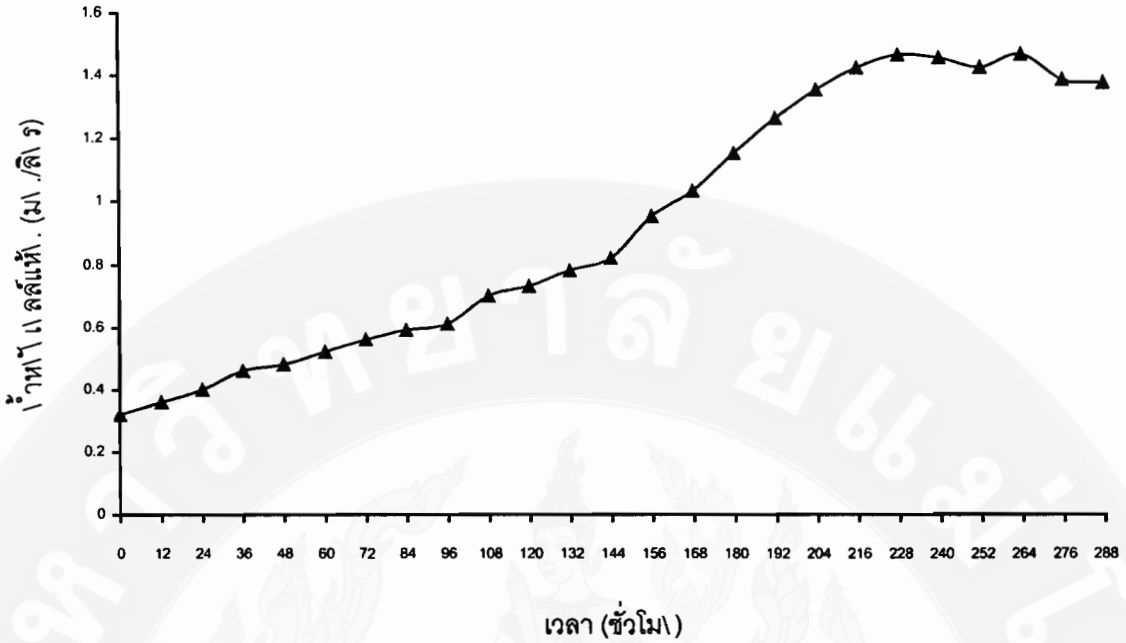
ภาพที่ 7 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ของไอโซเลต BS_1A_{67} เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



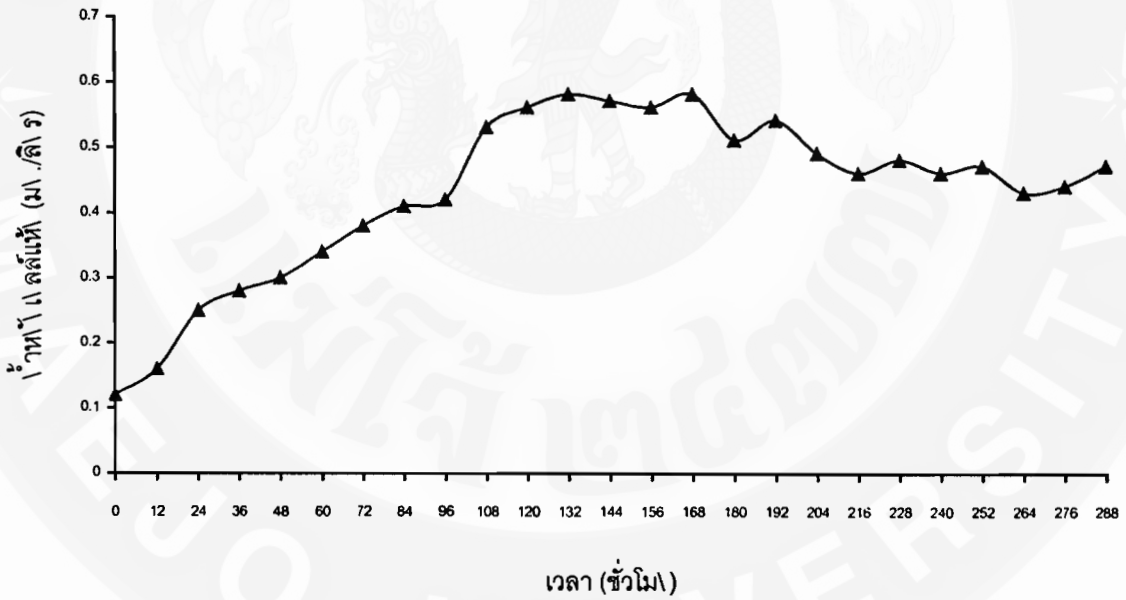
ภาพที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ของไอโซเลต BS_1A_{69} เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ของไอโซเลต BS_3A_2 เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 10 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ของไอโซเลต BS_4A_3 เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 11 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./ลิตร) ไอโซเลต $BS_{13}A_5$ เมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน

สำหรับผลการทดลองที่พบว่าเชื้อมีการปลดปล่อย biosurfactant ได้มีประสิทธิภาพดีในระยะ stationary phase นั้นสอดคล้องกับงานของ Busscher และคณะ (1997) ซึ่งศึกษาการผลิต biosurfactant ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus thermophilus* พบว่า เชื้อดังกล่าวจะปลดปล่อย biosurfactant ออกมาปริมาณมากในช่วงกลางของระยะ exponential phase และช่วงแรกของ stationary phase ในขณะที่ในช่วง stationary phase จะปลดปล่อยออกมาปริมาณน้อยกว่า แต่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวสูงกว่า ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ ก็วัดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดอยู่ในระยะ stationary phase เช่นกัน แต่ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ biosurfactant ที่แน่นอนออกมา ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่า ช่วงใดของการเจริญที่เชื้อที่ทดสอบปลดปล่อย biosurfactant ออกมาในปริมาณมากกว่ากัน

4. การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิต biosurfactant

การศึกษาความสามารถในการผลิต biosurfactant ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากน้ำเสีย พบว่าไอโซเลต BS_1A_{67} มีความสามารถในการผลิต biosurfactant ได้ดี จึงนำมาบ่งบอกชนิดโดยการทำ slide culture แล้วนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูลักษณะของเส้นใย และการสร้างสปอร์ (ภาพที่ 12) เปรียบเทียบกับ Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition (Holt และคณะ, 1994) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลต BS_1A_{67} อยู่ในจีนัส *Streptomyces* sp.

ภาพที่ 12 ลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิต biosurfactant (1000X)

ภาพที่ 13 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิต biosurfactant ที่เจริญบนอาหาร YMA

5 การตรวจชนิดของ biosurfactant ที่เชื้อแอคติโนมัยซีสผลิตเบื้องต้น

หลังจากที่ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิต biosurfactant ของเชื้อแอคติโนมัยซีสแต่ละไอโซเลต จึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยมีข้อมูลพื้นฐานว่าสาร biosurfactant ที่จุลินทรีย์ผลิตส่วนใหญ่จะประกอบด้วยลิปิด ซึ่งสามารถแบ่งได้ 5 ประเภท คือ 1) glycolipids 2) lipopolysaccharides 3) lipopeptides 4) phospholipids และ 5) fatty acid หรือ neutral lipids (Georgiou และคณะ, 1992) ดังนั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นจึงวิเคราะห์หาส่วนประกอบอื่นที่ไม่ใช่ลิปิด ได้แก่ โปรตีน น้ำตาล และฟอสฟอรัส โดยการหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ Lowry's method (Lowry, 1951) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้ Phenol sulfuric total sugar (Dubis และคณะ, 1956) และปริมาณฟอสฟอรัส โดย Phosphorus ascorbic acid method (Lenore และคณะ, 1989) ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต BS_3A_2 และ $BS_{13}A_5$ ตรวจพบโปรตีน และน้ำตาล แต่ไม่พบปริมาณของฟอสฟอรัส ดังนั้น biosurfactant ที่เชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลต BS_3A_2 และ $BS_{13}A_5$ ผลิตจึงควรอยู่ในกลุ่มของ glycolipids lipopolysaccharides หรือ lipopeptides ได้ ในขณะที่ BS_1A_{67}, BS_1A_{69} และ BS_4A_3 พบทั้งโปรตีน น้ำตาลและฟอสฟอรัส จึงเป็นไปได้ว่า biosurfactant ที่ไอโซเลต BS_1A_{67} BS_1A_{69}

และ BS_4A_3 ผลิตจะอยู่ในกลุ่มของ glycolipids lipopolysaccharides lipopeptides หรือ phospholipids ได้

สรุปผลการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างดิน 14 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 163 ไอโซเลต และเมื่อนำทั้ง 163 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant เบื้องต้น โดยการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกโดยดูผลจากการแสดงการเกิด clear zone พบว่ามีเพียง 20 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้

2. เมื่อนำทั้ง 20 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการผลิตสาร biosurfactant โดยวิธี xylene emulsification assay โดยเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีกลูโคส กลีเซอรอล และ hexadecane (2 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรากฏว่ามีเพียง 5 ไอโซเลต เท่านั้นที่เกิด emulsion ได้ดี คือ BS_1A_{67} BS_1A_{69} BS_3A_2 BS_4A_3 และ $BS_{13}A_5$ โดยสามารถให้ระดับการกระจายตัวใน xylene เมื่อได้ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร แล้วให้ค่าสูงมากกว่า 0.1 โดยจะให้ผลดีเมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งยังมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีด้วย

3. เมื่อนำแอคติโนมัยซีสไอโซเลต BS_1A_{67} มาจำแนกชนิดโดยเทียบกับ Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology , 9th edition พบได้ว่าแอคติโนมัยซีสไอโซเลตดังกล่าวอยู่ในจีนัส *Streptomyces* sp.

4. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ กับการผลิต biosurfactant พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 ไอโซเลต จะผลิต biosurfactant ได้ดีในช่วง stationary phase

5. ในการทดสอบชนิดของ biosurfactant ที่เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้ผลิต โดยใช้การทดสอบทางเคมีพื้นฐาน คือ โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และฟอสฟอรัส พบว่า BS_3A_2 และ $BS_{13}A_5$ ผลิต biosurfactant ที่ประกอบด้วย โปรตีน และน้ำตาล ในขณะที่ BS_1A_{67} BS_1A_{69} และ BS_4A_3 ประกอบด้วย โปรตีน น้ำตาล และ ฟอสฟอรัส

งานวิจัยขั้นต่อไป

1. ทดสอบการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรือวัตถุดิบที่มีราคาถูก มาใช้เป็นสับสเตรตในการผลิต biosurfactant ในปริมาณมาก
2. การทดสอบการใช้ biosurfactant ที่ผลิตได้ ในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน
3. การผลิต biosurfactant ในเชิงพานิชย์

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. 202 น.

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. **ปฏิบัติการเอมไซม์วิทยา.** ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพ ฯ. 52 น.

เลอลักษณ์ จิตรดอน (2536) ปฏิบัติการจุลชีววิทยาดิน. ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, เอกสารสำเนา 162 น.

วิทยา มีวุฒิสม. 2526. **อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ดิน.** ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 32 น.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2539. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 184 น.

Aronstein, B.N., Gibson, T.L., and Rai, D.N. (1991) Selection of Surfactants for the Removal of Petroleum Products from Shallow Sandy Aquifers. Ground Water, 28, 920.

Atlas, R.M. (1995) Microbiological Media for the Examination of Food. CRC Press, Inc., U.S.A., 310 p.

Banat I.M., N. Sammarsh, M. Murad, R. Horne and S. Banerjee. 1991. Biosurfactant Production and Use in Oil Tank Clean – Up. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 7 : 80 – 88.

Bruce A.B., P.B. Nelson, A.W Stephen and W.M. George. 1990. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Emission from the Combustion of Crude Oil on Water. Environment Science Technology. 24 : 1418 – 1427.

Busscher, H.J., C.G. van Hoogmoed, G.I. Geertsema-Doornbusch, M. van der Kuijl-Booij and H.C. van der Mei. 1997. *Streptococcus thermophilus* and Its Biosurfactant Inhibit Adhesion by *Candida* spp. On Silicone Rubber. Appl. Environmental Microbiology. 32 , 3810-3817.

Carriollo, P.G., C. Mardaraz, S.I. Pitta – Alvarez and A.M. Giulietti. 1996. Isolation and Selection of Biosurfactant – Producing Bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 12 : 82 – 84.

Cooper, D.G., (1986) Biosurfactant. Microbiological Science, 3(5).

Daytner A. 1983. Surfactant in Our World. International Science Publisher, New York. 65 p.

Dubis, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A.Rebers and F.Smith. 1956. Anal.Chem. 28 : 350.

Duvnjak, Z. and N. Kosaric. 1985. Production and Release of Surfactant by *Corynebacterium lepus* in Hydrocarbon and Glucose Media. Biotechnology Letters. 7(11) : 793 – 796.

Georgiou G., L. Sung – Chyr and M.M. Sharma. 1992. Review of Surface – Active Compounds from Microoganisms. Biological. Technology. 10: 60 – 65.

Holt, G.R., R.N. Krieg, W.A. Staley, R.N. Sneath and T.S. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition. Williams and Maryland. 787 p.

Ivshina I.B., M.S., Kukima, J.C. Philip and N. Christorfki. 1998. Oil Desorption form Mineral and Organics Material using Biosurfactant Complexed by *Rhodococcus* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 14 : 711 – 717.

Labeda, D.P. and Marcia, C.S. (1990) Isolation of Actinomycetes for Biotechnological Application in Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. McGraw-Hill, Inc., U.S.A., p.1-19.

Laha, S., and Luthy, R.G. (1991) Inhibition of Phenantherene Mineralization by Nonionic Surfactant in Soil-Water Systems. Environmental Science & Technology, 25(11), 1920.

Laha, S., and Luthy, R.G. (1992) Effects of Nonionic Surfactants on the Solubilization and Mineralization of Phenantherene in Soil-Water Systems. Biotechnology and Bioengineering, 40, 1367.

Lenore, S., E.Arnold and R. Rhodes. 1989 Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, USA.

Oberbremer, A., Muller-Hurtig, R. and Wagner, F. (1990) Effect of the Addition of Microbial Surfactants on Hydrocarbon Degradation in a Soil Population in a Stirred Reactor. Appl. Microbiology & Biotechnology, 32 , 485.

Peter, R.W.,C.D. Montemagno and L. Shem. 1992. Surfactant Screening of Diesel Contaminated Soil. Hazardous Waste and Hazardous Materials. 9(2) : 113 – 116.

Pruthi, B. and S.S. Cameotra. 1997. Production of a Biosurfactant Exhibiting Excellent Emulsification and Surface Active Properties by *Serratia marcescens*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 13 : 133 – 139.

Robert, M., M.E. Mercade, M.P. Bosch, J.L. Parra, M.J. Espuny, M.A. Manresa and J. Grinea. 1989. Effect of the Carbon Source on Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeroginosa* 44T1. Biotechnology Letters : 871 – 874.

Sood, A. (1997) Biosurfactant Production by *Nocardia amarae* and its Effect on Partition of Phenantherene into Soil. Master Thesis, Illinois Institute of Technology, Chicago, U.S.A.

Tsomides, H.J., Hughes, J.B., Thomas, J.M., and Ward, C.H. (1995) Effect of Surfactant Addition on Phenatherene Biodegradation in Sediments. Environmental Toxicology and Chemistry, 14(6), 953.

Venkata, K. and N.G. Karanth. 1989. Production of Biosurfactant by the Resting Cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR – 6. Biotechnology Letters. 11(6) : 437 – 442.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารเคมี

1. Tris-buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

นำ Tris base [tris (hydroxymethyl) aminomethane ; MW 121.1 กรัมต่อโมล] 121.1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ทำให้ละลายโดยใช้แท่นกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 42 มิลลิลิตร เมื่อได้ค่าความเป็นกรด-ด่างตามต้องการแล้วนำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใส่ในขวดปรับปริมาตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

ภาคผนวก ข.
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

blood agar (**ดวงพร**, 2537)

Beef heart, infasion form	500	กรัม
Bacto-tryptose	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Bacto-agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.4		

หลังจากฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติมเลือดที่ปราศเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงจานเพาะเชื้อ

Kenknight and Munaier' s medium (**วิทยา**, 2526)

Dextrose	1.0	กรัม
KCl	0.1	กรัม
KH_2PO_4	0.1	กรัม
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.1	กรัม
$NaNO_3$	0.1	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเทลงในจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

Yeast Malt extract Agar (**สมบูรณ์**, 2529)

Dextrose	4.0	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.3

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเทลงในจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

Mineral Salt medium

$CaCl_2.2H_2O$	0.02 กรัม
$FeCl_2$	0.002 กรัม
KH_2PO_4	1.0 กรัม
$MnSO_4.2H_2O$	0.002 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 กรัม
Na_2HPO_4	1.0 กรัม
NH_4NO_3	0.5 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเทลงในจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคส, กลีเซอรอล และ เฮกซะเด็กเคน หรือ น้ำมันมะกอก) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์