# การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลน
# Biodiversity of biosurfactant-producing bacteria from mangrove sediment

**นฤมล มีบุญ[1] และ อทิพันธ์ เสียมไหม[2]**
Naruemon Meeboon[1] and Atipan Saimmai[2]

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้แยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต โดยใช้วิธี serial dilution method โดยใช้น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 1042 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน 102 ตัวอย่างหลังจากทำ primary screening โดยใช้กลูโคสหรือน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยวิธีdrop-collapsing test พบว่า มีเชื้อที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 144 ไอโซเลทนำเชื้อที่ได้รับคัดเลือกมาทดสอบ secondary screening เพื่อวัดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยวัดค่าแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชั่น (EA)ผลพบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 30 ไอโซเลทที่มีค่าความสามารถลดแรงตึงผิวและเกิดอิมัลชั่นได้ดีที่สุดโดยเชื้อแบคทีเรีย KB3 และ AS6 มีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวได้สูงที่สุดเท่ากับ 40.5 และ 37.7 mN/m ตามลำดับ และเชื้อแบคทีเรีย15 และ NA1 มีความสามารถในการเกิดอิมัลชั่นสูงสุดเท่ากับร้อยละ 60.50 และ 58.07 ตามลำดับ

**คำสำคัญ** แบคทีเรีย สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดินตะกอน ป่าชายเลน

## Abstract

In this study, we characterized biosurfactant producing microbial populations from mangrove sediment in Phuket province by serial dilution method using used palm oil as a sole carbon source. A total of 1042 oil-utilizing microorganisms were isolated from the 102 sediment samples. After primary screening using glucose or used palm oil (2 percent by weight) as a sole carbon source by drop-collapsing test showed 144 isolates that could produce biosurfactant. The selected bacteria were tested for secondary screening to measure surfactant activity by measuring the surface tension and emulsion activity (EA). The results showed that 30 isolates of the bacteria with the best ability to reduce surface tension and emulsion activity were able to select.The KB3 and AS6 bacteria were able to reduce the surface tension at the highest level of 40.5 and 37.7 mN/m, respectively, and the 15 and NA1 bacteria had the highest emulsion activity of 60.50 and 58.07%, respectively

**Keywords** bacteria biosurfactant sediment mangrove

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
[2]สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

## ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถพบได้จาก หลายๆ แหล่ง โดยจุลินทรีย์ที่มาจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปด้วย ป่าชายเลนมีสภาพแวดล้อมโดยทั่วไปที่แตกต่างไปจากบริเวณ อื่น โดยเฉพาะลักษณะของดินที่มีสภาพเป็นดินเลน ซึ่งจะมีความอุดมสมบูรณ์สูงจากธาตุอาหารที่ไหลมาจากแหล่งต่างๆ อีกทั้งยังมีการขึ้น-ลงของน้ำทะเลทำให้เกิดความหลากหลายทาง ชีวภาพสูง สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในตะกอนดินป่าชายเลนจึงมีความหลากหลาย สูงไปด้วย อีกทั้งรายงานการศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลนยังมีอยู่น้อยมาก การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการสร้างพื้นฐานความรู้เกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในตะกอนดินป่าชายเลน

ป่าชายเลน เป็นบริเวณที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ประเทศไทยมีป่าชายเลนกระจายอยู่ตลอดแนวชายฝั่งทะเลทั้งทางด้านทิศตะวันออกและตะวันตก โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดภูเก็ตซึ่งมีป่าชายเลนกระจายตัวอยู่รอบๆ จังหวัด (Frith et al., 1972) สภาพแวดล้อมโดยทั่วไปของป่าชายเลนมีความแตกต่างออกไปอย่างมากจากป่าชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะดินเนื่องจากมีสภาพเป็นดินเลน ดินเหล่านี้จะมีความอุดมสมบูรณ์สูงจากธาตุอาหารที่ไหลมาจากแหล่งต่างๆ เช่น จากการกัดเซาะตามชายฝั่งและแหล่งน้ำลำธาร อีกส่วนหนึ่งมาจากซากพืชซากสัตว์ โดยเฉพาะใบไม้ที่ร่วงทับถมกันเป็นจำนวนมาก การสลายตัวของซากพืชซากสัตว์จะอาศัยจุลินทรีย์เป็นผู้ย่อยสลาย ซึ่งกลไกหนึ่งที่ส่งเสริมการย่อยสลายได้แก่ การผลิตสารลดแรงตึงผิว สารนี้เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติลดแรงตึงผิวและเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ที่ดี ซึ่งสร้างโดยสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ที่พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และบนพื้นดิน ปัจจุบันการผลิตสารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่จะใช้กระบวนการทางเคมี ซึ่งพบว่าย่อยสลายในธรรมชาติได้ยากจึงเป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (จันทร์เพ็ญ อิสลาม, 2544) ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลาย มีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และสามารถทำงานภายใต้สภาวะที่วิกฤติได้ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญเพื่อให้ได้มาซึ่งสารที่มีสมบัติเหมาะสมเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

**วัตถุประสงค์**

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากป่าชายเลยจังหวัดภูเก็ต
2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตะกอนดินป่าชายเลน

**สมมุติฐาน**

ป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ตมีความหลากหลายของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูง

## วิธีดำเนินการวิจัย

**ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง**

1. **ประชากร**แบคทีเรียในเขตพื้นที่ป่าชายเลน
2. **กลุ่มตัวอย่าง**แบคทีเรียสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในตะกอนดินป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต

**เครื่องมือการวิจัย**

เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ชนิดต่าง ๆ

**การเก็บรวบรวมข้อมูล**

1. ตัวอย่างตะกอนดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างตะกอนดินป่าชายเลนจากอำเภอต่างๆ ในจังหวัดภูเก็ต โดยกระจายให้ครอบคลุมทั่วทั้งบริเวณๆ ละ 5 - 10 จุด เก็บที่ความลึก 0 - 5 ซม. จากผิวดิน ก่อนเก็บตัวอย่างดินต้องกวาดเศษพืชหรือวัสดุที่อยู่ผิวหน้าดินออกเสียก่อน นำดินทุกจุดใส่รวมกันในถุงพลาสติกหรือภาชนะที่เตรียมไว้ เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างดินมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในห้องปฏิบัติการ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มี 2 ชนิด คือ Minimal Salt Medium (MSM) และ Nutrient Broth (NB) โดยอาหาร MSM ใน1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): K2HPO4 0.8; KH2PO4 0.2; CaCl2 0.05; MgCl2 0.5; FeCl2 0.01; (NH4)2SO4 1.0; NaCl5.0; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้ได้ 7.0 (Saimmai et al., 2012) และอาหารNBใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): Beef extract 3; Peptone 5; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ Nutrient Agar เติม agar 15 กรัม)

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 การทดสอบ Drop collapse ของหยดน้ำมัน (Bodour and Maier, 1998)

ทดสอบค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยการหยดน้ำมันปาล์ม 2 ไมโครลิตร ลงในหลุม 96-microwell plate ตั้งไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเติมตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 5 ไมโครลิตร บ่มนาน 1 นาทีสังเกตลักษณะการแผ่ออกของหยดตัวอย่างโดยการแผ่ออกของสารตัวอย่างจะแสดงถึงการมีสารลดแรงตึงผิวในตัวอย่าง เปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางการแผ่ออกของสารของชุดควบคุมกับตัวอย่างที่ใช้ โดยใช้น้ำกลั่นหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นชุดควบคุม

3.2 การทดสอบความสามารถในการเกิด Emulsification activity (EA) (Cooper and Goldenberg, 1987)

นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำมันปาล์มปริมาณ 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที คำนวณค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชั่น (EA) โดยดูจากความสูงของชั้นอิมัลชั่นต่อความสูงทั้งหมดของสารละลาย

EA = [ความสูงของชั้นอิมัลชั่น / ความสูงทั้งหมดของสารละลาย] x100

3.3 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

นำตัวอย่างสารละลายส่วนใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาวัดวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Ring tension meter (Torsion balance Model OS, Torsion Balance Supplies, Warwickshire, England) ตามวิธีของKim และคณะ(2002) อ่านค่าแรงตึงผิวที่ได้เป็นหน่วยมิลลินิวตัน/เมตร (mN/m)

4. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนดินป่าชายเลน

ใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงใน 0.85%NaClปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 วินาที ปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread plate บนอาหาร NA ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) 4-5 วัน สุ่มเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าวมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวๆ นำเชื้อแบคทีเรียที่เลือกได้เลี้ยงในอาหาร NBปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อที่ได้ในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอล ร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ร้อยละ 5 โดยปริมาตร เลี้ยงในอาหาร NBปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น และปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่า OD660 เท่ากับ 0.5

6. การทำ primary screening

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 2 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

6.1 เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ

นำไปสกัดน้ำมันออกด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ไปหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Binazadeh et al., 2009)

6.2 เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ

นำไปหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบ drop-collapsing test ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น เลือกเชื้อที่พบกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 มิลลิเมตร เพื่อคัดเลือกในขั้นตอนต่อไป

7. การทำ secondary screening

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้างต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และอาหาร MSM ที่มี กลูโคสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง วิเคราะห์การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้นเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่ดีที่สุดจำนวน 30 ไอโซเลทเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

8.ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด 20 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา re-streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดิม 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะของโคโลนี รูปร่างเซลล์ การเรียงตัว และการติดสีแกรม (Gram staining)

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป R (https://cran.r-project.org/bin/windows/base/) SPSSversion 3.5.0 (Venables et al., 2009)

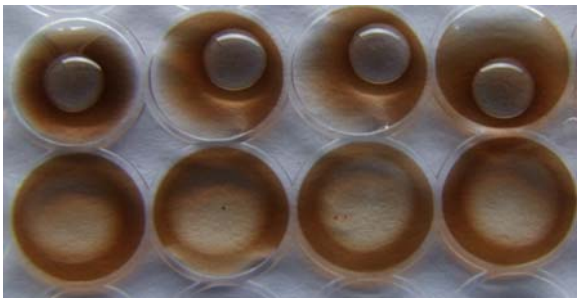
**การวิเคราะห์ข้อมูล**

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตะกอนดินป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 102 ตัวอย่าง จากอำเภอกะทู้ (32 ตัวอย่าง) อำเภอถลาง (28 ตัวอย่าง) และ อำเภอเมือง (42 ตัวอย่าง) โดยนำตัวอย่างมาแยกเชื้อโดยเจือจางใน 0.85%NaClจากนั้น ปิเปตสารละลายมาspread plate บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48-96 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนีมาstreak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว เลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน และสุ่มเลือกเชื้อให้มากที่สุด ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน 1,042 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** แสดงแหล่งตัวอย่าง การเจริญ (G) และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (B) ของแบคทีเรียที่คัดแยก ได้จากตะกอนดินป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ตหลังจากเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีกลูโคส หรือน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

| | | | กลูโคส | | | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| แหล่งตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่าง | จำนวนไอโซเลท | G | B | % | G | B | % |
| อำเภอกระทู้ | 32 | 320 | 205 | 21 | 10 | 115 | 38 | 33 |
| อำเภอถลาง | 28 | 254 | 156 | 17 | 11 | 98 | 17 | 17 |
| อำเภอเมือง | 42 | 468 | 286 | 25 | 9 | 182 | 26 | 14 |
| รวม | 102 | 1,042 | 647 | 63 | 10 | 395 | 81 | 21 |

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทำ primary screening โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง ที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่ใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน นำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง ตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop collapsing test (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop collapsing test; แถวบน: ตัวควบคุมลบ (อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ); แถวล่าง: ตัวอย่างที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นทั้ง 144 ไอโซเลทมาทำ secondary screening โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดค่าแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชั่น (EA) ในกรณีที่ใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน นำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดจำนวน 30 ไอโซเลทไปศึกษาการย้อมติดแกรมเพื่อจำแนกกลุ่มแบคทีเรียจากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงสุด 30 ไอโซเลท ได้แก่ 15, 17, 18, AS4, AS5, AS6, AS21, AS31, CT1, CT2, CT3, CT4, KB2, KB3, LC19, LC10, LC12, LC16, NA1, NA2, NA3, NA4, SA1, SA2, SA3, SB7, SB8, TD4, TF19 และ TG9 (ตารางที่ 2) เมื่อย้อมแกรมแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้พบว่าโดยส่วนใหญ่ คือ ร้อยละ 80 (6 จาก 30 ไอโซเลท) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน คือ เชื้อ KB3 และ AS6 โดยมีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 40.5 และ 37.7 mN/m ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชั่นสูงสุดเมื่อใช้กลูโคสและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน คือ เชื้อ 15 และ NA1 โดยมีค่า EA เท่ากับร้อยละ 60.50 และ 58.07 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** แหล่งที่มา แหล่งคาร์บอน ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยง (surface tension reduction: SR) และความสามารถในการเกิดอิมัลชั่น (EA)

| ไอโซเลท | แหล่งที่มา | แหล่งคาร์บอน | การย้อมแกรม | SR (mN/m) | EA (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 15 | อำเภอกระทู้ | กลูโคส | แกรมลบ | 30.1±1.9* | 60.50±5.82* |
| 17 | อำเภอกระทู้ | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 10.5±0.5 | 22.95±5.32 |
| 18 | อำเภอกระทู้ | กลูโคส | แกรมลบ | 8.7±2.1 | 10.18±4.54 |
| AS4 | อำเภอกระทู้ | กลูโคส | แกรมลบ | 21.5±0.7 | 24.74±6.01 |
| AS5 | อำเภอกระทู้ | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 22.0±2.5 | 55.05±7.52 |
| AS6 | อำเภอกระทู้ | กลูโคส | แกรมลบ | 40.5±1.5 | 28.29±2.08 |
| AS21 | อำเภอกระทู้ | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 13.5±2.7 | 35.45±5.21 |
| AS31 | อำเภอกระทู้ | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 22.0±4.0 | 30.84±2.52 |
| CT1 | อำเภอกระทู้ | กลูโคส | แกรมบวก | 32.5±0.5 | 34.65±2.10 |
| CT2 | อำเภอกระทู้ | กลูโคส | แกรมลบ | 12.0±5.0 | 30.55±2.00 |
| CT3 | อำเภอกระทู้ | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 18.7±2.7 | 32.07±7.35 |
| CT4 | อำเภอกระทู้ | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 14.7±0.9 | 64.84±9.01 |
| KB2 | อำเภอถลาง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 12.3±2.7 | 30.21±5.32 |
| KB3 | อำเภอถลาง | กลูโคส | แกรมลบ | 37.7±3.0 | 45.84±4.55 |
| LC19 | อำเภอถลาง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมบวก | 10.8±2.7 | 22.54±8.08 |
| LC10 | อำเภอถลาง | กลูโคส | แกรมบวก | 8.5±1.4 | 27.98±3.00 |
| LC12 | อำเภอเมือง | กลูโคส | แกรมบวก | 33.0±2.7 | 25.00±2.08 |
| LC16 | อำเภอเมือง | กลูโคส | แกรมบวก | 11.7±4.1 | 20.00±5.34 |
| NA1 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 18.7±4.2 | 58.07±8.10 |
| NA2 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมบวก | 13.8±.80 | 24.28±3.18 |
| NA3 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 8.5±1.7 | 28.54±3.82 |
| NA4 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 11.7±2.5 | 22.87±4.50 |
| SA1 | อำเภอเมือง | กลูโคส | แกรมลบ | 34.5±2.7 | 32.82±2.41 |
| SA2 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 10.7±1.8 | 60.27±7.52 |
| SA3 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 21.9±2.1 | 30.54±5.00 |
| SB7 | อำเภอเมือง | กลูโคส | แกรมลบ | 35.7±2.9 | 29.88±5.08 |
| SB8 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 15.7±1.0 | 27.52±7.54 |
| TD4 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 8.4±1.7 | 33.54±4.88 |
| TF19 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 16.8±1.9 | 25.25±6.51 |
| TG9 | อำเภอเมือง | น้ำมันปาล์มใช้แล้ว | แกรมลบ | 20.7±2.7 | 23.42±5.21 |

## สรุปผล

จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินตะกอนป่าชายเลน พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 1,042 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ตจำนวน 102 ตัวอย่าง เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทำ primary screening โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal salt medium (MSM) ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วัดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดย

วิธี drop collapsing test พบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวจำนวน 144 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 144 ไอโซเลทมาทำ secondary screening โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วัดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยวัดค่าแรงตึงผิว ความสามารถในการเกิดอิมัลชั่น (EA) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดจำนวน 30 ไอโซเลทโดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้สูงสุด คือ เชื้อ KB3 และ AS6 โดยมีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 40.5 และ 37.7 mN/m ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชั่นสูงสุด คือ เชื้อ 15 และ NA1 โดยมีค่า EA เท่ากับร้อยละ 60.50 และ 58.07 ตามลำดับ

## อภิปรายผล

จากผลการทดลองการตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop collapsing test พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ร้อยละ 62) สามารถเจริญเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แบคทีเรียจึงสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ง่าย (Saimmai, 2011) ในขณะที่เมื่อใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน มีแบคทีเรียร้อยละ 38 ที่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากในน้ำมันปาล์มใช้แล้วนั้นมีส่วนประกอบที่อาจเป็นพิษ ต่อเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น กรดไขมันอิสระเป็นต้น (Katemai, 2009) จากข้อข้อมูลข้างต้นให้เห็นว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อวัดกิจกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวพบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมทั้งหมดจำนวน 144 ไอโซเลท โดยมีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำนวน 63 และ 81 ไอโซเลท เมื่อใช้กลูโคสและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ (ตารางที่ 2) ร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเมื่อใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนมีมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ร้อยละ 21 และ 10 ตามลำดับ) เนื่องจากเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมัน เชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้โดยส่วนใหญ่จะผลิตสารที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันให้มีขนาดเล็กเพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ง่าย สารเหล่านี้ได้แก่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Maneerat, 2006)

จากการย้อมแกรมแบคทีเรียพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้พบว่าโดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Biccaและคณะ (1999), Bodourและคณะ (2003), Batista และคณะ (2006) และ Saimmai และคณะ (2012) ที่พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์จากน้ำมันโดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนสารอาหารได้ดีกว่ากลุ่มอื่นๆ

เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกมาได้นั้นมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ และแหล่งคาร์บอน ค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในช่วง ร้อยละ 20 ถึง 35 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีศักยภาพจะนำไปใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ได้ควรมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากกว่าร้อยละ 50 (Willumsen and Karlson, 1997) จากการทดลองในครั้งนี้มีเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท (15, AS5, CT4, NA1 และ SA2) ที่มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากกว่าร้อยละ 50 โดยเชื้อแบคทีเรีย CT4 มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากที่สุด (ร้อยละ 64.84) ค่าการลดแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท แสดงให้ถึงศักยภาพที่จะสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ทางการค้าได้

หลังจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้กลูโคสหรือน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วัดค่าการลดแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใส (surfacetension reduction) พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกมาได้นั้นมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งค่าความสามารถในการลดแรงตึงผิวนี้มีค่าแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สายพันธุ์ แหล่งอาหาร และสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Desai and Banat, 1997) จากการทดลองพบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท (15, AS6, CT1, KB3, LC12, SA1 และ SB7) ที่มีค่าการลดแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสมากกว่า 30 mN/m ซึ่งเทียบเท่าค่าการลดแรงตึงผิวของสารละลายด้วย สารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Tween 80) (Bodour and Maier, 1998) ค่าการลดแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท แสดงให้ถึงศักยภาพที่จะสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวทางการค้าได้

## ข้อเสนอแนะ

**ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้**

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียสามารถไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค หรือใช้ในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและสิ่งแวดล้อมได้

**ข้อเสนอแนะสำหรับการทำวิจัยต่อไป**

ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

## เอกสารอ้างอิง


จันทร์เพ็ญ อิสลาม.2544. **การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R. and Totola, M.R. 2006.Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Biores.Technol**.97: 868-875.

Bicca, F.C., Fleck, L.C. and Ayub, M.A.Z. 1999. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcusruber and Rhodococcuserythropolis. **Revista de Microbiologia**. Microbiol. 30: 231-236.

Binazadeh, M., Karimi, I.A. and Li, Z. 2009.Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with Rhodococcus sp. Moj-3449.Enz.Microbiol. Technol. 45: 195-202.

Bodour, A. A. and Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological** and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology**. 69 (6), pp.3280-3287.

Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two Bacillus species. **Applied and Environmental Microbiology**. 53 (2), pp. 224-229.

Desai, J. D. and Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 61 (1), pp. 47-64.

Frith, D. W., Tantanasiriwong, R. and Bhatia, C. (1972). Zonation of macrofauna on a mangrove shore, Phuket island Thailand. **Phuket Marine Biological Center Research Bulletin**. 10, p. 37.

Katemai, W. (2009). **Screening of biosurfactant-producing yeast, purification, characterization and application**. Ph.D. thesis in Biotechnology, Graduate School, Prince of Songkla University.

Kim, H. S., Jeon, J. W., Lee, H. W., Park, Y., Seo, W. T., Oh, H. M., Katsuragi, T., Tani, Y. and Yoon, B. D. (2002).

Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, from Candida antarctica. **Biotechnology Letters**. 24 (3), pp. 225-229.

Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H. and Kawai, K. (2006). A novel crude oil emulsifier
extracted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. SM7. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 70 (2), pp. 254-259.
Saimmai, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. (2011). Molasses as a whole medium for biosurfactants production by
Bacillus strains and their application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 1 6 5 (1), pp. 3 1 5 - 335.
Saimmai, A., Tani, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. (2012). Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant producing bacteria. **Annals of Microbiology.** 62 (4), pp. 1669-1679.
Venables, W. N., Smith, D. M. and The R Development Core Team. (2009). **An Introduction to R.** Notes on R: A
Programming Environment for Data Analysis and Graphics Version 3.5.0. Retrieved 23 April-2018, from: http://cran.rproject.org.
Willumsen, P. A. and Karlson, U. (1 9 9 7 ). Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**. 7 (5), pp. 415-423.
Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V. and Fredrickson, H. L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**. 61 (5), pp. 1706-1713.