



## รายงานการวิจัย

การคัดเลือก สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต และสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถยับยั้ง *Phytophthora palmivora* (Butl) สาเหตุโรคน้ำดำในกล้วยไม้

Screening, optimization and characterization of biosurfactant inhibiting *Phytophthora palmivora* (Butl) causing black rot in orchids

ฉานิกา แซ่แง ชุกลิน Chanika Saenge Chooklin  
อทิพันธ์ เสียมไหม Atipan Seammai

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2561

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง การคัดเลือก สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต และสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่สามารถยับยั้ง *Phytophthora palmivora* (Butl) สาเหตุโรคน้ำดำในกล้วยไม้ใน ครั้งนี้ได้รับการ สนับสนุนงบประมาณ จากมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ใน ปีงบประมาณ 2561 การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาศักยภาพในการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl) สาเหตุโรคน้ำดำในกล้วยไม้ซึ่งปัจจุบัน เชื้อราเป็นศัตรูพืชที่สำคัญในการผลิตพืชเศรษฐกิจหลายชนิดโดยเฉพาะกล้วยไม้ การแก้ปัญหาโดยส่วนใหญ่ยังคงใช้สารเคมีในการป้องกันและทำลายเชื้อราดังกล่าว ซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้ผลิต ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม การศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการ ยับยั้งเชื้อราดังกล่าวจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อราก่อโรคโดยชีววิธีซึ่งเป็น มิตรกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รศ.ดร. ศุภศิลา มณีรัตน์ ที่ปรึกษาการ วิจัย ที่ได้ให้วิชาการความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้ ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้ทำรายงานขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

ณานิกา แซ่แง ชุกลิน  
สิงหาคม 2562



## การคัดเลือก สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต และสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ สามารถยับยั้ง *Phytophthora palmivora* (Butl) สาเหตุโรคน้ำดำในกล้วยไม้

ฉานิกา แซ่แง ชุกลิน<sup>1</sup> อทิพันธ์ เสียมไหม<sup>2</sup>

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างดิน น้ำและของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากจังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทยโดยใช้วิธี serial dilution method โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนจำนวน 231 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน น้ำและของเสียจำนวน 101 ตัวอย่าง พบว่า 85 ไอโซเลทสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จากการใช้วิธี oil displacement place test ในการตรวจสอบ และมี 30 ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยสามารถลดแรงตึงผิวและทำให้อิมัลชันเกิดการคงตัวได้ดี จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 30 ไอโซเลท โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด โดยสามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora palmivora* AI2 โดยมีวงใสการยับยั้ง 10.74 มิลลิเมตร เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 ไปเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนส่วน 16S rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Acinetobacter calcoaceticus* PA (KT878384) 100% จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 พบว่า การใช้อาหาร mineral salt medium ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงสุดเท่ากับ 46 มิลลินิวตันต่อเมตร ความสามารถในการคงตัวของอิมัลชันร้อยละ 54 และสามารถยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* AI2 ได้สูงที่สุดมีวงใสการยับยั้ง 17.50 มิลลิเมตร การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (เอทิลอะซิเตด) มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบได้ 0.94 กรัมต่อลิตร โดยมีค่า CMC ที่ 0.30 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และ Mass Spectroscopy (MS) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* CT 03 มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบโดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,088 m/z และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่า (MFC, Minimum Fungicidal Concentration) ต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora* เท่ากับ 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยวิธี detached leaf technique เปรียบเทียบเท่ากับการใช้สารยับยั้งเชื้อราทางการค้า (fosetyl-Al) ในกล้วยไม้สกุลมอศคาร่าและแคทลีย

ยา พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 1.12 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบเท่ากับการใช้สารยับยั้งเชื้อราทางการค้า

**คำสำคัญ:** สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เชื้อรา กล้วยไม้



---

<sup>1</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

<sup>2</sup> อาจารย์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

## Screening, optimization and characterization of biosurfactant inhibiting *Phytophthora palmivora* (Butl) causing black rot in orchids

Chanika Saenge Chooklin<sup>1</sup> Atipan Seammai<sup>2</sup>

### Abstract

In the present study, biosurfactant-producing bacteria from soil, water and waste from palm oil mill factories located in southern of Thailand were isolated by serial dilution method using palm oil as a sole carbon source. A total of 231 oil-utilizing bacteria were isolated from the 101 samples. Eighty five isolates were positive for biosurfactant production by oil displacement plate test and 30 isolates showed the promising of biosurfactant activity by surface tension reduction and emulsification activity. The antifungal activity of biosurfactant from 30 bacterial isolates on *Phytophthora palmivora* Al2 was investigated by agar well diffusion assay. Biosurfactant from isolate CT 03 showed the highest antifungal activity as 10.74 mm of inhibition zone. Isolate CT 03 was identified by 16S rRNA gene sequencing as *Acinetobacter calcoaceticus* with 100% similarity to *Acinetobacter calcoaceticus* PA (KT878384). The optimum condition for biosurfactant production by *A. calcoaceticus* CT 03 was obtained by cultivated in MSM containing 4% (w/v) of glucose as carbon source, 1% (w/v) of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as nitrogen source, initial pH of 7.0 at room temperature (30±3 °C) and shaking speed at 200 rpm. It showed the maximum surface tension reduction (46 mN/m), emulsification activity (54%) and antifungal activity against *P. palmivora* Al2 (17.50 mm of clear zone diameter) after 60 h of cultivation. Crude biosurfactant was extracted from the culture supernatant by using ethyl acetate can be considered as the best method with a yield of 0.94 g/l and critical micelle concentration (CMC) of 0.30 g/l. Moreover, structure elucidation of the obtained biosurfactant performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) and Mass Spectroscopy indicated that biosurfactant produced by *A. calcoaceticus* CT 03 consisted of amino acid and lipid with molecular mass of 1,088 m/z. Biosurfactant from *A. calcoaceticus* CT 03 exhibited the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MFC (Minimum Fungicidal Concentration) values of 0.28 and 0.56 mg/ml, respectively. The antifungal activity of biosurfactant were compared to commercial antifungal substance (fosetyl-Al) against orchid fungal pathogen in *Mokara* and *Cattleya* orchids.

The result reveals that there is no significant difference of antifungal activity between biosurfactant and commercial antifungal substance at concentration of 1.12 mg/ml

**Keyword:** Biosurfactant, Fungal, Orchids



---

<sup>1</sup> Department of Environmental, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang.

<sup>2</sup> Faculty of Agricultural Technology, Ratchapatt Phuket University



## สารบัญ

		หน้า
	กิตติกรรมประกาศ.....	ก
	บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
	สารบัญ.....	จ
	สารบัญตาราง.....	ช
	สารบัญภาพ.....	ญ
	บทที่	
1	บทนำ.....	1
	บทนำต้นเรื่อง.....	1
	ตรวจเอกสาร.....	2
	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	19
	ขอบเขตโครงการวิจัย.....	19
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	19
2	วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง.....	20
	วัสดุและอุปกรณ์.....	20
	วิธีการวิเคราะห์.....	20
	วิธีการทดลอง.....	21
3	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	30
	การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	30
	การแยกเชื้อรา <i>Phytophthora palmivora</i> (Butl).....	35
	การเทียบเคียงสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดแยกได้.....	37
	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Agar well diffusion assay.....	38
	การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลท CT 03.....	42
	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจาก <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03.....	44
	การศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03.....	51
	คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้.....	52

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้.....	55
4   สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	66
สรุปผลการวิจัย.....	66
ข้อเสนอแนะ.....	67
เอกสารอ้างอิง.....	68





## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ไอโซเลท แหล่งตัวอย่าง และแหล่งคาร์บอนที่สามารถเจริญได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที .....	29
2 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยง (surface tension reduction: SR) และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA).....	30
3 แสดงการเทียบเคียงลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 18S rRNA ของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์กับเชื้อราที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST .....	33
4 กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวและการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	36
5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03 .....	41
6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03 .....	42
7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03 .....	43
8 ผลของความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03 .....	44
9 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03 .....	45
10 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03 .....	46
11 เปรียบเทียบวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03.....	48
12 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่า (MFC, Minimum Fungicidal Concentration) เชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยวิธี agar diffusion assay.....	58
13 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำในกล้วยไม้สกุลมอศคาร่าและสกุลแคทลียา โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>A. calcoaceticus</i> CT 03.....	59

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ผลการตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี oil displacement place test; ก: ตัวควบคุมลบ (อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ); ข: ตัวอย่างที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	27
2 ผลการตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการเกิดอิมัลชันกับน้ำมัน; 1: ตัวควบคุมลบ (อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ); ข: ตัวอย่างที่มีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันกับน้ำมัน.....	31
3 ลักษณะอาการโรคเน่าดำ ในกล้วยไม้สกุลบอนเป็นมอคคาร่า (ก) และสกุลแคทลียา (ข-ง).....	32
4 ลักษณะของเชื้อรา <i>Phytophthora palmivora</i> (Butl.) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	32
5 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์และเชื้อราที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยการใช้โปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูลของ NCBI .....	34
6 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเชื้อราไอโซเลท AL1 (ก), AL2 (ข), AL3 (ค) AL4 (ง) บนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar ด้วยวิธี agar well diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7วัน.....	35
7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแถบเชื้อไอโซเลท CT 03 กับฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ).....	39
8 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 กับเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank .....	40
9 การเจริญเติบโต การผลิตและกิจกรรมการลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และมี (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที.....	47

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ <i>A. calcoaceticus</i> CT 03 (BS) และสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Tween 80).....	49
11	ผลของระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ <i>A. calcoaceticus</i> CT 03 (BS) และสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Tween 80).....	50
12	Fourier transform infrared spectroscopy spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>A. calcoaceticus</i> CT 03.....	51
13	Fourier transform infrared spectroscopy spectrum ของโปเปปไทด์ที่ผลิตจากเชื้อ <i>Bacillus simplex</i> .....	52
14	ไดอะแกรม Thermogravimetric ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ <i>A. calcoaceticus</i> CT 03.....	53
15	ไดอะแกรม Thermogravimetric ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ <i>Bacillus methylotrophicus</i> USTBa.....	53
16	ไดอะแกรม Differential scanning calorimetry ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ <i>A. calcoaceticus</i> CT 03.....	54
17	<sup>1</sup> H-NMR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>A. calcoaceticus</i> CT 03.....	55
18	<sup>13</sup> C-NMR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CT 03.....	55
19	<sup>1</sup> H-NMR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ซึ่งผลิตจากเชื้อ <i>Halobacteriaceae archaeon</i> AS65.....	66
20	<sup>13</sup> C-NMR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ซึ่งผลิตจากเชื้อ <i>Halobacteriaceae archaeon</i> AS65.....	Mass
21	spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>A. calcoaceticus</i> CT 03.....	57
22	การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำในกล้วยไม้สกุลมอศคาร่า (ก-ค) และสกุลแคทลียา (ง-ฉ) หลังการปลูกเชื้อ <i>P. palmivora</i> AI2 เป็นเวลา 7 วัน: (ก) และ (ง); น้ำกลั่น, (ข) และ (จ); สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, (ค) และ (ฉ); สารfosetyl-Al ความเข้มข้น 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	59

# บทที่ 1

## บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความสวยงามของดอกทั้งด้านรูปร่างและสีที่แปลกตา สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งในลักษณะของดอกสด ไม้กระถาง ไม้จัดแจกัน หรือการปลูกประดับทั้งต้น กล้วยไม้เป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช Product Champion เนื่องจากเป็นพืชที่ทำรายได้สูงและปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี จึงเป็นที่นิยมของเกษตรกรและมีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นจากการขยายพื้นที่เพาะปลูกทำให้มีปัญหาระบาดของโรคและแมลงศัตรูเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (จิตรพรพรณ, 2542) ในส่วนของโรคระบาดที่สำคัญของกล้วยไม้ที่ทำให้เกิดความเสียหายมากแก่กล้วยไม้ของเกษตรกรมีหลายโรคด้วยกัน เช่น โรคต้นเน่าแห้ง โรคแอนแทรคโนสหรือโรคเส้าเกสรดำ โรคใบจุดหรือโรคใบช้ำลาก โรคใบป็นเหลือง โรคดอกจุดสนิม โรคเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โรคที่เกิดจากไวรัส เป็นต้น นอกจากนี้โรคเน่าดำหรือโรคยอดเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl) ก็จัดเป็นโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่งของกล้วยไม้ในประเทศไทยและแหล่งปลูกกล้วยไม้ทั่วโลก สามารถเข้าทำลายกล้วยไม้ได้หลายสกุล เช่น กล้วยไม้ลูกผสม สกุลหวายแวนดา ทีเอ็มเอ แวนดาร์อชเชียนา อะแรนดาคริสติน อะแรนดานอร่า มอคคาร่า และแคทลียา และกล้วยไม้สกุลใกล้เคียง (ทัศนพร, 2545) การแก้ปัญหาของเกษตรกรโดยส่วนใหญ่มักใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ เมื่อใช้สารเหล่านี้ไปเป็นระยะเวลาหนึ่งจะพบว่าโรคพืชมีการติดต่อสารดังกล่าว ทำให้ต้องมีการเพิ่มปริมาณการใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชมากขึ้นเรื่อยๆ จึงเกิดการตกค้างและสะสมในสิ่งแวดล้อม การสะสมของสารดังกล่าวไม่เป็นที่ผลผลิต ดินหรือน้ำ ย่อมเป็นอันตรายทั้งสิ้น เนื่องจากสารเคมีสังเคราะห์เหล่านี้ย่อยสลายได้ยากหรือใช้เวลานานในการสลายตัวในธรรมชาติ เป็นเหตุให้เกิดการเสียสมดุลในธรรมชาติและเกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำเมื่อสารเหล่านี้ถูกชะลงแหล่งน้ำ ซึ่งมลภาวะเช่นนี้เป็นปัญหาของทั่วโลกที่กำลังรอการแก้ไขอย่างรีบด่วน ดังนั้นจึงมีการคิดค้นสารที่ได้จากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช โดยเชื่อว่าสารเหล่านี้จะถูกสลายตัวได้ง่ายกว่า และมีความเป็นพิษต่อมนุษย์น้อยกว่าสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มจึงให้ความสนใจและความสำคัญในงานวิจัยด้านนี้มากขึ้นเรื่อยๆ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) คือสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิต โดยส่วนใหญ่แล้วมาจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียซึ่งมีความสามารถในการทำให้แรงตึงผิวของของเหลวลดลง ช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวสองชนิดหรือระหว่างของเหลวกับของแข็ง ช่วยให้อิมัลชันคงตัวอยู่ได้นานขึ้น จากรายงานพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์นั้นมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial) ไวรัส (antivirus) เซลล์มะเร็ง (anticancer) และเชื้อรา (antifungal) เป็นสารกระตุ้นหรือกดระบบภูมิคุ้มกัน (immune suppressants or immune modulators) อีกทั้งแบคทีเรียยังสามารถควบคุมสภาวะในการเลี้ยงได้ง่ายและสามารถใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูก เช่น วัสดุ เศษเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตร โรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร หรือน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ ในการ



เจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงจัดได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียมีศักยภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ได้ โดยสามารถที่จะนำมาทดแทนการใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ นอกจากนี้เป็นการช่วยลดมลภาวะอันเนื่องมาจากสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมแล้วยังสามารถช่วยในการบำบัดวัสดุเศษเหลือ ของเสีย หรือน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรได้อีกทางหนึ่งด้วย

## ตรวจเอกสาร

### 1. กล้วยไม้และความสำคัญทางเศรษฐกิจ

กล้วยไม้จัดอยู่ใน Family Orchidaceae ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุด และมีวิวัฒนาการมากที่สุดในบรรดาพืชไม้ดอกทั้งหมด คาดว่ากล้วยไม้มีอยู่ประมาณ 17,000 ถึง 19,000 ชนิด และสามารถพบได้ทั่วโลก เนื่องจากการปรับตัวเองเพื่อให้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมนั้นๆ กล้วยไม้สามารถแบ่งออกเป็นสองประเภทตามสภาพที่พบตามธรรมชาติ คือ กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) และกล้วยไม้อิงอาศัย (epiphyte orchids) (จิตรภาพรรณ, 2542) กล้วยไม้เป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช Product Champion เนื่องจากเป็นพืชที่ทำรายได้สูงและปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี จากข้อมูลการส่งออกกล้วยไม้ที่มีใบรับรองปลอดศัตรูพืชของงานมาตรฐานและบริการตรวจพืช กองควบคุมพืช และวัสดุการเกษตร ในปี พ.ศ. 2543 มีมูลค่า 1,765 ล้านบาท และในปี 2544 มีมูลค่าสูงขึ้นเป็น 1,806 ล้านบาท ตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี และอเมริกา ดังนั้นกล้วยไม้จึงเป็นไม้ตัดดอกชนิดหนึ่งที่มีความสนใจจากทั่วโลก เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการปลูก กล้วยไม้เมืองร้อน และสามารถส่งออกได้เป็นอันดับ 1 ของโลก จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2543-2548 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2548) รายงานว่าปี พ.ศ. 2543 ประเทศไทยมีพื้นที่ เพาะปลูกกล้วยไม้ ประมาณ 14,319 ไร่ และเพิ่มขึ้นเป็น 15,000 ไร่ ในปี พ.ศ. 2545 ผลผลิต กล้วยไม้สกุลหวายจากงานวิจัยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 2,160-2,520 กิโลกรัมต่อไร่ และผลผลิตของ เกษตรกรมีปริมาณ 1,930 กิโลกรัมต่อไร่โดยแหล่งปลูกที่สำคัญร้อยละ 34.5 อยู่ในเขตของ กรุงเทพมหานคร ร้อยละ 29.5 อยู่ในจังหวัดนครปฐม อีกร้อยละ 20 อยู่ในจังหวัดสมุทรสาคร และที่เหลือร้อยละ 16 อยู่ในจังหวัดอื่นๆ กล้วยไม้ที่นิยมปลูกเพื่อตัดดอกมากที่สุด คือ กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม ซึ่งมีดอกสีขาว ม่วงอ่อน ม่วงเข้ม รวมกันมากกว่า 50 ชนิด เช่นพันธุ์ *Dendrobium* Walter Oumae, *Dendrobium* Sonia 'Bom' เบอร์ 17, 28 และพันธุ์กลายจากพันธุ์นี้หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Dendrobium* Ekapol, *Dendrobium* Sabin ส่วนกล้วยไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกรองลงมา คือ สกุลออนซิเดียม (*Oncidium* spp.), แวนด้า (*Vanda* spp.), อะแรนด้า (*Aranda* spp.) และมอคคาร่า (*Mokara* spp.) เป็นต้น

การปลูกกล้วยไม้เพื่อการตัดดอกสดส่งออกนั้น จำเป็นต้องผลิตให้ได้ดอกที่มีคุณภาพดี บานทน และมีลักษณะสดใส ตรงกับความต้องการของผู้ซื้อในตลาดต่างประเทศ ซึ่งได้แก่ประเทศญี่ปุ่น อิตาลี เยอรมัน สหรัฐอเมริกา เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส เป็นต้น ประเทศดังกล่าวล้วนแต่เป็นประเทศที่มีฐานะทางเศรษฐกิจดี มีความสามารถในการซื้อสูง สามารถซื้อสินค้าได้แม้ว่าสินค้านั้นจะมีราคาแพง เนื่องจากเป็นการซื้อด้วยความพึงพอใจ เพื่อนำไปให้เป็นของขวัญ หรือนำไปใช้เอง ดังนั้นสินค้าต่างๆ รวมทั้งสินค้าผลิตผลเกษตรที่มีคุณภาพดี มีความงามและแปลกจึงขายง่ายได้ราคาดี

สำหรับการส่งออกกล้วยไม้สดจากประเทศไทยไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2500 และพบว่ากล้วยไม้ไทยเป็นที่นิยมและต้องการของตลาดต่างประเทศ (จิตรพรพรรณ, 2542) เริ่มมีการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกอย่างจริงจังประมาณปี พ.ศ. 2508 ในระยะ 5-6 ปีแรก การส่งออกมีมูลค่าไม่เกิน 3 ล้านบาทต่อปี และช่วงปี พ.ศ. 2514-2516 มูลค่าการส่งออกเริ่มสูงขึ้นเป็น 10-40 ล้านบาท ปริมาณการส่งออกกล้วยไม้ไทยมีการเติบโตมาเป็นลำดับ เช่นในปี พ.ศ. 2523 กล้วยไม้ตัดดอกมีมูลค่าการส่งออกประมาณ 400 ล้านบาท (ฝ่ายกักกันพืช, 2543) และจากนั้น ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ของไทยเพิ่มสูงมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้กล้วยไม้เริ่มมีบทบาทต่อการเกษตรและธุรกิจการส่งออกกลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยอีกชนิดหนึ่ง ปี พ.ศ. 2542 ประเทศไทยสามารถส่งออกดอกกล้วยไม้สดได้ในปริมาณมากกว่า 13,125 ตัน และคิดเป็นมูลค่ากว่า 1,000 ล้านบาท ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 ปริมาณการส่งออกดอกกล้วยไม้สดคือ 11,778 ตัน มีมูลค่า 1,231.23 ล้านบาท ปัจจุบันในปี พ.ศ. 2547 พบว่ามีการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอก มีปริมาณมากถึง 18,626 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,136.06 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) นอกจากการส่งออกกล้วยไม้ในลักษณะของดอกกล้วยไม้สดแล้วยังมีการส่งออกกล้วยไม้ในลักษณะของต้นกล้วยไม้ เช่นในปี พ.ศ. 2542 มีการส่งออกต้นกล้วยไม้เป็นปริมาณทั้งหมดจำนวน 24,750,306 ตัน มีมูลค่า 295,292,562 บาท (ฝ่ายกักกันพืช, 2543) ดังนั้นในภาพรวมของการผลิตและการส่งออกดอกกล้วยไม้สดที่ผลิตได้ในประเทศ พบว่ามีการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศมากถึงร้อยละ 52 ของปริมาณที่ผลิตได้ ส่วนดอกกล้วยไม้ที่เหลือจากการส่งออกนั้นเป็นการใช้ภายในประเทศในลักษณะของดอกสดมัดช่อ แจกัน หนีด การร้อยมาลัย และงานประดิษฐ์อื่นๆ

## 2. ลักษณะของเชื้อ *Phytophthora* spp.

*Phytophthora* spp. เป็นราน้ำ (water mold) จัดอยู่ในอาณาจักร Stramenopila และ ไฟลัม Oomycota ซึ่งมีลักษณะสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสาหร่ายกลุ่มเฮเทโรคอนท์ (heterokont) เช่น สาหร่ายสีน้ำตาลทองและไดอะตอมมากกว่ารา (Ristaino and Gumberz, 2000) โครงสร้างมีลักษณะเป็นเส้นใยเป็นท่อกลวงไม่มีผนังกัน มีโคโมโซมสองชุด ยกเว้นในเซลล์สืบพันธุ์มีชุดเดี่ยว ขนาดของ จีโนม (Genome) ประมาณ 50-250 ล้านเบส ผนังเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลส ( $\beta$ -1,4-linked glucose) และพอลิเมอร์ของกลูโคสต่อกันแบบ  $\beta$ -1,3 และ  $\beta$ -1,6 ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเป็นอับสปอร์ (sporangium) เดี่ยว มีหลายนิวเคลียส ซึ่งจะปล่อยซุโอสปอร์ (Zoospore) ที่เป็นสปอร์แบบไม่อาศัยเพศมีหนวดสองเส้น เคลื่อนที่และแพร่กระจายแบบอาศัยน้ำเป็นตัวพา นอกจากนี้ยังสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศชนิดโอโอสปอร์ และสามารถพักตัวอยู่ในดินในรูปคลาไมโดสปอร์ได้นานหลายปีด้วย (Judelson and Blanco, 2005)

สปอร์ของรา *phytophthora* spp. สามารถพักตัวอยู่ในดินในรูปคลาไมโดสปอร์ได้เป็นระยะเวลานาน เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม สปอร์จะงอกเป็นเส้นใย และสร้างอับสปอร์ที่สามารถปล่อยซุโอสปอร์ที่มีหนวดสองเส้น ซึ่งเคลื่อนที่ในน้ำเข้าไปในพืชอาศัยและทำลายพืชนั้นได้โดยตรง การแพร่กระจายอาจเกิดโดยทางอ้อม เช่น เส้นใยรา หรืออับสปอร์ถูกลมหรือฝนพัดพาไปยังแหล่งเพาะปลูกอื่น ติดไปกับดินปลูกหรือกิ่งพันธุ์ เป็นต้น รากลุ่มนี้เป็นสาเหตุของโรครากเน่า โคนเน่า ไบร่รง และรอย



ใหม่ขของพืชหลายชนิด เช่น ยางพารา อาโวคาโด มะม่วง วานิลลา มะเขือเทศ สับปะรด มะละกอ ส้ม ทุเรียน และกล้วยไม้ เป็นต้น (Ristaino and Gumpertz, 2000)

### 3. โรคเน่าดำ (Black rot) ในกล้วยไม้จากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.)

โรคเน่าดำในกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.) นี้มีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1924 ที่ประเทศศรีลังกาและฟิลิปปินส์ในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* sp. และ *Phalaenopsis Aphrodite* (Gadd, 1924) ต่อมา มีรายงานเกิดโรคในกล้วยไม้สกุล *Angraecum*, *Aranda*, *Brassavola*, *Cattleya*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Gongora*, *Grammatophyllum*, *Oncidium*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*, *Rhodriguezia*, *Spathoglottis*, *Vanda* และ *Vanilla* ที่ประเทศชวา สิงคโปร์ และสหรัฐอเมริกา จากรายงานพบว่าในกล้วยไม้สกุล *Cattleya* และ *Vanda* นั้นพบว่าเกิดโรคได้ง่ายและรุนแรง (Uchida and Aragaki, 1991) สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบโรคนี้ระบาดในกล้วยไม้ในปี พ.ศ. 2517 โดยพบในกล้วยไม้ลูกผสมแวนดาเป็นส่วนใหญ่และยังพบในกล้วยไม้สกุล *Aranda Cristine*, *A. Wendy Scott*, *Assocenda Meda Arnold*, *A. Samrit*, *Cattleya*, *Dendrobium Pompadour*, *Oncidium*, *Vanda Coerulea*, *V. Aurawan*, *V. Rothschildiana*, *V. Onomia*, *V. T.M.A.* และ *V. Tan chin Tuan* (พิบูลย์, 2517) นอกจากนี้ในกล้วยไม้แล้วยังพบว่าเชื้อรา *P. palmivora* (Butl.) สามารถทำลายพืชได้มากกว่า 138 ชนิด เช่น พืชตระกูลหอม มะละกอ ส้ม ฝ้าย ทุเรียน ยางพารา อะโวคาโด โกโก้ ฯลฯ ความเสียหายจากการเข้าทำลายอาจมีความแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อม และชนิดของพืช (รัชนี, 2552)

ลักษณะอาการของโรคพบได้โดยทั่วไปในทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกส่วนของกล้วยไม้ เช่น ยอด ใบ ลำต้น ดอก และราก (ทัศนพร, 2545) อาการและความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันตามบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายและระดับความรุนแรงของการติดเชื้อ ตัวอย่างเช่น

อาการที่บริเวณยอดเป็นบริเวณที่มักพบการติดเชื้ออยู่เสมอเนื่องจากลักษณะทางกายภาพที่มีลักษณะอ่อนนิ่ม ลักษณะการติดเชื้อมักเริ่มจากพบได้เสมอโดยเริ่มจากโคนหรือปลายใบหรือยอดที่เกิดลักษณะการฉ่ำน้ำหรือเน่าดำ (water-soaked) เกิดผิวเป็นมัน โดยบริเวณที่ถูกทำลายจะเกิดเนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม หากทิ้งไว้จะเปลี่ยนเป็นแผลแห้งดำ และตายทั้งต้นในที่สุด บางครั้งอาจพบว่ามีอาการเหลืองเกิดร่วมในบริเวณยอดที่เน่าดำด้วยและถ้าเชื้อเข้าทำลายรุนแรงจะลามเข้าสู่ลำต้น เมื่อจับยอดจะหลุดติดมือออกมาโดยง่าย (Cahill et al., 2008)

อาการที่บริเวณใบ ลักษณะของการติดเชื้อจะเริ่มจากใบเกิดมีจุดใส ฉ่ำน้ำ (water-soaked) แล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนแล้วค่อยๆ เข้มขึ้นจนเป็นสีดำในที่สุด โดยอาจมีบริเวณสีเหลือง รอบแผลเน่าสีดำในสภาพความชื้นสูงเชื้อราจะมีการสร้างเส้นใยของ sporangium และ chlamydospore บนแผลที่เน่าดำนั้น (Cahill et al., 2008)

อาการที่บริเวณต้น หรือ ลำลูกกล้วย พบว่าอาการที่เกิดกับต้นจะเกิดจากการแพร่ระบาดของเชื้อจากส่วนยอด และใบ ทำให้เกิดอาการเน่าดำ ซึ่งจะทำให้ใบเหลืองหลุดร่วงในระยะต่อมา เมื่อผ่าดูภายในลำต้นจะเห็นเป็นแผลสีดำหรือน้ำตาลเข้มตามแนวยาวของลำลูกกล้วย โดยเฉพาะกล้วยไม้ที่อยู่ในระยะกล้า ซึ่งถ้าเชื้อเข้าทำลายขณะที่ต้นยังเล็กจะเกิดจุดแผลสีดำ จากนั้นก็เปลี่ยนเป็นแผลขนาดใหญ่สีน้ำตาลและลำลูกกล้วยจะเริ่มแห้งตาย (Cahill et al., 2008) กรณีที่เชื้อเข้าทำลายทางโคนต้นใบจะเหลืองและร่วงจากโคนต้นขึ้นไปหาส่วนยอดเรื่อยๆ เกษตรกรจะเรียกว่า “โรคแก้ผ้า” (นิยมรัฐ, 2541)

อาการที่ดอก กลีบดอกจะเป็นจุดฉ่ำน้ำและเปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาลในกล้วยไม้สกุลหวายพบว่าปากดอกและก้านดอกจะเหี่ยวเป็นสีน้ำตาล อาการรุนแรงดอกจะหลุดร่วงจากช่อดอก ในดอกตูมขนาดเล็กจะเน่าและดอกหลุดจากก้านช่อ (Ersek and Ribeiro, 1996)

อาการที่ก้านช่อดอก เมื่อเชื้อเข้าทำลายตรงก้านช่อดอก พบแผลเน่าดำ และก้านช่อดอกจะหักพับในที่สุด (Ersek and Ribeiro, 1996)

อาการที่ราก เมื่อเชื้อเข้าทำลายจะทำให้รากหยุดการเจริญ พบแผลสีดำเน่าแห้งแล้วค่อยๆ ยุบตัวลง ถ้าเป็นบริเวณกลางหรือโคนรากจะมีอาการเหี่ยวพับเนื้อเยื่อยุบตัวลงเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นดำและเชื้อจะลุกลามเข้าสู่ลำต้น (Ersek and Ribeiro, 1996)

#### 4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประกอบ amphipathic ที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขี้ (hydrophilic head group) และส่วนที่ไม่มีขี้ (lipophilic tail) มีสมบัติของการเป็นสารลดแรง- ตึงผิว (surface active agent) หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsifying agent) สามารถพบได้ในธรรมชาติ ทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Banat et al., 2010)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งส่วนที่ชอบน้ำจะมีทั้งที่เป็นประจุ และไร้ประจุ และประกอบไปด้วยหมู่ของ โมโน (mono-), ได (di-), หรือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), หมู่คาร์บอกซิลิก, กรดอะมิโน และเปปไทด์ ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และกรดไขมันแอลกอฮอล์ (Lang, 2002) โดยคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ความสมดุลระหว่างส่วนที่มีขี้และส่วนที่ไม่มีขี้ และจากสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน จึงสามารถช่วยให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ง่ายขึ้น เนื่องจากจะไปช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้

##### 4.1 การจัดกลุ่มสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มต่างๆ โดยอาศัยความแตกต่างของโครงสร้างโมเลกุลโดยทั่วไปจะแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีส่วนที่ชอบน้ำประกอบด้วย กรดอะมิโน หรือ เปปไทด์, หมู่โมโน-, ได-, หรือโพลีแซคคาไรด์ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

##### ไกลโคลิปิด (Glycolipid)

เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับ long-chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids โดยการเชื่อมหมู่อีเทอร์และเอสเทอร์ ไกลโคลิปิดที่รู้จักกันดี คือ rhamnolipids, trehalolipids and sophorolipids

##### ลิโปเปปไทด์และลิโปโปรตีน (Lipopeptides and lipoproteins)

เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประกอบด้วยเปปไทด์หรือกรดอะมิโน ส่วนใหญ่พบในกลุ่มของ cyclic lipopeptides ประกอบด้วย decapeptide antibiotics (Gramicidins) และ lipopeptides antibiotics (Polymyxins) สารในกลุ่มนี้จะมีไขมันจับอยู่กับสายโพลีเปปไทด์

##### ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids)

ฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยลิปิดและฟอสเฟตเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดกรดไขมันและฟอสโฟลิปิด เมื่อใช้ *n*-alkanes เช่น phosphatidylethanolamine จาก *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N สามารถทำให้เกิดอิมัลชันของ alkanes ในน้ำ phosphatidylethanolamine ผลิตได้จาก *Rhodococcus erythropolis* ที่เจริญในอาหารที่มี *n*-alkanes สามารถลดแรงตึงผิวระหว่างผิวน้ำและ *n*-hexadecane ให้มีค่าน้อยกว่า 1 มิลลินิวตันต่อเมตร และ CMC เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (Singer et al., 1985)

โพลีเมอร์ชีวภาพ (Polymeric biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอร์ที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย คือ emulsan, liposan, alasan, lipomanan และ polysaccharide protein complex ชนิดอื่น ๆ *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวออกภายนอกเซลล์เป็นสารประกอบของ polyanionic amphipathics heteropolysaccharide ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี Emulsan สามารถเกิดอิมัลชันไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพในกรณีกับไฮโดรคาร์บอนในน้ำเมื่อใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.001 ถึง 0.01% Liposan เกิดภายนอกเซลล์ โดย *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนร้อยละ 83 และ 17 ตามลำดับ

4.2 สมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน เช่น ไกลโคลิปิด ฟอสโฟลิปิด กรดไขมัน และ นิวทรัลลิปิด สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์ ลิโปโปรตีน และลิโปเปปไทด์ ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละกลุ่มมีสมบัติและหน้าที่ที่หลากหลายแตกต่างกัน

สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวัดค่าแรงตึงผิวเป็นวิธีการเบื้องต้น สำหรับการวัดกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยที่น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะมีค่าแรงตึงผิวน้อยลงเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบผลของกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวค่อนข้างยาก ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์และสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ทั้งชนิดและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พิเอช การให้อากาศ เป็นต้น (Banat et al., 2010)

กิจกรรมการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเกลือในส่วนของ aqueous phase ตัวอย่างเช่น สารไกลโคลิปิด จาก *Torulopsis apicola* ไม่สามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวได้เมื่อมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง ในขณะที่น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* JF-2 สามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวได้ เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ซึ่งให้ค่าที่ดีกว่าการเติมเกลือแคลเซียม (Folmsbee et al., 2006)

หน้าที่ทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติที่สำคัญต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่ผลิตทั้งการนำสารเข้าสู่เซลล์หรือการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างจุลินทรีย์และผู้ให้อาศัย (microbe-host interaction) หรือการเป็น biocide ซึ่งหน้าที่ดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องกับความเป็นสาร amphipathic ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การที่จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาจะทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการสลายเพิ่มขึ้น และมีการเกิดอิมัลชันเพิ่มขึ้น เพิ่มการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้จุลินทรีย์



สามารถเจริญเติบโตบนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ง่าย โดยการลดแรงดึงผิวรอบๆบริเวณเซลล์ กระบวนการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์นั้นโดยการทำให้สารประกอบเข้าสู่เซลล์และ กระบวนการเกิดเมทาบอลิซึมได้ง่ายขึ้น

นอกจากนี้กระบวนการหรือหน้าที่ทางกายภาพอื่นๆ ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ คือ การมีสมบัติ ของการเป็นสาร antibiotic ต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรีย และเชื้อรา (Shekhar et al., 2015)

#### 4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารที่เหมาะสมแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นพลังงานในกิจกรรม ต่างๆและใช้ผลิตสารตั้งต้นในกระบวนการสลายพลังงานเพื่อนำไปผลิตสารประกอบที่เซลล์ต้องการในการ เจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

สูตรอาหารส่วนใหญ่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ นอกจากนี้สูตร อาหารที่เหมาะสมแล้วยังมีสภาวะอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศ เป็นต้น

4.3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source) แหล่งคาร์บอนสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงดึงผิว ชีวภาพ แหล่งคาร์บอนที่ใช้มีทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ชนิดที่ละลายน้ำ เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอลและเอทานอล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น *n*-alkanes และน้ำมันมะกอก แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลด แรงดึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตจึงมีผลต่อคุณภาพและ ปริมาณของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเป็นอย่างมาก (Abouseoud et al., 2008)

##### - แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ

Das และคณะ (2009) ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ กลีเซอรอล แป้ง กลูโคสและ ซูโครส ที่มีผลในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล คือ *B. circulans* พบว่า การใช้ กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวได้สูงสุดในปริมาณใกล้เคียง กัน คือ 1.16 กรัมต่อลิตรและ 0.94 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก เชื้อ *B. subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง ความ เข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนเติม ยูเรีย ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิต สารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

Hayder และคณะ (2014) ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยเชื้อ *Streptomyces* sp. SS20 ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ โซลิส แมนนิทอล กลูโคส มอล โตส ซูโครส กลีเซอรอลและแป้ง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. SS20 สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอน ทุกชนิดและเจริญได้ดีที่สุด 19 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Streptomyces* sp. SS20 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ในทุกแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองและให้กิจกรรมการลดแรง ดึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดหลังจากการวัดที่เวลา 48 ชั่วโมงเมื่อใช้ซูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

Noparat และคณะ (2014) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Ochrobactrum anthropi* 2/3 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำได้ชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลทราย กลูโคส กลีเซอรอล กากน้ำตาล และกากดีแคนเตอร์ พบว่าการใช้กากดีแคนเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *O. anthropi* 2/3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุด 4.25 กรัมต่อลิตร หลังจากเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการขยาย 150 รอบต่อนาที

- แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ

Fagade และคณะ (2009) ศึกษาการใช้ไขมันดิบ น้ำมันปาล์ม น้ำมันดีเซลและน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus* สปีชีส์ต่างๆ ได้แก่ *B. sphaericus* BS 01, *B. subtilis* BS 03, *B. sphaericus* BS 04, *B. subtilis* BS 58, *B. pumilus* BS 66, *B. licheniformis* BS 69, *B. subtilis* BS 73 และ *B. licheniformis* BS 102 ที่แยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน โดยใช้อาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *B. sphaericus* BS 01, *B. subtilis* BS 03, *B. sphaericus* BS 04, *B. pumilus* BS 66, *B. licheniformis* BS 69, *B. subtilis* BS 73 และ *B. licheniformis* BS 102 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า  $E_{24}$  อยู่ที่ร้อยละ 30-55 และเชื้อ *B. subtilis* BS 58 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันดิบหรือน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า  $E_{24}$  เท่ากับร้อยละ 50

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนเติม ยูเรีย ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

Saimmai และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral salt medium ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำได้แก่ น้ำมันปาล์มใช้แล้ว น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว และน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 0.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

Silva และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Pseudomonas* 5 สปีชีส์ ได้แก่ *P. cepacia*, *P. acidovorans*, *P. picketti* และ *P. fluorescens* เลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันพืชใช้แล้วและของเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตร ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *P. cepacia* CCT6659 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ร่วมกับ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม โดยสามารถลดแรงตึงผิวจากอาหาร

เลี้ยงเชื้อจาก 58 เป็น 27.57 มิลลิวัตตันต่อเมตร และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 5.2 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง

ปัจจุบันมีการตระหนักถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีเพราะสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีสามารถทำลายสิ่งแวดล้อมได้ ถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่ถูกต้อง และมีการนำสารลดแรงตึงผิวผิดประเภทมาใช้ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากแบคทีเรียเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมส่งผลให้ความต้องการใช้เพิ่มมากขึ้นและอาจสามารถเข้ามาแทนที่สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีได้ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ด้วยเหตุนี้ผลของแหล่งคาร์บอนจึงเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรีย ซึ่งการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ดีจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูง รวมถึงทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเศษเหลือจะทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง ซึ่งอาจจะช่วยให้สามารถแข่งขันกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีได้

4.3.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์

- แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen)

Gnanamani และคณะ (2010) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ beef extract, ยีสต์สกัดและเปปโตเน เดิมในอาหาร mineral medium ใช้น้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากน้ำทะเลตะกอนป่าชายเลน หอยและทรายบริเวณชายหาดในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลต ESW Na12s สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นจาก 72 มิลลิวัตตันต่อเมตร เหลือ 25 มิลลิวัตตันต่อเมตร

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน คือ ยูเรีย, เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน, beef extract, ยีสต์สกัด หรือเคซีนไฮโดรไลเซท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่มีกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chooklin และคณะ (2014) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ เนื้อวัวสกัด ยีสต์สกัด ยูเรีย ผงชูรส และเปปโตเน เดิมในอาหาร mineral medium ใช้ผงแป้งจากเมล็ดขนุนร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Deinococcus caeni* PO5 พบว่าเชื้อ *D. caeni* PO5 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 72 มิลลิวัตตันต่อเมตร เหลือ 43 มิลลิวัตตันต่อเมตร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



- แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen)

Younis และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *Bacillus subtilis* KO เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  หรือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก พบว่าเชื้อ *B. subtilis* KO ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 7.41 กรัมต่อลิตรเมื่อเติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เป็นแหล่งไนโตรเจน

Aparna และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus clausii* 5B ที่แยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม เลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ยีสต์สกัด, เปปโตน,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ยูเรียหรือ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อ *B. clausii* 5B สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 2.41 กรัมต่อลิตร เมื่อเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เป็นแหล่งไนโตรเจนและสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 53.56 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 29.48 มิลลินิวตันต่อเมตร

Saimmai และคณะ (2013) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  และ  $(\text{NH}_4)\text{Cl}$  ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 ปรับพีเอชเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเติม  $\text{NaNO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุดจาก 71.08 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 44.64 มิลลินิวตันต่อเมตร และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ 1.91 กรัมต่อลิตร

4.3.3 แร่ธาตุ (mineral source) ปกติจะมีการเติมแร่ธาตุลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการสร้างหรือเป็นองค์ประกอบของสารที่จำเป็นในการดำรงชีวิต แร่ธาตุสำคัญ เช่น ซัลเฟตและฟอสเฟต จุลินทรีย์ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน แร่ธาตุนอกจากจะเป็นปัจจัยที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโตแล้วยังมีผลในการยับยั้งหรือกระตุ้นการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

Wei และคณะ (2007) ศึกษาผลของการใช้แร่ธาตุ 5 ชนิดเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  และ  $\text{Ca}^{2+}$  ต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็นอาหารที่มีแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด ทำการทดสอบผลของแร่ธาตุแต่ละตัวต่อการผลิต surfactin โดยไม่เติมแร่ธาตุที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม  $\text{K}^+$  เชื้อมีการเจริญและการผลิต surfactin จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม  $\text{Mg}^{2+}$  เชื้อจะไม่ผลิต surfactin เลย แสดงว่า  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{K}^+$  ส่งผลต่อการผลิตอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นศึกษาปริมาณและอัตราส่วนระหว่างแร่ธาตุทั้งสองต่อการผลิต surfactin พบว่าเมื่อใช้ปริมาณและอัตราส่วนของ  $\text{Mg}^{2+}$  ต่อ  $\text{K}^+$  3:1 เชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 สามารถผลิต surfactin เพิ่มเป็นสองเท่า แสดงว่าปริมาณ  $\text{Mg}^{2+}$  ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อควรเป็น 3 เท่าของปริมาณ  $\text{K}^+$  ขณะเดียวกันเมื่อดูผลของอัตราส่วนที่เท่ากันของ  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{K}^+$  เช่นที่อัตราส่วน 1:1, 2:2, 3:3 จะให้ผลผลิตต่างกันแสดงว่าปริมาณเป็นตัวแปรสำคัญในการผลิต surfactin โดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 เช่นกัน

4.3.4 พีเอช (pH) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมและการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลกระทบจากค่าพีเอช โดยทั่วไปค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ราและยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่มีค่าเป็นกลาง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรืออัลคาไลน์อื่นๆ ออกมาทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงขึ้น (Park and Lee, 1998; Nagal and Jain, 2010) แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะเกิดการกรดขึ้นทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (Zhao et al., 2009) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์

Najafia และคณะ (2010) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus mycoide* ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่พีเอชในช่วง 5-9 และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่พีเอช 7.37 สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดที่ 34 มิลลิวัตตันต่อเมตร

El-sersy (2012) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* N10 เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่พีเอช 5-9 ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* N10 เจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 โดยให้ค่า EA สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 86 แต่เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 6 พบว่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวจะลดลงอย่างรวดเร็ว

4.3.5 อุณหภูมิ (temperature) จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน ถ้าจุลินทรีย์เจริญในอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเจริญได้เร็วและอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย เชื้อ *Bacillus subtilis* N10 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า EA มากกว่าร้อยละ 80 (El-sersy, 2012) เป็นต้น

Abushady และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต surfactin จาก *Bacillus subtilis* BBk 1 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ  $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียสตามลำดับ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิต surfactin สูงสุดเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ผลผลิต surfactin ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึง 55 องศาเซลเซียสเชื้อจะไม่มีการผลิต surfactin

Gogotov และ Miroshnikov (2009) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* VKM B-511 ที่เลี้ยงในอาหาร mineral medium ใช้ kerosene ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักและ  $\text{NaNO}_3$  เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรและให้ค่าความสามารถในการคงตัวของอิมัลชันเท่ากับร้อยละ 41

4.3.6 การกวนและการให้อากาศ (agitation and aeration) การกวนและการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอยสามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น (Desai and Banat, 1997) ส่วนการกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ช่วยลดขนาดของฟองอากาศให้เล็กลงทำให้มีผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับจุลินทรีย์มากขึ้น

Yeh และคณะ (2006) ศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าการกวนที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่ระดับ 1.5 vvm อัตราการผลิต surfactin สูงสุดที่ระดับ 190 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Fonseca และคณะ (2007) ศึกษาผลของการกวนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาลทราย ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เขย่าด้วยความเร็วรอบต่างกันคือ 50, 150 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 และ 150 รอบต่อนาทีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 66 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 39-40 มิลลินิวตันต่อเมตร แต่เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นเป็น 250 รอบต่อนาที สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้นจาก 66 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 35 มิลลินิวตันต่อเมตร

## 5. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถผลิตได้จาก 2 กระบวนการผลิต คือ กระบวนการหมักโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ และกระบวนการเปลี่ยนรูปแบบทางชีวภาพ (biotransformation) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยทั่วไปมักจะมีค่าความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นกระบวนการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิว (drownstream process) จะเป็นขั้นตอนที่มีค่าใช้จ่ายมากที่สุดของกระบวนการผลิตบางครั้งอาจสูงถึงประมาณร้อยละ 60 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด

การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักจะให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ตัวอย่างเช่น การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Corynebacter lepus* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตร้อยละ 20-25 ปัจจัยที่สำคัญในการสูญเสียผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม ถ้าเก็บเกี่ยวได้ผลผลิตร้อยละ 30-50 จะสามารถลดค่าใช้จ่ายสองหรือสามเท่าของต้นทุนทั้งหมด (Kosaric, 2001) ดังนั้นการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ จึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงราคา ความคุ้มค่า และความเหมาะสมกับลักษณะงานที่ต้องนำไปใช้ต่อไป เนื่องจากจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาในความเข้มข้นที่ไม่สูงมากนัก



ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีหลายปัจจัยซึ่งจะมีผลต่อต้นทุนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ เช่น ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากการหมัก ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำหมัก (pH, viscosity และ complexity) ลักษณะของผลิตภัณฑ์ (น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการละลาย ประจุ สารที่อยู่ภายในเซลล์ หรือ หลั่งออกมานอกเซลล์) ผลผลิตที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ และความง่ายในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ต้นทุนในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวสามารถลดลงโดยเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์

วิธีส่วนใหญ่ที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกรณีที่เป็นการเก็บเกี่ยวแบบกะ (batch recovery) เช่น ตกตะกอนด้วยกรด (acid precipitation) สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction) การตกผลึก (crystallization) ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) วิธีการเก็บเกี่ยวเหล่านี้สามารถนำคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ประโยชน์ เช่น surface activity หรือ ความสามารถในการเกิดไมเซลล์ หรือ vesicles

โดยปกติการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายที่ใช้ประกอบด้วย chloroform-methanol และ dichloromethane-methanol, butanol, ethyl acetate, pentane และ hexane

Trehalose lipid ผลิตได้หลายชนิดจาก *Mycobacterium* spp. และ *Arthrobacter paraffineus* trehalose corynomycolates และ tetraesters ผลิตจาก *Rhodococcus erythropolis*, mono-, di- และ penta-saccharide lipids ของ *A. paraffineus* และ *N.corynebacterioids*, cellobiose lipids ผลิตจาก *Ustilago* spp., sophorolipid จาก ยีสต์หลายชนิด, liposan จาก *Candida lipolytica* และ rhamnolipids ของ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เก็บเกี่ยวโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Kosaric, 2001)

สำหรับการสกัดไกลโคลิปิดที่ผลิตจาก *Torulopsis bombicola* (Cooper and Paddock, 1984) *Torulopsis petrophilum* (Cooper et al., 1983) และ *Torulopsis apicola* (Hommel et al., 1987) เป็นการสกัดด้วย ethyl acetate โดยการแช่เย็น หลังจากการดูดซับบนถ่าน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* จะมีการเก็บเกี่ยวในลักษณะที่คล้ายกัน ยกเว้น การสกัดจะใช้ acetone ไกลโคลิปิดที่ผลิตโดย *Ustilago maydis* (Hewald et al., 2005) และ mannosylerythritol lipid ผลิตจาก *Candida* spp. (Bhardwaj et al., 2013) เป็นตะกอนที่มีน้ำมันมาก เมื่อปั่นเหวี่ยงแล้วจึงต้องสกัดในอีเทอร์ เอทานอล หรือเมทานอลต่อไป

ไกลโคลิปิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Ustilago zaeae* จะมีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีการตกตะกอนด้วยกรด (acid precipitation) ที่อุณหภูมิต่ำ ไกลโคลิปิดจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และแรมโนลิปิดจาก *P. aeruginosa* และ *Candida lipolytica* จะมีการเก็บเกี่ยวด้วยวิธี acidification โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล เมื่อไม่นานมานี้มีการสกัด cell-bound ของ bioemulsifier จาก *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใน buffer ที่ประกอบด้วย potassium metabisulfite โดยการตกตะกอนโดยใช้ เอทานอล-อะซิติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บ่มข้ามคืน (Desai and Banat, 1997)

## 6. คุณสมบัติและการประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้โครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา

6.1 เพิ่มพื้นที่ผิวสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำต่ำแบบคทีเรียที่เจริญในบริเวณที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการเจริญแบบจำกัดเนื่องจากแรงตึงระหว่างผิวของน้ำและน้ำมัน (Banat et al., 2010) ซึ่งในระบบเปิด เช่น แหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนคราบไขมัน มีจำนวนของจุลินทรีย์ไม่เพียงพอต่อการอิมัลซิไฟด์น้ำมันให้มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ไขมันที่ถูกอิมัลซิไฟด์ที่กระจายอยู่ในน้ำก็ไม่เพียงพอการนำไปใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวซึ่งมีสมบัติเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันจึงมีความจำเป็นในการย่อยสลายคราบไขมันที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของน้ำมันโดยการทำให้เกิดอิมัลชัน ทำให้เซลล์สัมผัสกับน้ำมันแล้วนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น (Ron and Rosenberg, 2001)

6.2 เพิ่ม bioavailability ของสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ เหตุผลหลักที่ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนย่อยสลายได้ยาก คือ มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ และถูกดูดซับอยู่ในพื้นผิว เช่น ถูกดูดซับในดิน จึงทำให้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนำสารดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ยาก (Ron and Rosenberg, 2001) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อในสารตั้งต้นที่ถูกดูดซับโดยการชะสารออกจากพื้นผิวหรือเพิ่มความสามารถการละลายน้ำของสารดังกล่าว (Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

6.3 กำจัดโลหะหนัก สาร rhamnolipid มีความสามารถในการกำจัดแคดเมียม, ตะกั่ว และสังกะสีจากดิน (Wang and Mulligan, 2009) ซึ่งกลไกในการกำจัดโลหะหนักของ rhamnolipid คือ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ rhamnolipid และแคดเมียม และการทำปฏิกิริยาของ rhamnolipid ต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้โพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์สามารถจับกับโลหะหนักและทำให้เกิดการตกตะกอนของโลหะหนัก เช่น การจับกับยูเรเนียมของ emulsan จาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Uzoigwe et al., 2015)

6.4 บทบาทของอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีต่อฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ น้ำหนักโมเลกุลสูงหรืออิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถถ่ายทอดสู่จุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ พบว่า alasan จาก *Acinetobacter radioresistens* KA53 สามารถจับกับพื้นผิวเซลล์ของเชื้อ *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 และ *A. calcoaceticus* RAG-1 และเปลี่ยนแปลงพื้นผิวเซลล์ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งการถ่ายทอดดังกล่าวเกิดขึ้นหลังจากบ่มเซลล์ผู้รับกับอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ นอกจากนี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. radioresistens* KA53 ร่วมกับ *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่า alasan หลังออกมาจาก *A. radioresistens* KA53 แล้วจับกับเซลล์ผู้รับ คือเชื้อ *A. calcoaceticus* RAG-1 (Osterreicher-Ravid et al., 2000) การถ่ายทอดอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพของแบคทีเรียจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่งแสดงให้เห็นถึงการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ การรวมกลุ่ม และการเกิดฟิล์มชีวภาพ (Ron and Rosenberg, 2001)

6.5 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์ส่วนใหญ่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ลิโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวน ได้แก่ polymyxins ที่

ผลิตจาก *Bacillus polymyxa* (Balaji et al., 2011), gramicidins ที่ผลิตจาก *Bacillus brevis* (Abraham et al., 2014), circulocins ที่ผลิตจาก *Bacillus circulans* J2154 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี รวมถึงแบคทีเรียที่ทนต่อสารยาปฏิชีวนะ (He et al., 2001) และ iturin A ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ที่มีความสามารถในการเป็นสารควบคุมจุลินทรีย์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และเชื้อราก่อโรคในพืชได้ (Yu et al., 2002)

Folman และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตสารต้านเชื้อราในแตงกวาจากเชื้อ *Lysobacter enzymogenes* 3.1T8 พบว่าสารดังกล่าวคือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ซึ่งทำให้เกิดโรคยอดและรากเน่าในแตงกวา จากการทดลองพบว่าสาละสลวยส่วนใสจากเชื้อ *L. enzymogenes* 3.1T8 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อทดสอบบนอาหาร R2A หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

Joshi และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* 20B ซึ่งแยกจากอาหารหมักในประเทศอินเดีย พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporium*, *Alternaria burnsii*, *Cryosporium indicum* และ *Rhizoctonia bataticola* หลังจากการเลี้ยงเชื้อ ร่วมกันในบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการศึกษา โครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นชนิด ลิโปเปปไทด์

Mukherjee และคณะ (2009) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ crude biosurfactant และ purified biosurfactant ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus circulans* โดยใช้วิธี agar well diffusion พบว่า crude และ purified biosurfactant ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*Micrococcus flavus*, *Bacillus pumilis*, *Mycobacterium smegmatis*) และ แกรมลบ (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas* sp.) รวมทั้งเชื้อรา (*Aspergillus niger*, *A. flavus*) และยีสต์บางสายพันธุ์ (*Candida albicans*) ด้วย แต่ purified biosurfactant สามารถยับยั้งได้ดีกว่า

Kim และคณะ (2010) ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* CMB32 ซึ่งแยกได้จากดิน พบว่าสารลดแรงตึงผิวดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคแอนแทรคโนส (anthracnose disease) ในพริก บลูเบอร์รี่ มะม่วง และธัญพืชบางชนิด จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีโดยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF) พบว่า สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ 3 ชนิด ได้แก่ iturin A, fengycin และ surfactin



## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora palmivora*
- ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
- ศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เก็บเกี่ยวได้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora*
- ศึกษาวิธีการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมทั้งศึกษาองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว
- ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ในระดับเรือนอนุบาล

## ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ศึกษาสภาวะและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ศึกษาวิธีการในการสกัดและสภาวะที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ทั้งในระดับเรือนอนุบาล รวมทั้งวิธีในการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและโครงสร้างทางเคมีของสารที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เชื้อแบคทีเรียและทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ทราบองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกได้ รวมทั้งทราบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกได้ในระดับเรือนอนุบาล

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง

#### วัสดุและอุปกรณ์

##### 1. ตัวอย่างตะกอนดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดิน น้ำและของเสีย บริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดกระบี่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสตูลและจังหวัดตรัง โดยกระจายให้ครอบคลุมทั่วทั้งบริเวณๆ ละ 5 - 10 จุด เก็บที่ความลึก 0 - 5 ซม. จากผิวดิน ก่อนเก็บตัวอย่างดินต้องกวาดเศษพืชหรือวัสดุที่อยู่ผิวน้ำดินออกเสียก่อน นำดินทุกจุดใส่รวมกันในถุงพลาสติกหรือภาชนะที่เตรียมไว้ เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างดินมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในห้องปฏิบัติการ

##### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient agar (NA) และ Nutrient broth (NB) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): เนื้อวัวสกัด 3; เปปโตน 5; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ Nutrient agar เติม agar 15 กรัม)

- Mineral salt medium (MSM) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม):  $K_2HPO_4$  0.8;  $KH_2PO_4$  0.2;  $CaCl_2$  0.05;  $MgCl_2$  0.5;  $FeCl_2$  0.01;  $(NH_4)_2SO_4$  1.0; NaCl 5.0; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH เท่ากับ 7.0 (Noparat et al., 2014)

##### 3. น้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เก็บน้ำเสียจากบ่อรวม ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัททักษิณปาล์ม (2521) จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี บรรจุในแกลลอนขนาด 10 ลิตรและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้น้ำไปกรองแยกของแข็งที่แขวนลอยในน้ำ วัดค่าบีโอดีและพีเอช ตามลำดับ จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาดังไว้ให้เย็น ปรับพีเอชเท่ากับ 7 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH

#### วิธีการวิเคราะห์

##### 1. การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยมีชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ (Joshi et al., 2008)

## 2. การวัดค่าพีเอช

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตรวจวัดค่า พีเอชของสารละลายส่วนใสโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

## 3. การวัดค่าแรงตึงผิวโดยเครื่อง Ring tensiometer

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในกระจกนาฬิกา วางบนแท่นวาง จุ่มหลอดทองคำขาวลงไปนสารละลายแล้วค่อยๆ ดึงหลอดขึ้น จนถึงรอยต่อระหว่างของเหลวและอากาศ (liquid-air layer interface) ค่าแรงตึงผิวที่ทำให้หลอดแยกออกจากของเหลวเป็นค่าแรงตึงผิวของของเหลวที่วัดได้มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (Bodour and Maier, 1998)

## 4. การทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชันด้วยวิธี Emulsification activity

เติมน้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 2 นาที แล้วทิ้งไว้ 10 นาที คำนวณค่า emulsification activity (EA) (Cooper and Goldenberg, 1987)

$$EA = \frac{\text{ความสูงของ emulsion ที่เกิดขึ้น} \times 100}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}}$$

## 5. การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเสีย ได้แก่

- การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยใช้วิธี Lowry method (Lowry et al., 1951)
- การวิเคราะห์ค่าบีโอดี (Biochemical oxygen demand, BOD), น้ำมันและกริส ในน้ำเสียโดยรวมโดยวิธีมาตรฐาน (APHA, AWWA and WPCF, 1999)
- การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธีของ A.O.A.C. (2000)

## วิธีการทดลอง

### 1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก ตัวอย่างดิน

ใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงใน NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 วินาที ปิเปตสารละลายส่วนใส ปริมาตร 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 Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อที่ได้ในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตรร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อ

นาที่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น และปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่า OD<sub>660</sub> เท่ากับ 0.5

การทำ primary screening

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 2 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันโดยแบ่งเป็น

- เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ นำไปสกัดน้ำมันออกด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

- เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ ทดสอบ drop-collapsing test ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น เลือกเชื้อที่พบกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 - 5 มิลลิเมตร เพื่อคัดเลือกในขั้นตอนต่อไป

การทำ secondary screening

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้างต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่า EA ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้นเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่ดีที่สุดจำนวน 20 ไอโซเลตเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 2. การแยกเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl)

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลต่างๆ ที่แสดงอาการของโรคเน่าดำจากแหล่งปลูกกล้วยไม้ในเขตจังหวัดภูเก็ต พังงา กระบี่ และตรัง มาแยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue transplanting โดยนำส่วนของใบหรือยอด ล้างด้วยน้ำไหลให้สะอาดซับใบให้แห้ง ตัดส่วนบริเวณที่เป็นโรคและบริเวณที่ปกติให้มีขนาด 2 x 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปวางบนอาหารจำเพาะ RNV medium (Jeffers and Martin, 1986) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อมีเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนของกล้วยไม้ นำเส้นใยเชื้อราที่แยกได้เลี้ยงบนอาหาร PDA จนได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 20 สายพันธุ์เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 3. การเทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อร่าก่อโรคที่คัดแยกได้

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้มาเทียบเคียงสายพันธุ์โดยศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีของ Barnett และคณะ (2000) และเทียบเคียงสายพันธุ์โดยใช้ 18S ตามวิธีการของ Vasdinyei และ Deak (2003) นำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Agar well diffusion assay (Rasooli and Razzaghi-Abyaneh, 2004)



#### 4.1 การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา

เชื้อเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเยือกที่เก็บใน stock มาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ โดยใช้ น้ำที่ผสม tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วเทใส่จานเพาะเชื้อรา ใช้แท่งแก้วคนปลอดเชื้อขูดให้สปอร์ออกมาแล้วกรองผ่านกรวยแก้วที่มีสำลีปลอดเชื้อเพื่อแยกเส้นใยออกจากสปอร์จะได้สารแขวนลอยสปอร์นับจำนวนสปอร์โดยใช้ hemacytometer ปรับโดยใช้อาหาร PDB เจือจางให้ได้ปริมาณสปอร์  $1 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

#### 4.2 การเตรียมสารละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1 ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1 และปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่า OD<sub>660</sub> เท่ากับ 0.5 ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในพลาสติกที่มีอาหาร Mineral salt medium (MSM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เลี้ยงเชื้อในสภาวะและเวลาที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ วัดการเจริญของเชื้อ ค่าพีเอช และกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นำน้ำหมักที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายส่วนใสของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กรองสารละลายส่วนใสที่ได้ผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่ผ่านการกรองแล้วมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น paper disc ไร้เชื้อ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นชุดควบคุม

#### 4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ใช้ไม้พันสำลีไร้เชื้อ (cotton swab) จุ่มสปอร์เชื้อราที่เตรียมจากข้อ 4.1 มาพองหมาดๆ แล้ว streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร PDA วางทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้ forcep ที่ปลอดเชื้อ คีบแผ่น disc ที่ซึบสารละลายส่วนใสของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและแผ่น disc ที่เป็นชุดควบคุม วางบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ทำการทดลองสารสกัดละ 3 ซ้ำ สังเกตการเกิดวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และวัดขนาดวงใสด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ และรายงานเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเป็นมิลลิเมตร เลือกสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อรามากที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 5. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

#### 5.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในข้อ 4 มาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา re-streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดิม 2-3 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะของโคโลนี รูปร่างเซลล์ การเรียงตัว และการติดสีแกรม (Gram staining)

#### 5.2 การศึกษาในระดับยีน

เทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 4 โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA ตามวิธีการของ Noparat และคณะ (2014)

6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

#### 6.1 การเตรียมกล้าเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำเชื้อจากข้อ 1 ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตรร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1 และปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่า OD660 เท่ากับ 0.5

#### 6.2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทราย น้ำเสียจากบ่อรวมหรือกากน้ำตาล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันปาล์มใช้แล้วหรือน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์

- การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ตามวิธีการวิเคราะห์การเจริญข้อ 1
- ค่า pH โดยใช้ pH meter
- ค่าแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3 และ 4
- กิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราตามวิธีการทดลองข้อ 4

เลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

#### 6.3 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 6.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 6.2 เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ รามากที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

#### 6.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 6.2 และ 6.3 ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ เนื้อวัวสกัด ผงชูรส (MSG) เปปโตน และยีสต์สกัด แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 6.2 เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป



#### 6.5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 6.2, 6.3 และ 6.4 ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนให้มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 6.2 เลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นต่อไป

#### 6.6 ผลของการเขย่าต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจาก 6.2, 6.3, 6.4 และ 6.5 ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 6.2 เลือกความเร็วรอบที่ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นต่อไป

#### 6.7 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในหรืออาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 6.2-6.6 ตามลำดับ จากนั้นปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 5.0, 5.5, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 6.2 เลือกพีเอชเริ่มต้นที่ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อรามากที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นต่อไป

#### 6.8 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน อัตราการเขย่า และค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 6.2-6.7 ตามลำดับ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง จนถึงเวลา 84 ชั่วโมงของการเลี้ยง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 6.2 เลือกช่วงเวลาที่ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อรา มากที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นต่อไป

7. การศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อร่าก่อโรคในกล้วยไม้จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

#### 7.1 ตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 6.2-6.7 นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช โดยใช้ 6 M HCl ปรับพีเอช เป็น 2.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นเก็บตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน นำไปล้างด้วย 100 mM HCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 2N NaOH และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization โดยส่วนสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้ง เรียกว่า สารสกัดหยาบ (crude BS)

### 7.2 สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำสารละลายส่วนใสสกัด 2 ครั้งด้วย chloroform/methanol ในอัตราส่วน 2:1 (ดัดแปลงจาก Mercade et al., 1996) โดยใช้กรวยแยก (separation funnel) นำชั้นของตัวทำละลายกำจัดน้ำโดยการเติม anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในเครื่อง evaporator

### 7.3 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้อิมตัวที่ความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 40 ถึง 60 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือโดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 ดาลตัน ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิล เซลลูโลสและทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization

จากวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 วิธี เลือกวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อรามากที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นต่อไป

8. การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้

### 8.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

ตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการข้อ 6 ด้วย TLC ที่มี silica gel 60 F254 เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล ในอัตราส่วนต่างกัน เพื่อหา mobile phase ที่ดีที่สุด หรือตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบด้วย TLC RP-18 F254s เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ acetonitrile:น้ำ ในอัตราส่วนต่างกันเพื่อหา mobile phase ที่ดีที่สุด จากนั้นเป่าให้แห้ง แล้วใช้ spraying reagent ต่างๆ ในการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ rhodamine B เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกรดไขมัน (McInerney et al., 1990) ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ (Wilkinson, 1972) ใช้ anisaldehyde ในการวิเคราะห์น้ำตาล (Schulz et al., 1991) เลือก mobile phase ที่สามารถแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป

### 8.2 การแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ

ใช้คอลัมน์ SEP-PAK (C18) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ด้วย เมทานอล 100% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาดคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย acetonitrile 100% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการข้อ 6 มาละลายด้วย acetonitrile:น้ำ (1:1) และใส่ในคอลัมน์ จากนั้นชะด้วย acetonitrile:น้ำ (1:1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรและลดความเข้มข้นของตัวเคลื่อนที่โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile:น้ำ เป็น 2:1, 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ ปริมาตรที่ใช้ชะคอลัมน์ อัตรา ส่วนละ 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนที่แยกได้จาก โครมาโตกราฟีแบบดูดซับแต่ละส่วน

ตรวจสอบองค์ประกอบด้วยวิธี TLC ตามวิธีการข้อ 7.1 นำส่วนที่มีโครมาโตแกรมเหมือนกันรวมเข้าด้วยกัน ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวและกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราตามวิธีการข้างต้น เก็บเฉพาะส่วนที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวและและกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นต่อไป

8.3 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว

ตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของสารที่พบกิจกรรมการลดแรงตึงผิวในข้อ 7.2 โดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และ Mass Spectrometer ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

9. การหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

หาค่า MIC และ MFC ของสารลดแรงตึงผิวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว โดยวิธี broth microdilution assay ในถาด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีปริมาตรรวมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร เตรียมสารลดแรงตึงผิวให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร PDB มาอย่างละ 360 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมแถวแรกแล้วเจือจางแบบครึ่งละสองเท่า (two-fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ปริมาณ 180 ไมโครลิตรของทุกหลุมโดยดูดสารสกัดจากหลุมแรกปริมาณ 180 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมแถวที่สองแล้วผสมกันโดยดูดขึ้นลง 5 ครั้ง จากนั้นดูดสารสกัดใส่ลงในหลุมต่อไปเรื่อยๆ โดยหลุมสุดท้ายจะดูดปริมาตร 180 มิลลิลิตรทั้ง ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 2.50, 1.25, 0.63, 0.16 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสปอร์ราที่ต้องการทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ซึ่งมีปริมาณสปอร์  $1 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้มีปริมาณสปอร์เชื้อราสุดท้ายเป็น  $1 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 2.25, 1.13, 0.56, 0.28, 0.14 และ 0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีชุดควบคุม (control) เป็น positive control ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่ไม่เติมสารสกัดแต่เติมเชื้อรา negative control เป็นอาหารที่มีสารสกัดแต่ไม่มีการเติมเชื้อรา วัดการเจริญของเชื้อราโดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่ 48 ทำการทดสอบเพื่อหาค่า MFC โดยนำชุดการทดลองที่ไม่พบการเติบโตของเชื้อรามา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญของเชื้อรา

การอ่านผล

อ่านค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวที่คัดเลือกได้ที่ทำให้ผลการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราที่ 48 ชั่วโมง โดยค่าที่มีระดับความขุ่นไม่แตกต่างไปจากชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสปอร์รา อ่านค่า MFC ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อรา โดยนำหลุมที่ให้ค่า MIC มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สังเกตเชื้อเติบโตหรือถ้าเชื้อไม่เจริญแสดงว่าเป็นค่า MFC คัดเลือกสารลดแรงตึงผิวที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา โดยพิจารณาสารสกัดที่มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้างและมีค่า MIC ต่ำสุดมาใช้ทดสอบกิจกรรมอื่นๆ ต่อไป

10. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี detached leaf technique

ทำแผ่นบนใบกล้วยไม้ที่เตรียมไว้โดยใช้เข็มจิ้มลึก 5 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายแขวนลอยของเชื้อราความเข้มข้น  $10^5$  สปอร์ต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนใบกล้วยไม้บริเวณที่ทำแผลไว้ ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นดูสารละลายแขวนลอยของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ระดับ  $0.5 \times \text{MIC}$ ,  $\text{MIC}$  และ  $2 \times \text{MIC}$  ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงในตำแหน่งเดียวกัน ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นชุดควบคุมลบและใช้สารป้องกันและกำจัดเชื้อราทางการค้า (fosetyl-Al) ที่ระดับความเข้มข้นตามฉลากแนะนำการใช้เป็นตัวควบคุมบวก วัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับในทุกๆ วัน เป็นเวลา 7 วัน





### บทที่ 3

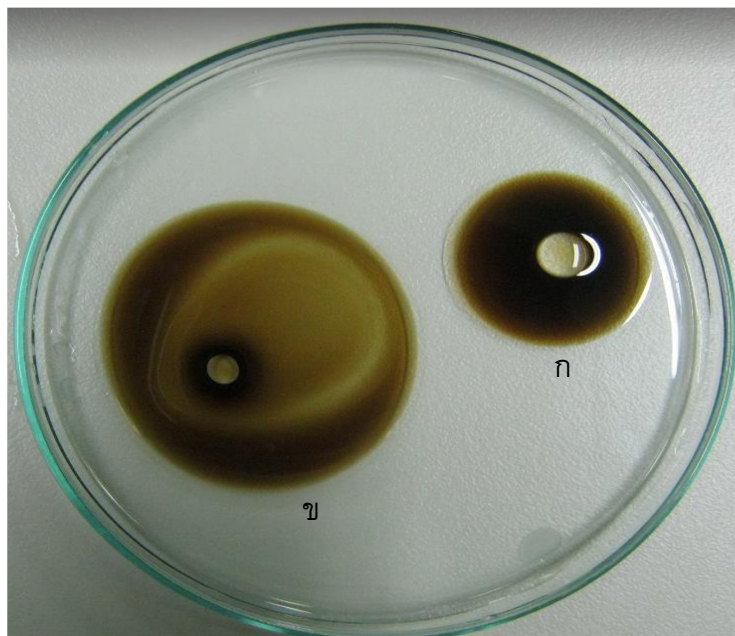
## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างดินน้ำและของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดกระบี่ (บริษัทกระบี่น้ำมันพืชจำกัด, บริษัทนามหงส์น้ำมันปาล์ม จำกัด, บริษัทปาล์มโมริช จำกัด และบริษัทรุ่งเจริญปาล์มออยล์ จำกัด) จังหวัดสุราษฎร์ธานี (บริษัททักษิณปาล์ม, บริษัทปาล์มไทยพัฒนา จำกัด, บริษัทลาภทวีปาล์มออยล์ จำกัด และบริษัท สหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด) จังหวัดสตูล (บริษัทปาล์มไทยพัฒนาจำกัด, บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด และห้างหุ้นส่วน จำกัด เพิ่มพูนทรัพย์ปาล์มออยล์) และจังหวัดตรัง (บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม) โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 101 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม จำนวน 50 ตัวอย่าง, น้ำเสียจากบ่อบำบัด จำนวน 25 ตัวอย่าง กากตะกอนดีแคเตอร์ จำนวน 20 ตัวอย่าง และดินตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย จำนวน 6 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาแยกเชื้อโดยเจือจางใน NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จากนั้นปิเปตส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมา spread plate บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ( $30\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) เป็นเวลา 3 - 5 วัน สุ่มเลือกโคโลนีมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยวเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันและสุ่มเลือกเชื้อให้มากที่สุดเพื่อเป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่างสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 231 ไอโซเลท การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างในธรรมชาติจะได้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ การใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมันเป็นแหล่งอาหารทำให้เชื้อที่มีความสามารถในการใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ก่อน ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถใช้น้ำมันได้จะเจริญเติบโตได้ช้าหรือไม่เจริญเลย ซึ่งเชื้อที่สามารถใช้น้ำมันในการเจริญเติบโตได้น่าจะมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสและช่วยในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถนำน้ำมันไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่ายขึ้น (Providenti et al., 1995; Rahman et al., 2003; Wei et al., 2005)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทำ primary screening โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง ที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสและน้ำมันปาล์ม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่ใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนนำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง ตรวจสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี oil displacement place test (ภาพที่ 1) จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ร้อยละ 68) สามารถเจริญเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแบคทีเรียจึงสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ง่าย (Saimmai, 2011) ในขณะที่เมื่อใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน มีแบคทีเรียร้อยละ 32 ที่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากในน้ำมันปาล์มใช้แล้วนั้นมีส่วนประกอบที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ของ

แบคทีเรีย เช่น กรดไขมันอิสระเป็นต้น (Katemai, 2009) จากข้อมูลข้างต้นให้เห็นว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



ภาพที่ 1 ผลการตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี oil displacement place test; ก: ตัวควบคุมลบ (อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ); ข: ตัวอย่างที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อวัดกิจกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมทั้งหมดจำนวน 85 ไอโซเลทโดยมีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำนวน 35 และ 69 ไอโซเลทเมื่อใช้กลูโคสและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ ร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนมีมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมัน เชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้โดยส่วนใหญ่จะผลิตสารที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันให้มีขนาดเล็กเพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ง่าย สารเหล่านี้ได้แก่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Maneerat et al. 2006, 2007)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นทั้ง 85 ไอโซเลทมาทำ secondary screening โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำมันปาล์มปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดค่าแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) (ภาพที่ 2) ในกรณีที่ใช้ น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนนำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วย เฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดจำนวน 30 ไอโซเลท ได้แก่ CT 01, CT 02, CT 03, CT 04, CT 05, KB 01, KB 02, KB 03, KB 04, LT 01, LT 02, LT 03, LT 04, NH 01, NH 02, PM 01, PM 02, PM 03, PO 01, PO 02, PO 03, PT 01, PT 02, RJ 01, TP 01, TP 02, TP 03, TP 04, TS 01 และ TS 02 (ตารางที่ 1) จากการย้อมแกรมพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้พบว่าเป็นส่วนใหญ่ คือ ร้อยละ 70 (21 จาก 30 ไอโซเลท) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับรายงาน

ของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านเช่น Bicca และคณะ (1999), Bodour และคณะ (2003), Batista และคณะ (2006), Saimmai และคณะ (2012) และ Saisa-ard และคณะ (2013; 2014) ที่พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์จากน้ำมันโดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนสารอาหารได้ดีกว่ากลุ่มอื่นๆ เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารที่ใช้ไขมันปาล์มและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อที่เจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ เชื้อไอโซเลท LT 02 ที่แยกได้จากบริษัทลาภทวีปาล์มออยล์ จำกัด และเชื้อไอโซเลท CT01 ที่แยกได้จากบริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD660) เท่ากับ 3.87 และ 2.98 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้สูงสุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ เชื้อไอโซเลท PO 02 ที่แยกได้จากห้างหุ้นส่วนจำกัดเพิ่มพูนทรัพย์ปาล์มออยล์ และ CT 03 ที่แยกได้จากบริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์มจำกัด โดยมีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 22.89 และ 23.50 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อใช้น้ำมันปาล์มและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนคือเชื้อไอโซเลท PO 01 ที่แยกได้จากห้างหุ้นส่วนจำกัดเพิ่มพูนทรัพย์ปาล์มออยล์ โดยมีค่า EA เท่ากับร้อยละ 60.88 และ 50.16 เมื่อใช้น้ำมันปาล์มและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ (ตารางที่ 2)



ตารางที่ 1 ไอโซเลท แหล่งตัวอย่าง และแหล่งคาร์บอนที่สามารถเจริญได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ไอโซเลท	แหล่งตัวอย่าง	แหล่งคาร์บอน	
		น้ำมันปาล์ม	น้ำตาลกลูโคส
CT 01	บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด	1.64±0.05*	2.98±0.33*
CT 02	บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด	0.52±0.02	1.34±0.14
CT 03	บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด	2.97±0.12	2.22±0.28
CT 04	บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด	0.60±0.20	1.87±0.55
CT 05	บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด	1.15±0.03	1.64±0.27
KB 01	บริษัทกระบี่น้ำมันพืช จำกัด	1.21±0.02	1.11±0.09
KB 02	บริษัทกระบี่น้ำมันพืช จำกัด	1.15±0.05	0.92±0.24
KB 03	บริษัทกระบี่น้ำมันพืช จำกัด	0.19±0.04	2.24±0.11
KB 04	บริษัทกระบี่น้ำมันพืช จำกัด	2.97±0.32	1.18±0.07
LT 01	บริษัทลาภทวีปาล์มออยล์ จำกัด	0.53±0.06	1.64±0.44
LT 02	บริษัทลาภทวีปาล์มออยล์ จำกัด	3.87±0.49	2.22±0.96
LT 03	บริษัทลาภทวีปาล์มออยล์ จำกัด	0.59±0.26	2.19±0.26
LT 04	บริษัทลาภทวีปาล์มออยล์ จำกัด	1.07±0.18	1.67±0.37
NH 01	บริษัทนามหงส์น้ำมันปาล์ม จำกัด	1.87±0.42	1.92±0.08
NH 02	บริษัทนามหงส์น้ำมันปาล์ม จำกัด	1.96±0.23	1.71±0.44
PM 01	บริษัทปาล์มโมริช จำกัด	1.07±0.14	2.21±0.17
PM 02	บริษัทปาล์มโมริช จำกัด	0.92±0.13	2.78±0.33
PM 03	บริษัทปาล์มโมริช จำกัด	0.72±0.25	1.18±0.08
PO 01	ห้างหุ้นส่วนจำกัดเพิ่มพูนทรัพย์ปาล์มออยล์	0.29±0.11	1.28±0.03
PO 02	ห้างหุ้นส่วนจำกัดเพิ่มพูนทรัพย์ปาล์มออยล์	2.17±0.31	1.73±0.35
PO 03	ห้างหุ้นส่วนจำกัดเพิ่มพูนทรัพย์ปาล์มออยล์	1.63±0.46	2.21±0.78
PT 01	บริษัทปาล์มไทยพัฒนา จำกัด	1.95±0.23	2.18±0.54
PT 02	บริษัทปาล์มไทยพัฒนา จำกัด	0.89±0.19	1.88±0.23
RJ 01	บริษัทรุ่งเจริญปาล์มออยล์จำกัด	1.64±0.06	2.23±0.74
TP 01	บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม	1.14±0.08	1.98±0.29
TP 02	บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม	1.28±0.03	1.61±0.40
TP 03	บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม	1.73±0.15	1.87±0.24
TP 04	บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม	1.29±0.05	1.37±0.55
TS 01	บริษัททักษิณปาล์ม	1.74±0.26	2.18±0.55
TS 02	บริษัททักษิณปาล์ม	2.81±0.36	1.29±0.52

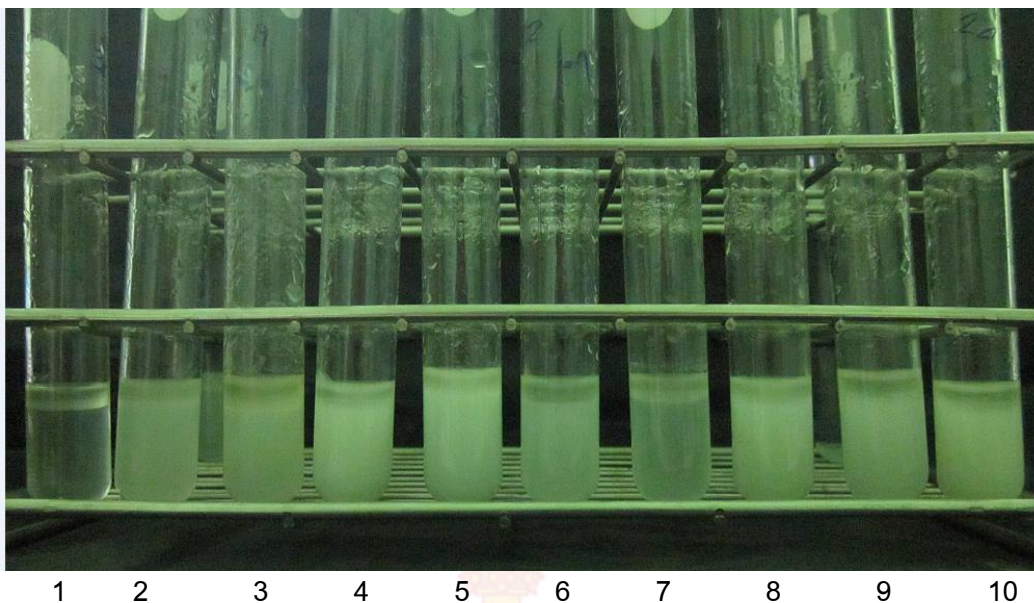
\*OD600 and results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations



ตารางที่ 2 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยง (surface tension reduction: SR) และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA)

ไอโซเลท	ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย	น้ำมันปาล์ม		น้ำตาลกลูโคส	
		SR (mN/m)	EA (%)	SR (mN/m)	EA (%)
CT 01	แกรมลบ รูปกลม	15.81±1.32	58.08±9.93	12.03±2.04	45.09±4.88
CT 02	แกรมลบ รูปแท่ง	13.77±1.08	24.29±5.87	10.46±0.69	20.80±1.90
CT 03	แกรมลบ รูปแท่ง	7.50±2.72	28.54±2.64	23.04±1.24	25.48±1.87
CT 04	แกรมบวก รูปแท่ง	12.70±0.73	22.82±0.99	16.26±2.64	26.19±2.34
CT 05	แกรมลบ รูปกลม	20.50±1.61	32.83±1.95	14.28±1.05	30.19±1.52
KB 01	แกรมบวก รูปแท่ง	20.13±1.63	60.50±1.73	13.28±2.07	41.25±1.12
KB 02	แกรมลบ รูปกลม	12.53±0.50	22.98±0.75	21.69±2.52	20.18±0.83
KB 03	แกรมลบ รูปแท่ง	10.50±0.70	10.18±0.57	11.32±1.00	19.16±1.15
KB 04	แกรมบวก รูปแท่ง	15.58±1.30	24.74±6.12	12.28±1.00	20.46±0.79
LT 01	แกรมลบ รูปกลม	21.80±1.51	22.55±1.70	16.25±1.02	25.68±1.59
LT 02	แกรมลบ รูปแท่ง	10.53±0.65	27.90±1.70	13.94±1.86	32.82±0.92
LT 03	แกรมลบ รูปกลม	13.03±1.05	25.28±4.08	10.43±0.40	28.63±3.18
LT 04	แกรมลบ รูปแท่ง	21.73±1.40	20.24±1.07	16.62±1.13	23.01±5.57
NH 01	แกรมบวก รูปแท่ง	20.23±0.67	55.91±8.79	10.57±1.29	35.35±3.06
NH 02	แกรมบวก รูปแท่ง	20.57±1.24	28.91±1.83	20.46±0.81	20.77±0.97
PM 01	แกรมบวก รูปแท่ง	18.05±1.37	35.59±7.23	16.08±3.08	30.58±1.28
PM 02	แกรมลบ รูปแท่ง	20.03±0.87	30.80±8.25	14.05±1.52	23.42±2.28
PM 03	แกรมลบ รูปกลม	13.52±1.03	34.68±5.68	18.65±1.45	30.49±1.67
PO 01	แกรมลบ รูปกลม	21.73±1.63	60.88±3.07	12.24±1.71	50.16±9.78
PO 02	แกรมบวก รูปแท่ง	22.89±0.95	30.59±5.34	20.24±1.07	35.22±1.28
PO 03	แกรมลบ รูปกลม	13.70±1.05	29.55±0.77	17.35±2.02	30.76±1.11
PT 01	แกรมบวก รูปแท่ง	20.30±1.06	30.40±4.79	10.68±1.50	23.17±0.54
PT 02	แกรมลบ รูปกลม	17.70±2.00	45.23±5.52	12.34±1.61	40.38±0.59
RJ 01	แกรมลบ รูปกลม	18.03±0.69	30.66±4.74	17.44±1.49	35.55±1.45
TP 01	แกรมลบ รูปกลม	19.78±1.25	27.02±2.91	16.05±1.28	25.34±0.97
TP 02	แกรมลบ รูปกลม	18.40±2.55	33.06±7.84	13.43±1.77	30.25±1.01
TP 03	แกรมลบ รูปกลม	20.79±0.82	25.80±1.25	12.59±1.27	26.46±1.44
TP 04	แกรมลบ รูปกลม	12.69±1.40	23.54±1.59	15.94±2.10	20.21±1.24
TS 01	แกรมบวก รูปแท่ง	12.70±1.35	32.13±1.82	16.33±1.38	30.72±0.52
TS 02	แกรมลบ รูปกลม	20.77±0.85	48.37±2.01	20.17±0.32	44.87±0.60

\* Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations



ภาพที่ 2 ผลการตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการเกิดอิมัลชันกับน้ำมัน; 1: ตัวควบคุมลบ (อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ); ๒: ตัวอย่างที่มีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันกับน้ำมัน

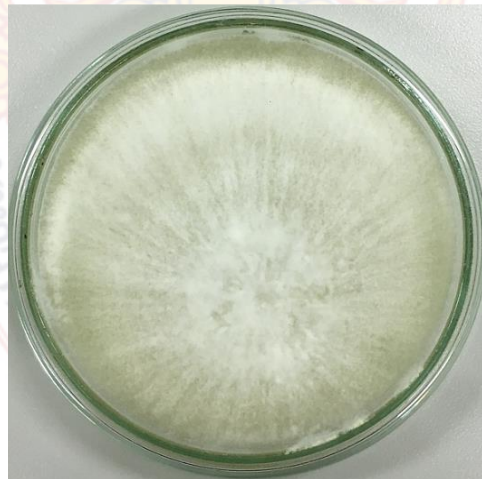
## 2. การแยกเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl)

จากการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคเน่าดำในแปลงปลูกกล้วยไม้เขตจังหวัดภูเก็ต พังงา กระบี่ และตรัง โดยเฉพาะในกล้วยไม้สกุลมอคคาราและแคทลียา อาการที่พบส่วนมาก จะพบที่บริเวณใบและยอดของกล้วยไม้ ลักษณะแผลบนใบเริ่มแรกจะเป็นจุดใส ฉ่ำน้ำ แผลจะลามขยายขนาดเรื่อยๆ และเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเข้มและเน่าหลุดร่วงทั้งใบ ในต้นที่แสดงอาการรุนแรงเมื่อถึงส่วนยอดที่เน่าจะหลุดติดมือมาด้วย (ภาพที่ 3) เมื่อนำใบที่แสดงอาการดังกล่าวมาแยกเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่าสามารถแยกเชื้อรา *P. palmivora* (Butl.) ที่เป็นสาเหตุโรคได้ โดยเชื้อราสามารถเจริญได้ดี ลักษณะเส้นใยของเชื้อรามีสีขาว พูละเอียดบนผิวหน้าอาหาร และโคโลนีของเชื้อราเจริญเต็มจากอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ภายในเวลาหนึ่งอาทิตย์ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 4) ลักษณะต่างๆ ของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างอาการโรคเน่าดำของกล้วยไม้นั้นตรงกับรายงานของทัศนาวพร (2543) และปราณี และคณะ (2557) ได้เคยมีการศึกษาในกล้วยไม้แล้วว่าเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl)





ภาพที่ 3 ลักษณะอาการโรคเน่าดำ ในกล้วยไม้สกุลบอนเป็นมอคคาร่า (ก) และสกุลแคทลียา(ข-ง)



ภาพที่ 4 ลักษณะของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

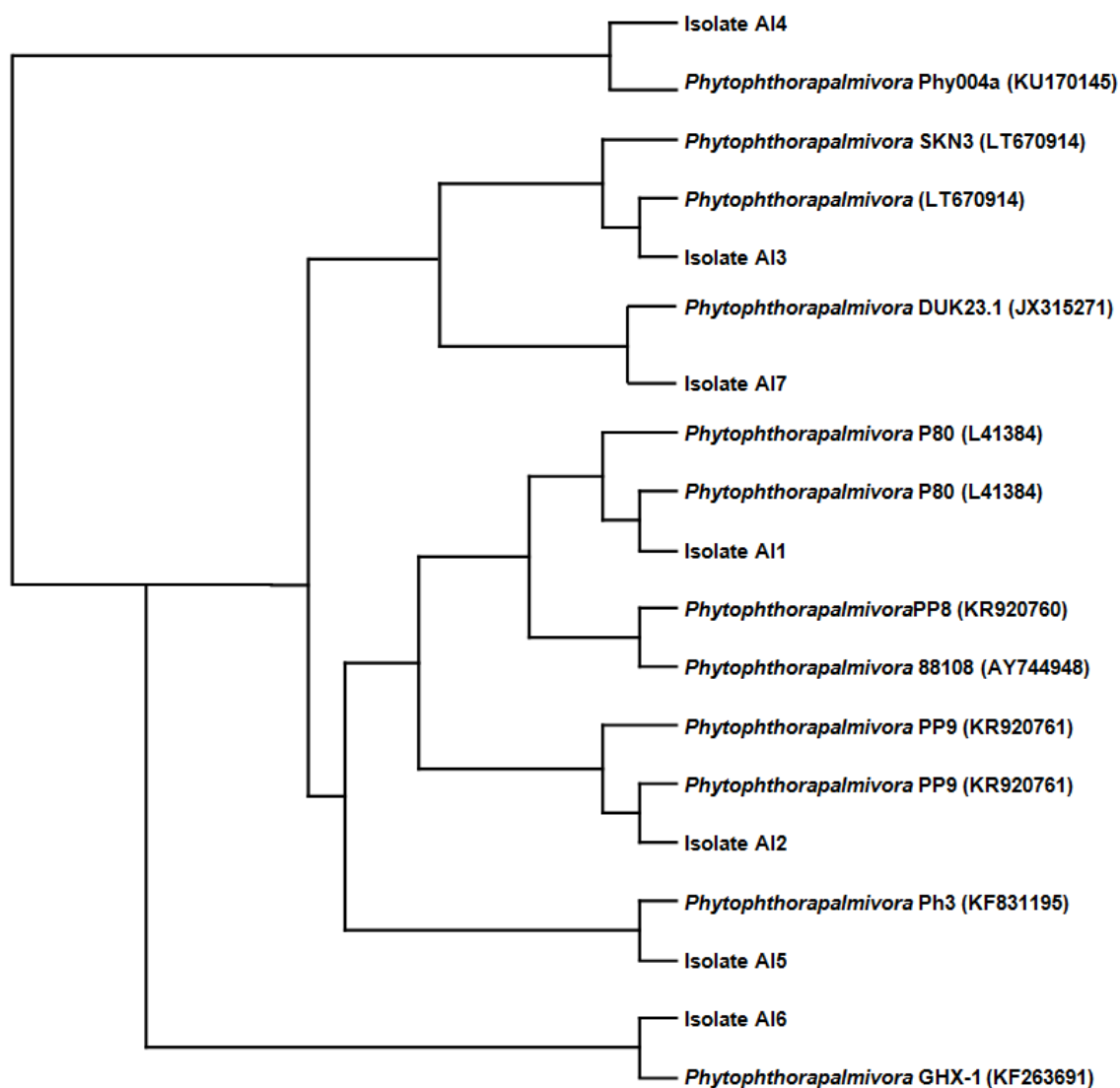
### 3. การเทียบเคียงสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดแยกได้

จากการนำเชื้อราที่มีคัดแยกได้มาศึกษาเพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 18S rRNA โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol/chloroform DNA extraction (Ausubel et al., 1995) เพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนยีน 18S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primers คือ 18S69F (Asano et al., 2010) แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (QIAGEN, Inc.) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ผลของการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 18S rRNA ของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์กับเชื้อราที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank แสดงดังตารางที่ 3 และภาพที่ 5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงการเทียบเคียงลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 18S rRNA ของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์กับเชื้อราที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Strain code	18S rRNA gene sequence	Sequence identity (%)
Nearest relative in GenBank		
A11	<i>Phytophthora palmivora</i> P80 (L41384)	100
A12	<i>Phytophthora palmivora</i> PP9 (KR920761)	100
A13	<i>Phytophthora palmivora</i> (LT670914)	100
A14	<i>Phytophthora palmivora</i> Phy004a (KU170145)	100
A15	<i>Phytophthora palmivora</i> Ph3 (KF831195.1)	100
A16	<i>Phytophthora palmivora</i> GHX-1 (KF263691)	100
A17	<i>Phytophthora palmivora</i> DUK23.1 (JX315271)	99



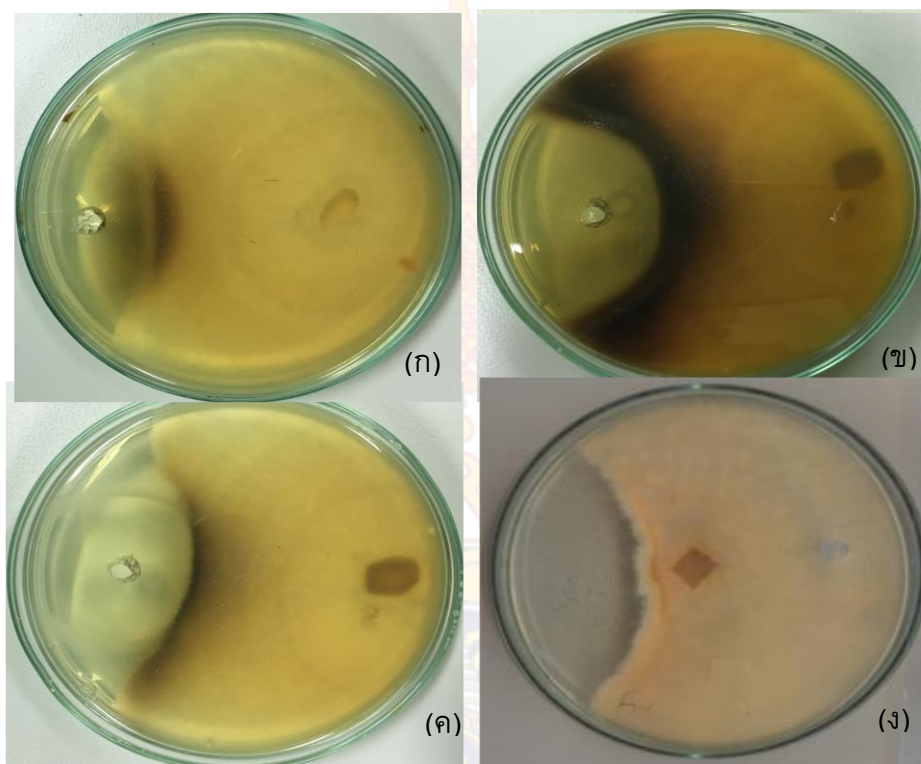


ภาพที่ 5 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์และเชื้อราที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยการใช้โปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูลของ NCBI

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Agar well diffusion assay

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์ในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแต่ละสายพันธุ์แล้วทดสอบสารสกัดหยาบของลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 30 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยใช้วิธี agar well diffusion ต่อเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท (ตารางที่ 4 และภาพที่ 6) พบว่าสามารถจัดกลุ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เป็น 4 กลุ่มตามกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อราที่เกิดขึ้นคือ กลุ่มที่ 1 คือพวกไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่ใช้ทดสอบ ได้แก่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 04, KB 03, NH 02, PM 01, PO 02 และ RJ 01 กลุ่มที่ 2 คือพวกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร ได้แก่เชื้อ ไอโซเลท KB 01, LT 03, PO 01 และ TP 03 กลุ่มที่ 3 พวกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสอยู่ในช่วงระหว่าง 5 - 10 มิลลิเมตร ได้แก่เชื้อไอโซเลท CT 01, CT 02, CT 05, KB 02, KB 04, LT 01, LT

02, LT 04, NH 01, PM 02, PM 03, PO 03, PT 01, PT 02, TP 01, TP 02, TP 04, TS 01 และ TS 02 และกลุ่มที่ 4 เชื้อแบคทีเรียที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 10 มิลลิเมตร ได้แก่เชื้อ ไอโซเลท CT 03 เมื่อพิจารณาตามชนิดของเชื้อราทดสอบทั้ง 4 ชนิด พบว่าเชื้อรา AI2 มีความไวต่อสารสกัดเห็บของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งมากที่สุดกับสารสกัดเห็บของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ ไอโซเลท CT 03 เท่ากับ 10.46 เซนติเมตรจึงเลือกใช้เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 เป็นเชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและใช้เชื้อรา AI2 เป็นเชื้อราทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 6 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเชื้อราไอโซเลท AI1 (ก), AI2 (ข), AI3 (ค) AI4 (ง) บนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar ด้วยวิธี agar well diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4 กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวและการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar ด้วยวิธี agar well diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน

Bacterial isolate	Clear zone of diameter (mm)						
	AI1	AI2	AI3	AI4	AI5	AI6	AI7
CT 01	5.49±0.54	8.13±0.84	9.08±0.40	9.04±0.41	9.53±0.32	9.35±0.76	8.54±0.45
CT 02	5.18±0.29	6.55±0.50	6.84±0.51	7.15±0.28	6.18±0.06	8.50±0.26	6.65±0.24
CT 03	9.07±0.58	10.46±0.69	9.82±0.19	8.86±0.44	8.28±0.26	7.30±0.07	8.91±0.26
CT 04	0	0	0	0	0	0	0
CT 05	5.51±0.81	4.12±0.44	4.87±0.32	4.52±0.25	6.15±0.04	3.50±0.44	5.07±0.05
KB 01	4.52±0.79	3.19±0.34	4.23±0.22	4.19±0.34	3.28±0.71	4.88±0.15	4.00±0.02
KB 02	4.36±0.34	5.70±0.49	5.87±0.60	6.44±0.30	5.71±0.46	5.22±0.10	6.72±0.47
KB 03	0	0	0	0	0	0	0
KB 04	9.53±0.94	8.64±0.34	7.02±0.67	8.52±0.65	9.73±0.55	9.07±0.07	9.52±0.60
LT 01	6.01±0.43	5.20±0.88	5.35±0.11	5.01±0.23	5.05±0.22	6.75±0.24	7.03±0.05
LT 02	5.67±0.97	4.81±0.39	4.52±0.10	2.48±0.56	4.85±0.29	3.73±0.09	4.48±0.26
LT 03	4.27±0.73	4.82±0.24	4.84±0.33	4.8±0.36	4.85±0.29	4.28±0.37	3.60±0.29
LT 04	6.82±0.81	8.17±0.62	7.90±0.66	6.92±0.38	8.52±0.37	7.78±0.25	6.78±0.21
NH 01	8.51±1.22	7.97±0.29	6.17±0.49	6.51±0.38	7.13±0.10	8.25±0.53	9.55±0.06
NH 02	0	0	0	0	0	0	0
PM 01	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Bacterial isolate	Clear zone of diameter (mm)						
	AI1	AI2	AI3	AI4	AI5	AI6	AI7
PM 02	9.20±0.04	9.50±0.26	9.24±0.21	9.00±0.02	9.10±0.09	9.34±0.11	8.54±0.18
PM 03	5.28±0.15	6.18±0.19	6.86±0.16	7.14±0.11	5.80±0.20	8.51±0.09	6.65±0.33
PO 01	4.01±0.04	4.08±0.09	4.85±0.06	3.86±0.28	4.15±0.11	4.30±0.09	3.91±0.08
PO 02	0	0	0	0	0	0	0
PO 03	5.16±0.09	4.91±0.09	5.59±0.38	4.56±0.33	5.09±0.04	5.50±0.25	6.06±0.07
PT 01	4.21±0.11	3.92±0.13	5.21±0.19	4.21±0.11	6.21±0.09	4.88±0.13	4.02±0.07
PT 02	5.77±0.23	3.37±0.18	5.75±0.14	6.45±0.33	6.73±0.17	5.23±0.04	6.72±0.14
RJ 01	0	0	0	0	0	0	0
TP 01	8.65±0.44	7.76±0.20	8.64±0.41	8.56±0.22	9.66±0.11	8.07±0.05	9.52±0.16
TP 02	5.97±0.28	5.00±0.01	6.05±0.06	5.01±0.12	6.02±0.12	6.75±0.09	7.01±0.09
TP 03	4.81±0.45	4.98±0.14	4.89±0.14	2.48±0.08	4.85±0.19	5.74±1.73	4.48±0.11
TP 04	5.83±0.06	4.28±0.03	5.80±0.09	4.87±0.25	5.96±0.60	4.28±0.07	3.96±0.16
TS 01	7.10±0.21	8.91±0.14	7.11±0.13	6.91±0.14	8.13±0.09	7.78±0.12	6.68±0.24
TS 02	8.50±0.40	7.51±0.15	7.58±0.21	6.51±0.26	7.19±0.19	8.25±0.07	9.55±0.31

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations



## 5. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลท CT 03

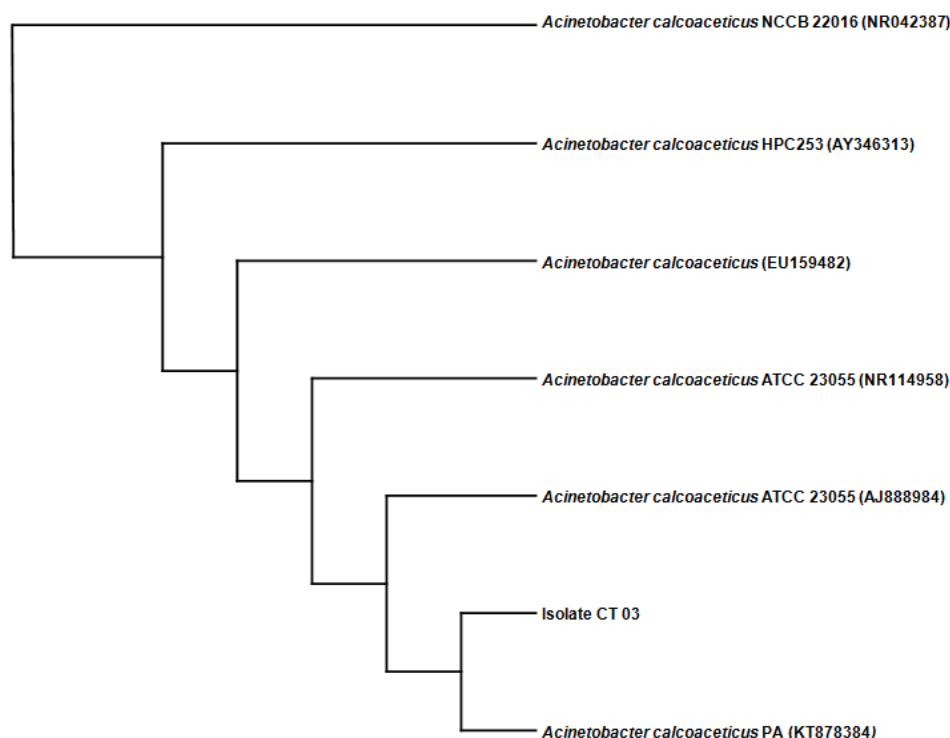
นำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 มาศึกษาเพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol/chloroform DNA extraction (Ausubel et al., 1995) เพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primers ในช่วง 8f และ 1492r แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (QIAGEN, Inc.) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ผลของการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 กับเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank ผลดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* PA (KT878384) ถึง 100% จึงสรุปว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 คือเชื้อ *A. calcoaceticus* เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ (Antunes et al., 2014) พบได้ทั่วไปในบริเวณดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Baruah et al., 2017; Dahal et al., 2017; Hamzah et al., 2017) มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งสามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันดิบทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโต (Sazykin et al., 2016) อีกทั้งยังมีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพหลายชนิดจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* อีกด้วย (Zhao and Wong, 2009; Pirog et al., 2013; Pirog et al., 2014; Hoakova et al., 2015)

Acinetobacter calcoaceticus strain PA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Sequence ID: [KT878384.1](#) Length: 1424 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1424		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2738 bits(1424)	0.0	1424/1424(100%)	0/1424(0%)	Plus/Plus	
Query 1	TGCAAGTCGAGCGGGGAAGGTAGCTTGCTACCGACCTAGCGCGGACGGGTGAGTAAT	60			
Sbjct 1	TGCAAGTCGAGCGGGGAAGGTAGCTTGCTACCGACCTAGCGCGGACGGGTGAGTAAT	60			
Query 61	GCTTAGGAATCTGCCATTAGTGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATA	120			
Sbjct 61	GCTTAGGAATCTGCCATTAGTGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATA	120			
Query 121	CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCG	180			
Sbjct 121	CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCG	180			
Query 181	GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAG	240			
Sbjct 181	GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAG	240			
Query 241	GATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	300			
Sbjct 241	GATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	300			
Query 301	GAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCT	360			
Sbjct 301	GAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCT	360			
Query 361	ATGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGATAAATACCTAGAGATAGTG	420			
Sbjct 361	ATGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGATAAATACCTAGAGATAGTG	420			
Query 421	GACGTTACTCGCAGAATAAGCACCAGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG	480			
Sbjct 421	GACGTTACTCGCAGAATAAGCACCAGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG	480			
Query 481	GGTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTAATTAAGTCA	540			
Sbjct 481	GGTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTAATTAAGTCA	540			
Query 541	AATGTGAAATCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTG	600			
Sbjct 541	AATGTGAAATCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTG	600			
Query 601	GGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC	660			
Sbjct 601	GGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC	660			
Query 661	GATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGAGCA	720			
Sbjct 661	GATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGAGCA	720			
Query 721	AACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGCTACTAGCCGTTGGGGCC	780			
Sbjct 721	AACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGCTACTAGCCGTTGGGGCC	780			
Query 781	TTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCCGA	840			
Sbjct 781	TTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCCGA	840			
Query 841	AGACTAAAACCTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT	900			
Sbjct 841	AGACTAAAACCTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT	900			
Query 901	TCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATAGTAAGAACCTTCCAGAGATGGA	960			
Sbjct 901	TCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATAGTAAGAACCTTCCAGAGATGGA	960			
Query 961	TTGGTGCCCTTCGGGAACCTACATACAGGTGCTGCATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTCTGTA	1020			
Sbjct 961	TTGGTGCCCTTCGGGAACCTACATACAGGTGCTGCATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTCTGTA	1020			
Query 1021	GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTCCCTTATTTGCCAGCGAGTAATG	1080			
Sbjct 1021	GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTCCCTTATTTGCCAGCGAGTAATG	1080			
Query 1081	TCGGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGCGGGGACGACGCTCAAGT	1140			
Sbjct 1081	TCGGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGCGGGGACGACGCTCAAGT	1140			
Query 1141	CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGC	1200			
Sbjct 1141	CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGC	1200			
Query 1201	TACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA	1260			
Sbjct 1201	TACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA	1260			
Query 1261	CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACG	1320			
Sbjct 1261	CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACG	1320			
Query 1321	TTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGTTGCCACCAGAAGTAGC	1380			
Sbjct 1321	TTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGTTGCCACCAGAAGTAGC	1380			
Query 1381	TAGCCTAACTGCAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGA 1424				
Sbjct 1381	TAGCCTAACTGCAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGA 1424				

ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแถบเชื้อไอโซเลท CT 03 กับฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)



ภาพที่ 8 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CT 03 กับเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank

## 6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03

### 6.1 แหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในอาหาร minimal salt medium (MSM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ คือน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทราย กากน้ำตาล และน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (WPO) แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก โดยมี  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) จากการทดลองพบว่า เชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ (ตารางที่ 5) โดยสามารถเจริญในแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำได้ดีกว่า โดยสามารถเจริญได้สูงสุด 2.44 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากที่สุดที่ 23.50 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าแรงตึงผิวเริ่มต้นเท่ากับ 72 มิลลินิวตันต่อเมตร จากการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของสารละลายส่วนใสเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็น 48 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 25.50 เมื่อพิจารณากิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* AI2 โดยวิธี agar well diffusion

พบว่าสามารถยับยั้งได้ 10.74 มิลลิเมตร จึงเลือกใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03

C-source (1%)	Dry cell weight (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)	Clear zone diameter (mm)
No carbon source	0.08±0.02	2.00±0.52	0	0
Glucose	2.44±1.03	23.50±0.06	25.50±0.25	10.74±0.14
Sugar	2.25±0.11	18.30±0.16	15.12±0.11	8.70±0.28
Molasses	2.15±0.02	10.80±0.18	20.04±0.07	7.02±0.03
WPO	1.97±0.19	8.50±0.25	14.45±0.21	5.04±0.07
Soybean oil	1.84±0.19	5.50±0.22	10.05±0.03	8.05±0.02
Palm oil	1.50±0.02	7.50±0.15	28.54±0.12	6.00±0.02
Used palm oil	1.04±0.19	6.01±0.01	12.02±0.02	5.00±0.12

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

## 6.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และมี  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.0 โดยน้ำหนัก ให้ค่าการลดแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุดเท่ากับ 43.01 มิลลินิวตันต่อเมตร และร้อยละ 50.15 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* Al2 ของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่ที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 4.0 โดยน้ำหนัก กิจกรรมในการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ก็ไม่ได้เพิ่มมากขึ้นไปอีก ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ร้อยละ 4 โดยน้ำหนักในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในขั้นตอนต่อไป



ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03

Glucose (%)	Dry cell weight (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)	Clear zone diameter (mm)
0.5	1.26±0.04	15.10±0.03	12.51±0.26	5.25±0.07
1.0	2.45±0.11	23.50±0.05	25.50±0.05	10.74±0.30
2.0	2.71±0.18	29.20±0.01	31.25±0.20	12.01±0.04
3.0	2.95±0.17	35.00±0.12	42.03±0.02	14.75±0.14
4.0	3.14±0.06	43.01±0.02	50.15±0.03	16.70±0.15
5.0	3.28±0.07	43.30±0.02	50.05±0.04	16.04±0.01

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

### 6.3 แหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก โดยมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ เนื้อวัวสกัด ผงซูรส (CMSG) เปปโตน และยีสต์สกัด แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) พบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 เจริญเติบโตได้สูงสุด 4.11 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่ค่าการลดแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุดเท่ากับ มี 43.01 มิลลิวตันต่อเมตร และร้อยละ 50.15 ตามลำดับ เมื่อใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เป็นแหล่งไนโตรเจน (ตารางที่ 7) โดยมีค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 72 มิลลิวตันต่อเมตร และกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* AI2 ของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้มีค่าสูงมากที่สุดเมื่อใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เป็นแหล่งไนโตรเจน จึงเลือกใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03

Nitrogen source (1%, w/v)	Dry cell weight (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)	Clear zone diameter (mm)
No N-source	0.06±0.01	1.50±0.10	0	0
Beef extract	3.05±0.03	12.00±0.01	25.50±0.05	5.03±0.04
CMSG	3.95±0.17	19.00±0.04	32.03±0.09	10.70±0.15
NaNO <sub>3</sub>	2.54±0.29	22.00±0.02	36.08±0.05	12.07±0.03
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.14±0.12	43.01±0.03	50.15±0.05	16.70±0.19
NH <sub>4</sub> Cl	2.44±0.12	30.00±0.02	40.15±0.04	14.70±0.18
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.72±0.04	25.00±0.02	35.28±0.07	12.01±0.03
Peptone	4.11±0.14	16.00±0.04	30.01±0.03	6.01±0.03
Yeast extract	1.04±0.03	18.00±0.03	32.03±0.14	5.86±0.27

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

#### 6.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ให้ค่าการลดแรงตึงผิว ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* Al2 สูงที่สุดเท่ากับ 43.80 มิลลินิวตันต่อเมตร ร้อยละ 50.30 และ 16.70 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงเลือกใช้ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	Dry cell weight (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)	Clear zone diameter (mm)
0.5	2.86±0.27	21.10±0.21	35.51±0.25	5.02±0.10
1.0	3.14±0.10	43.80±0.35	50.30±0.52	16.70±0.35
1.5	3.29±0.05	43.00±0.12	50.15±0.21	16.15±0.07
2.0	3.32±0.20	42.30±0.17	50.03±0.09	16.70±0.31
2.5	3.38±0.14	42.80±0.24	50.08±0.11	17.70±0.43
3.0	3.41±0.17	43.50±0.05	51.05±0.04	16.70±0.33

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

#### 6.5 ความเร็วรอบในการเขย่า

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ความเร็วรอบแตกต่างกันที่ 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 9) ผลจากการทดลองพบว่าความเร็วรอบในการเขย่ามีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 การเพิ่มความเร็วนในการเขย่าส่งผลให้การเจริญ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้น ความเร็วในการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ให้ค่าการลดแรงตึงผิว ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* AI2 เท่ากับ 43.03 มิลลินิวตันต่อเมตร ร้อยละ 50.15 และ 16.70 มิลลิเมตร ตามลำดับตามลำดับ การเพิ่มความเร็วนในการเขย่ามากกว่า 200 รอบต่อนาที ไม่ส่งผลให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้นอีก ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 9 ผลของความเร็วยรอบในการเขย่าต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03

Shaking speed (rpm)	Dry cell weight (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)	Clear zone diameter (mm)
50	2.16±0.08	17.10±0.05	38.51±0.05	12.51±0.30
100	2.85±0.23	28.10±0.07	42.51±0.39	14.02±0.07
150	3.00±0.04	40.04±0.45	47.08±0.54	15.01±0.12
200	3.14±0.16	43.03±0.20	50.15±0.08	16.70±0.40
250	3.24±0.12	43.80±0.35	50.15±0.06	15.75±0.24
300	3.48±0.09	43.50±0.35	50.05±0.04	16.01±0.03

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

#### 6.6 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และมี  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0 ตามลำดับ เขย่าโดยใช้ความเร็วยรอบที่เหมาะสม คือ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 ให้ค่าการลดแรงตึงผิว ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* AI2 สูงที่สุดเท่ากับ 43.00 มิลลินิวตันต่อเมตร ร้อยละ 50.15 และ 16.70 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10) โดยมีค่าแรงตึงผิวเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 72 มิลลินิวตันต่อเมตร ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นตอนต่อไป การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เนื่องจากในระหว่างการเจริญเติบโตเชื้อจะย่อยสลายสารอาหารทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อพีเอชเพิ่มสูงมากขึ้นส่งผลให้สภาวะในการเจริญของเชื้อไม่เหมาะสม พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มากเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยทั่วไปค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอชที่เป็นกลาง (Lukacs et al., 1995)



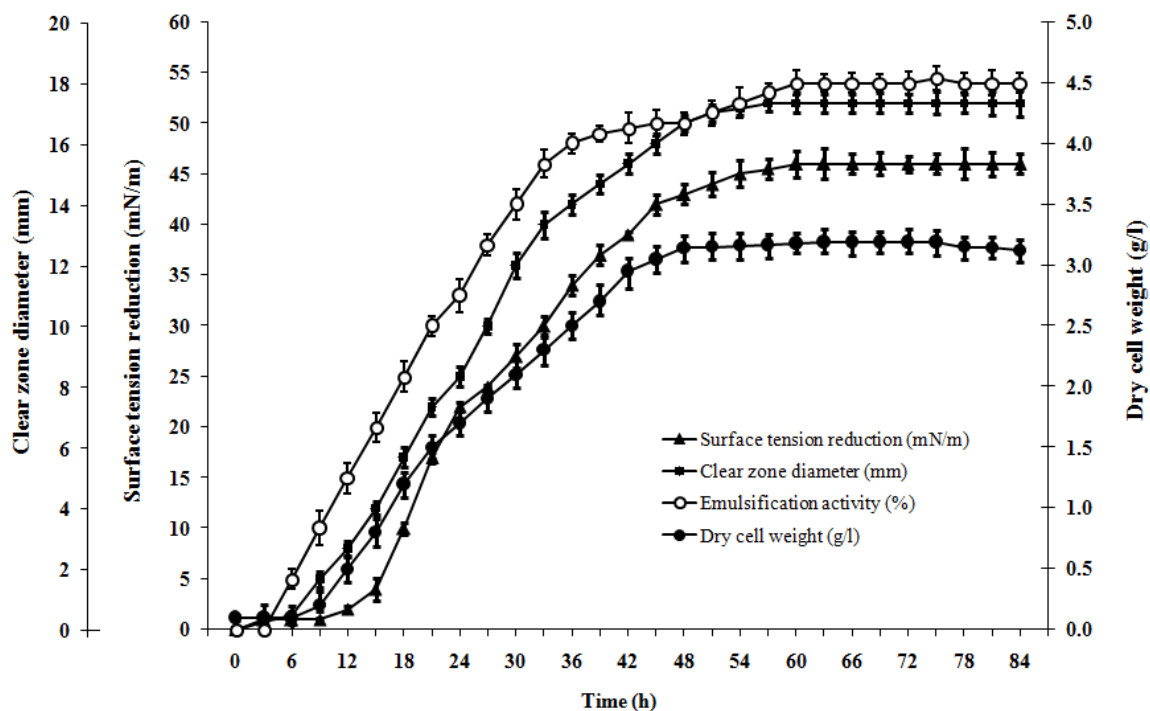
ตารางที่ 10 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03

Initial pH	Dry cell weight (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)	Clear zone diameter (mm)
5.0	1.96±0.19	20.50±0.15	20.25±0.13	4.51±0.39
5.5	2.15±0.07	27.10±0.07	28.51±0.29	6.02±0.07
6.0	2.82±0.31	32.00±0.09	37.03±0.06	8.47±0.42
6.5	3.04±0.07	38.00±0.03	44.07±0.09	12.75±0.30
7.0	3.14±0.10	43.00±0.04	50.15±0.06	16.70±0.35
7.5	3.01±0.09	33.33±0.22	43.05±0.07	10.04±0.05
8.0	2.82±0.28	25.20±0.23	31.52±0.10	8.10±0.13

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

6.7 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03

เลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และมี  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 84 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงมาตรวจวัดการเจริญ ค่าแรงตึงผิว ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* AI2 (ภาพที่ 9) จากการทดลองพบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 มีการเจริญและเพิ่มจำนวนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อและมีแนวโน้มการเจริญเติบโตตามระยะเวลาการเลี้ยง โดยการเจริญสูงสุดที่เวลา 54 ชั่วโมง ด้วยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 3.16 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 โดยการวัดค่าแรงตึงผิวที่ลดลงของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อพบว่าจะเริ่มผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเริ่มเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อและจะได้ผลดีที่สุดเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 60 โดยมีค่าการลดแรงตึงผิวมากที่สุดเท่ากับ 46.00 มิลลินิวตันต่อเมตร สอดคล้องกับความสามารถในการเกิดอิมัลชันและกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* AI2 ที่สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 54 และ 17.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเวลาในการเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ที่ 60 ชั่วโมงเพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 9 การเจริญเติบโต การผลิตและกิจกรรมการลดแรงตึงผิวชีวภาพ และความสามารถในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้น้ำตาล กลูโคสร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และมี  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่ง ไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) บนเครื่อง เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

## 7. การศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 4 โดย น้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และมี  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ พีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทำการเหวี่ยงเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสมาเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพโดยเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนด้วยกรด และสกัดด้วยตัวทำ ละลายอินทรีย์ (ethyl acetate และ chloroform/methanol) จากวิธีการเก็บเกี่ยวทั้งสามวิธีพบว่าการ ตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการปรับค่าพีเอชของสารละลายส่วนใสให้เท่ากับ 2.0 สามารถเก็บ เกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 4.25 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่ากิจกรรมใน การลดแรงตึงผิวและค่าการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เก็บเกี่ยวได้พบว่าการสกัดด้วยตัวทำ ละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตดมีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด (ตารางที่ 11) สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบได้ 0.94 กรัมต่อลิตร โดยมีค่า CMC ต่ำสุดที่ 0.30 กรัมต่อลิตร ที่ความ เข้มข้น CMC สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ได้ 40.0 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรม การยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* Al2 พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตดให้ค่ากิจกรรม การยับยั้งมากที่สุดที่ 17.50 มิลลิเมตร จึงเลือกใช้วิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้การสกัด ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03

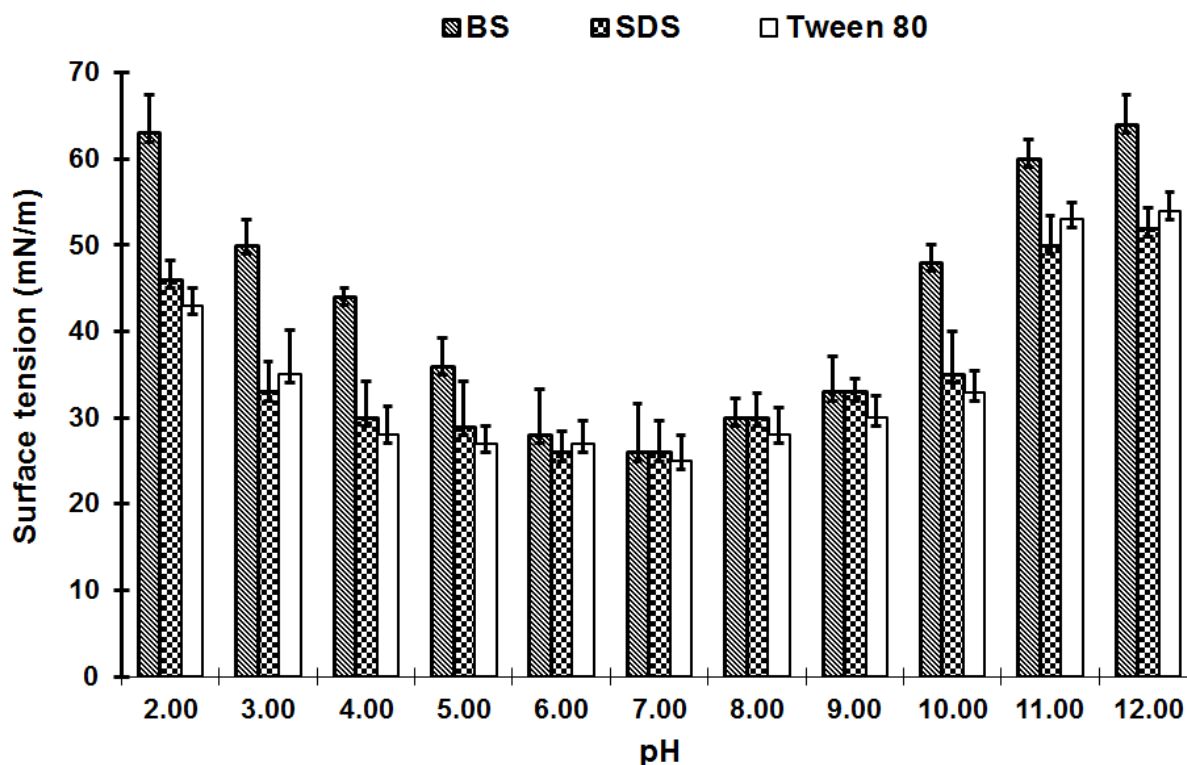
Method of recovery		Biosurfactant production (g/l)	CMC (g/l)	Surface tension reduction (mN/m)	Clear zone diameter (mm)
pH precipitation	pH 2	4.25±0.41*	3.14±0.21*	25.0±2.5*	13.00±1.52*
	pH 3	3.80±0.50	3.00±0.15	23.0±152	11.82±1.00
	pH 4	2.20±0.10	2.80±0.14	20.5±2.5	8.00±3.22
Ammonium sulfate precipitation	40%	1.25±0.70	1.45±0.20	17.0±1.0	6.87±2.00
	50%	1.63±0.50	1.71±0.13	20.5±2.0	7.51±1.70
	60%	1.98±0.50	1.88±0.18	25.0±1.5	10.30±2.50
Ethyl acetate extraction		0.94±0.25	0.30±0.05	46.0±0.5	17.50±2.50
CHCl <sub>3</sub> : MEOH extraction (2:1)		0.95±0.25	0.45±0.04	35.0±1.5	13.00±2.20

\* Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

## 8. คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

### 8.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC คือ 0.30, 0.22, และ 1.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับพีเอชของตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 2.0-12.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วทดสอบกิจกรรมในการลดแรงตึงผิวผลการทดลองแสดงในภาพที่ 10



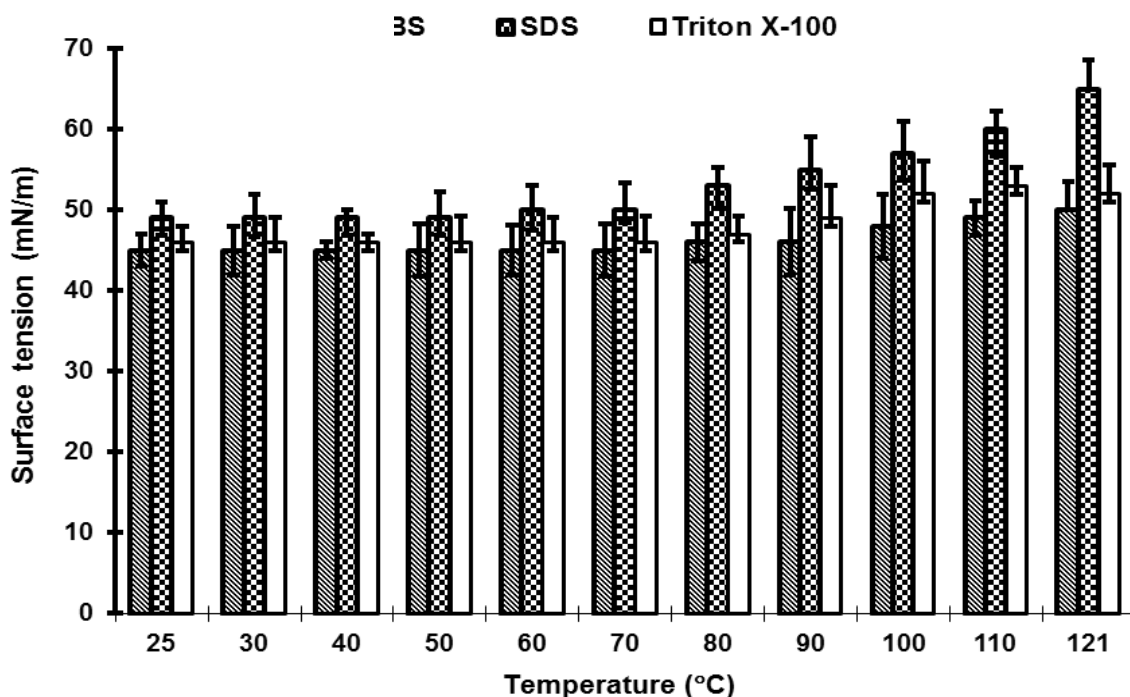
ภาพที่ 10 ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 (BS) และสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Tween 80)

พบว่าค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 เพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชลดต่ำกว่า 5.0 และมากกว่า 10.0 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเกิดการตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรดสูงและด่างสูง (Liu et al., 2017; Varjani and Upasani, 2017) แต่กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงพีเอช 6.0-9.0 ในขณะที่ SDS และ Tween 80 มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-10.0 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. calcoaceticus* CT 03 ลดแรงตึงผิวได้น้อยลงในช่วงพีเอชเป็นกรดและค่าแรงตึงผิวจะคงตัวเมื่อมี พีเอชเป็นกลางถึงเป็นด่าง เนื่องจากเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น NaOH ทำให้ความคงตัวของไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีขึ้น โดย  $\text{Na}^+$  จะจับกับโครงสร้างของกรดไขมันในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทำให้เกิดไมเซลล์ดีขึ้น (Liu et al., 2009) ซึ่งผลของพีเอชต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย (Mukherjee and Das, 2010; Singh et al., 2017) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Vaz และคณะ (2012) ศึกษาพีเอชต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางการค้า ได้แก่ Glucopone®215, Glucopone®650, Findet®1214N/23 และ linear alkylbenzene sulfonates (LAS) พบว่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่ากิจกรรมที่ดีในช่วงพีเอช 5.0-10.0 และลดกิจกรรมลงเมื่อค่าพีเอชลดต่ำกว่า 5.0 หรือเพิ่มสูงเกิน 10.0 ในส่วนของของสารลดแรงตึงผิวทางการค้าพบว่ามีค่ากิจกรรมคงที่ในช่วงพีเอช 3.0-10.0



## 8.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *A. calcoaceticus* CT 03 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 100-121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งไว้ให้อุณหภูมิกลับลงมาที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบกิจกรรมในการลดแรงตึงผิวผลการทดลองแสดงในภาพที่ 11



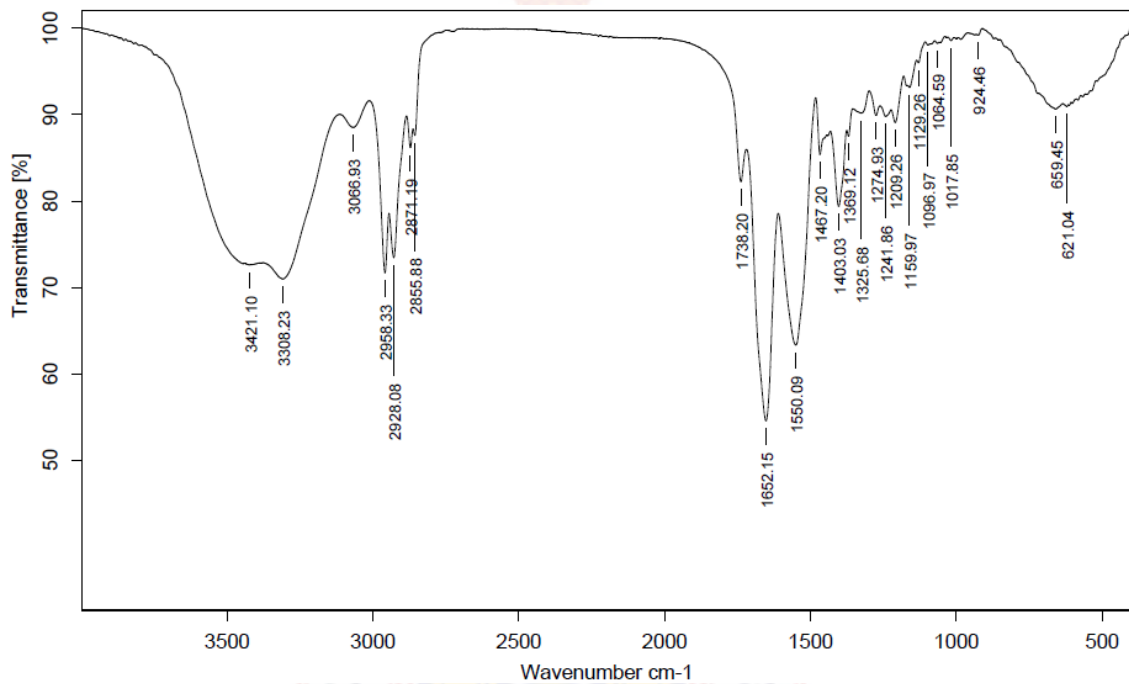
ภาพที่ 11 ผลของระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 (BS) และสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Tween 80)

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่บ่มในช่วง 25-90 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ซึ่งเห็นได้จากค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25-90 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) และที่อุณหภูมิ 100-121 องศาเซลเซียส ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ยังคงต่ำกว่า 45 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งแตกต่างกับผลของอุณหภูมิต่อสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SDS และ Tween 80 ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25-100 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมในการลดแรงตึงผิวน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *A. calcoaceticus* CT 03 เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สายของไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล SDS และ Triton X-100 จากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (autoclave) ทำให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวลดลง (Noparat et al., 2014) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษา Wang และคณะ (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 4-121 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแรงตึงผิวต่ำกว่า 38.7 mN/m

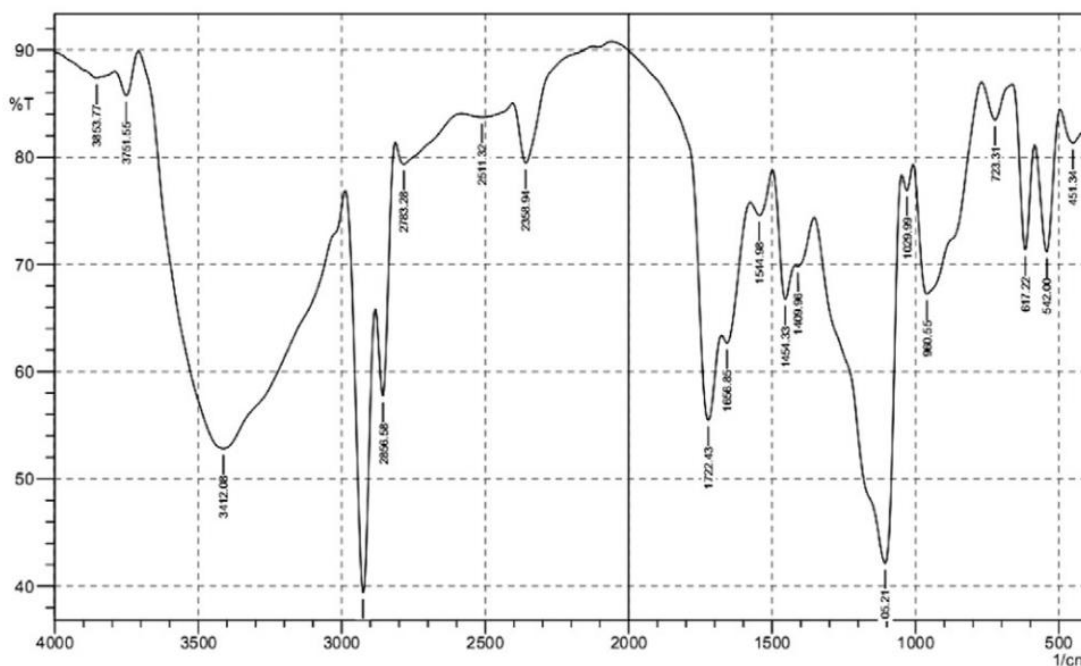
## 9. การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

### 9.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วย FT-IR ซึ่งใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่าง ผลจาก FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้พบสัญญาณการยืดตัว (stretching) ของ N-H ที่  $3421-3308\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงการมีเปปไทด์ในโมเลกุล (ภาพที่ 12) สัญญาณการยืดตัวของ CO-N ที่  $1550\text{ cm}^{-1}$  มาจากหมู่เอมีนของกรดอะมิโน สัญญาณที่  $1652$  มาจาก N ที่ต่ออยู่กับ C=O สัญญาณที่  $2928, 2958$  และ  $1467-1159\text{ cm}^{-1}$  มาจากการยืดตัวของ C-H รูปแบบโดยรวมของ FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีรูปแบบคล้ายกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* USTBa (Chandankere et al., 2014) และ *Bacillus simplex* (Mani et al., 2016) ดังแสดงในภาพที่ 13



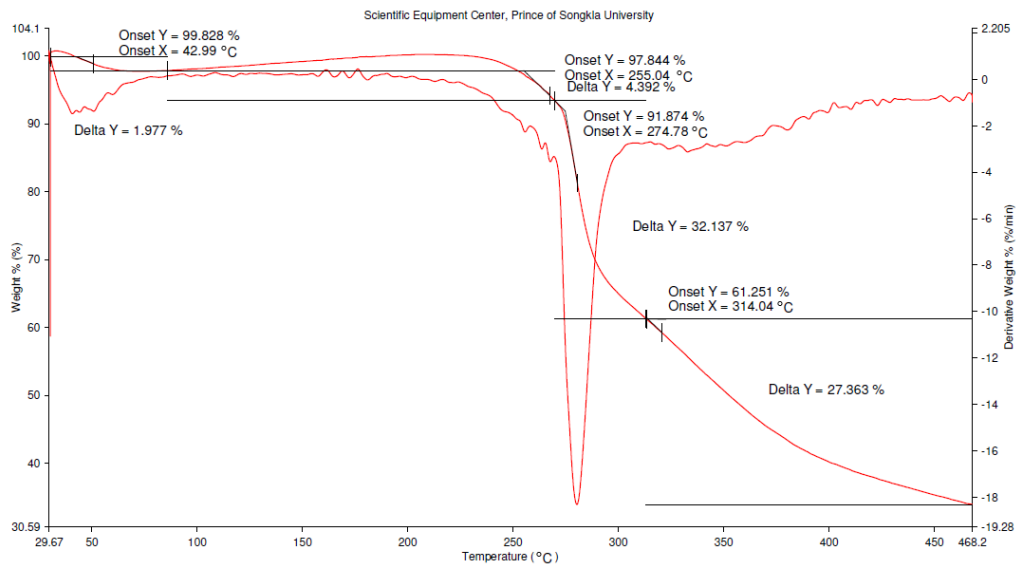
ภาพที่ 12 Fourier transform infrared spectroscopy spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03



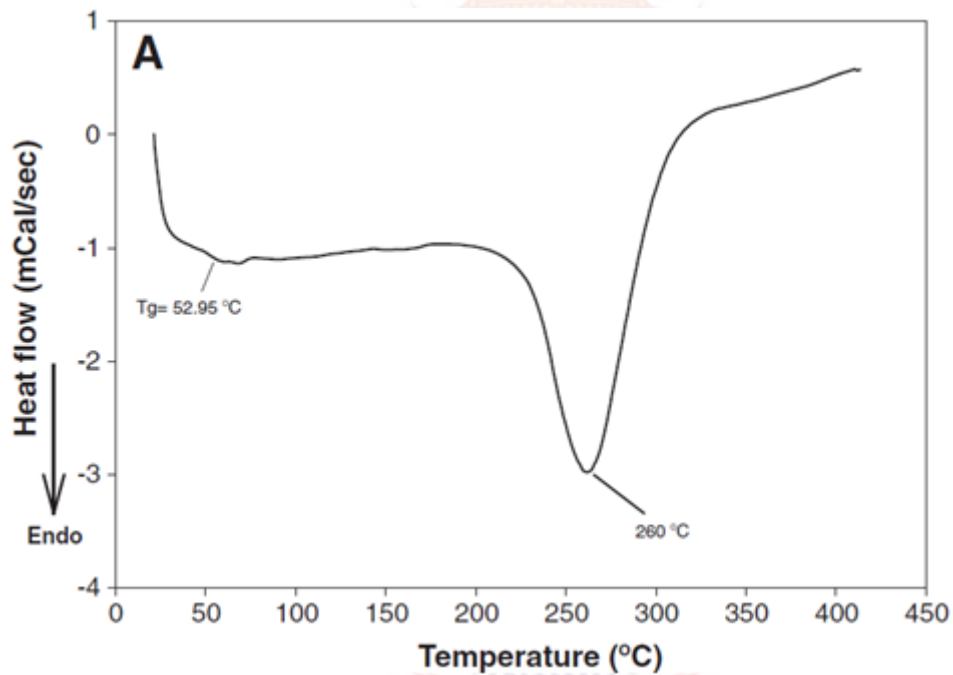
ภาพที่ 13 Fourier transform infrared spectroscopy spectrum ของโพลีโพรพิลีนที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus simplex* ที่มา Mani et al. (2016)

## 9.2 Thermal analysis techniques

เทคนิคการใช้ความร้อนในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สำคัญในการระบุโครงสร้างทางเคมีที่ต้องการศึกษาที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและมีราคาถูก (Fernandez et al., 2012) และเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Chandankere et al., 2014) จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 โดยใช้ thermogravimetry (TG) และ differential scanning calorimetry (DSC) ผลดังแสดงในภาพที่ 14 และ 15 ตามลำดับ จากไดอะแกรมของ TG แสดงให้เห็นการย่อยสลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 30-150 องศาเซลเซียส มีปริมาณการสลายตัว (degradation) ประมาณร้อยละ 4 เมื่อเพิ่มระดับอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 255 องศาเซลเซียส และประมาณร้อยละ 32 เมื่อเพิ่มระดับอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 314 องศาเซลเซียส จากนั้นพบว่าการสลายตัวเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ที่ระดับอุณหภูมิ 468 องศาเซลเซียส ลักษณะการสลายตัวดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Chandankere และคณะ (2014) ที่ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จากเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* USTBa โดยใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 16) จากไดอะแกรม DSC พบว่ามีสัญญาณที่ชัดเจนอยู่บริเวณอุณหภูมิ 268-284 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการรายงานของ Chandankere และคณะ (2014) ที่ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จาก *Bacillus methylotrophicus* USTBa ซึ่งรายงานสัญญาณไดอะแกรม DSC บริเวณ 258-262 องศาเซลเซียส

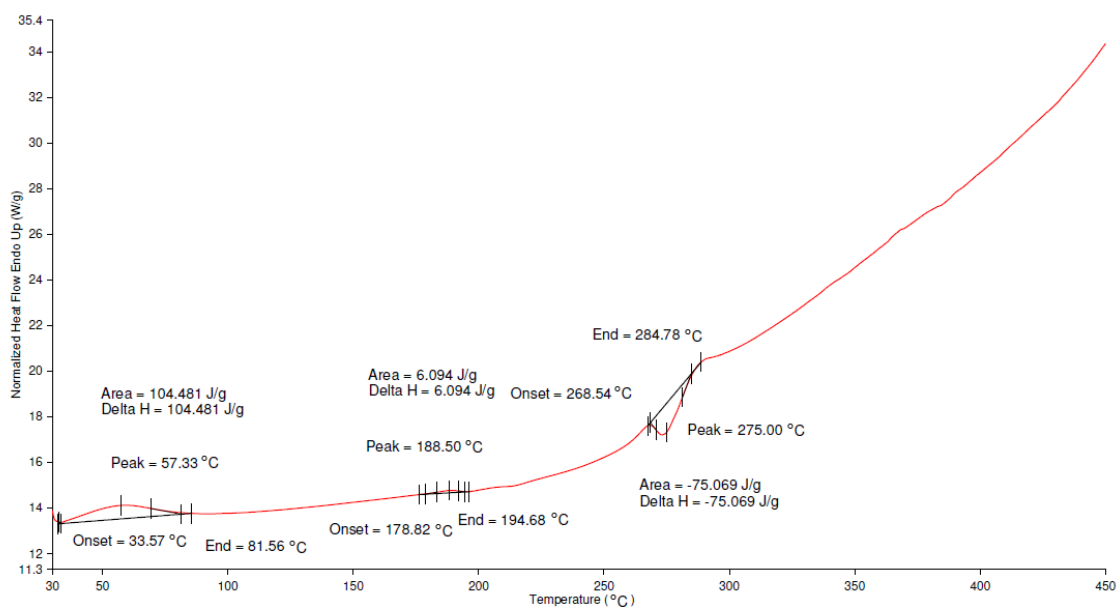


ภาพที่ 14 ไดอะแกรม Thermogravimetric ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03



ภาพที่ 15 ไดอะแกรม Thermogravimetric ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* USTBa  
ที่มา Abbasi *et al.* (2012)

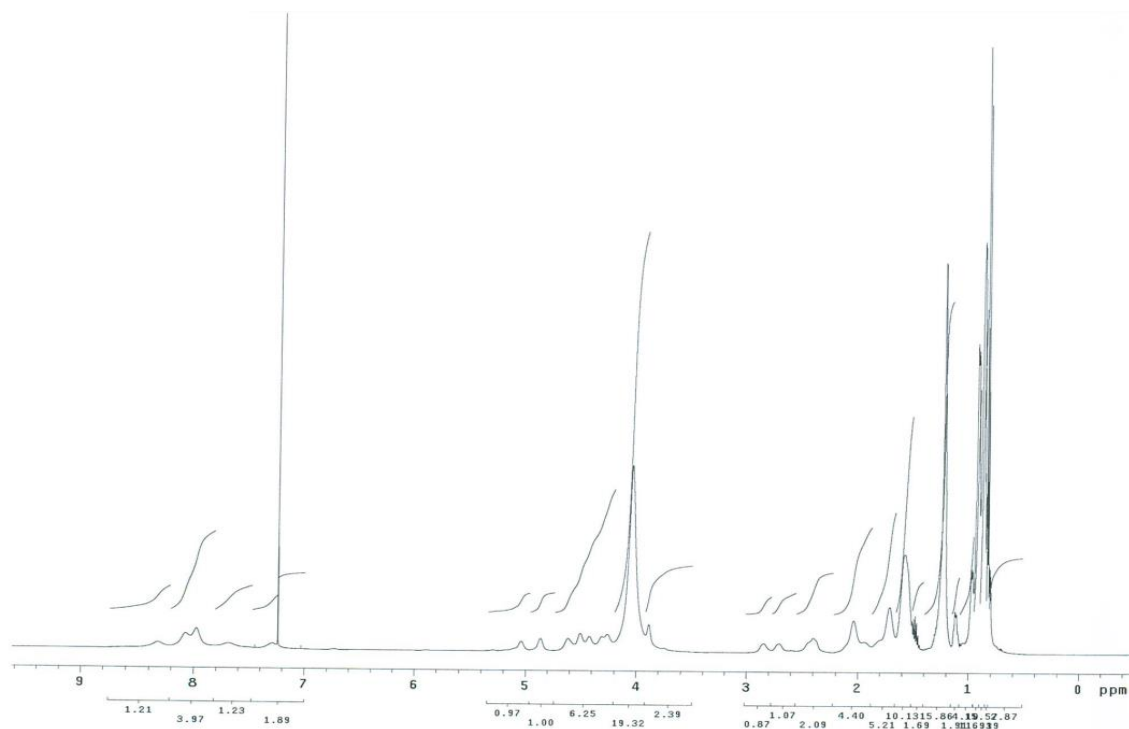




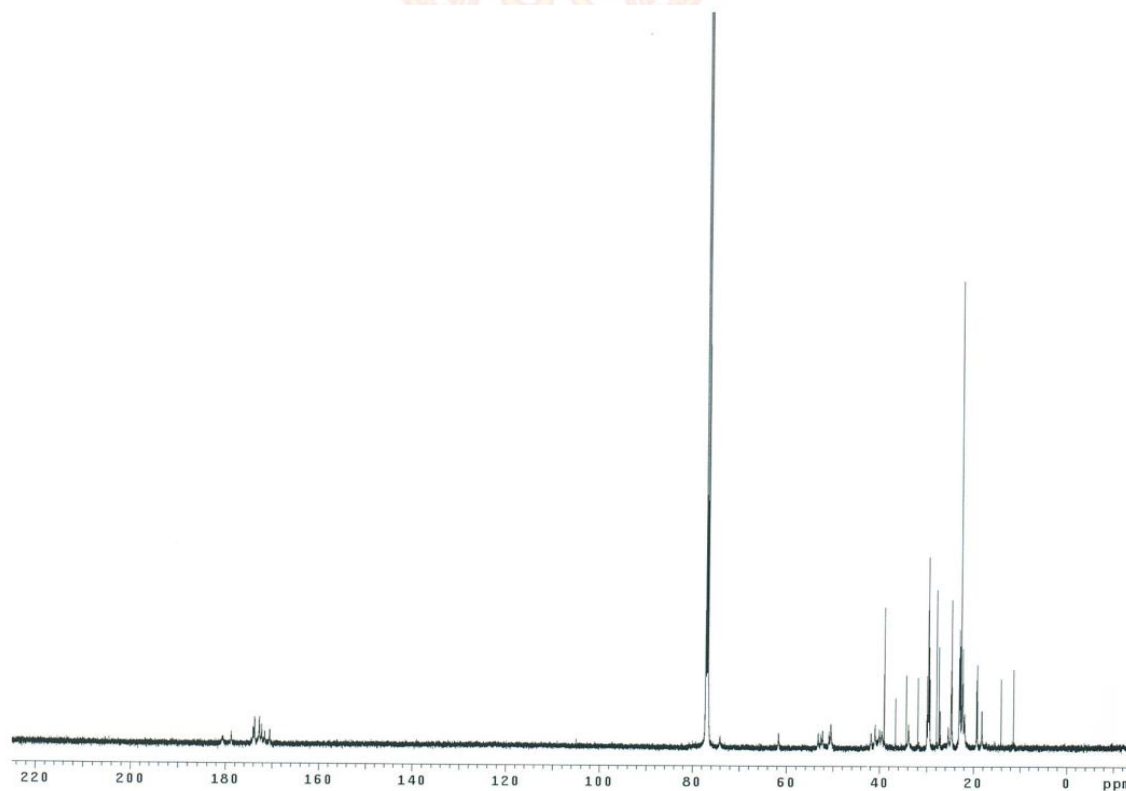
ภาพที่ 16 ไดอะแกรม Differential scanning calorimetry ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03

### 9.3 Nuclear magnetic resonance spectroscopy

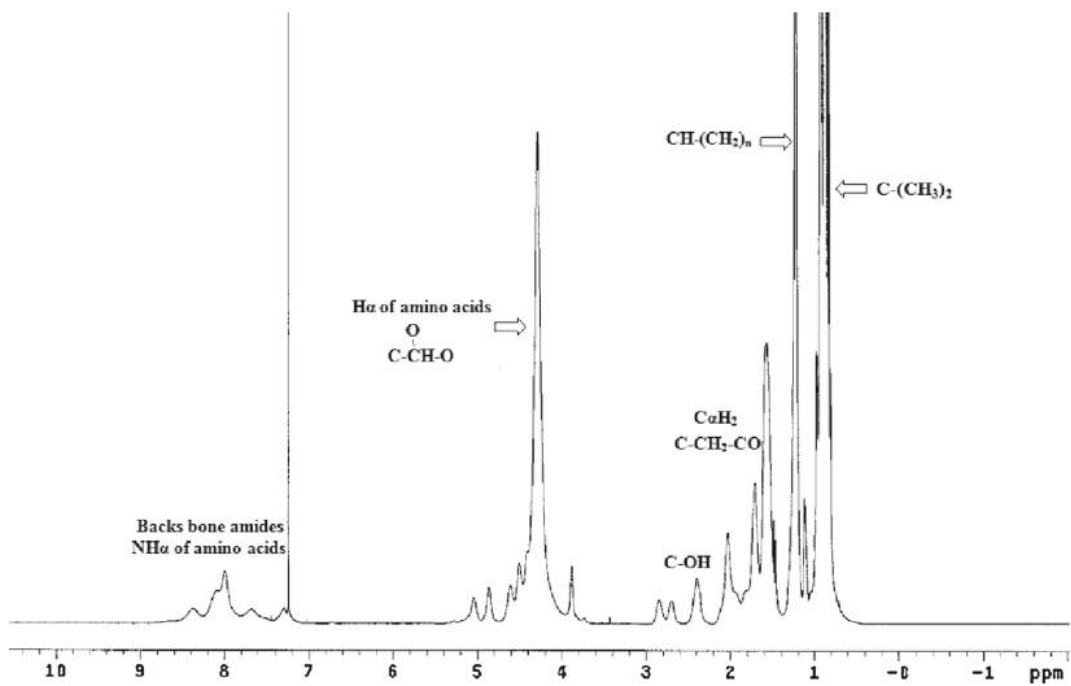
เมื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วย Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) ทั้ง  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (ภาพที่ 17 และ ภาพที่ 18) พบว่าในโครงสร้างของสารตัวอย่างมีโมเลกุลของลิโปเปปไทด์อยู่สังเกตได้จากสัญญาณของหมู่เอมีนที่ 8.4-7.2 ppm ใน  $^1\text{H-NMR}$  สัญญาณที่ 5.0-3.8 ppm มาจาก  $\alpha\text{-H}$  ของหมู่เอมีน สัญญาณที่ 1.0-0.8 ppm มาจาก  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  แสดงว่ามีกรดไขมันอยู่ในโครงสร้างจากการตรวจสอบโครงสร้างด้วย  $^{13}\text{C-NMR}$  พบว่ามีสัญญาณของเมทิล เมทิลีน เอสเตอร์ และหมู่คาร์บอกซิล ที่ 12.0-14.0, 22.0-39.60, 170.0-174.0 และ 181.0 ppm ตามลำดับ รูปแบบโดยรวมของ NMR spectrum ทั้ง  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีรูปแบบคล้ายกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด ลิโปเปปไทด์ที่ชื่อ surfactin ซึ่งผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* HSO121 (ภาพที่ 19 และภาพที่ 20) (Chooklin *et al.* 2014).



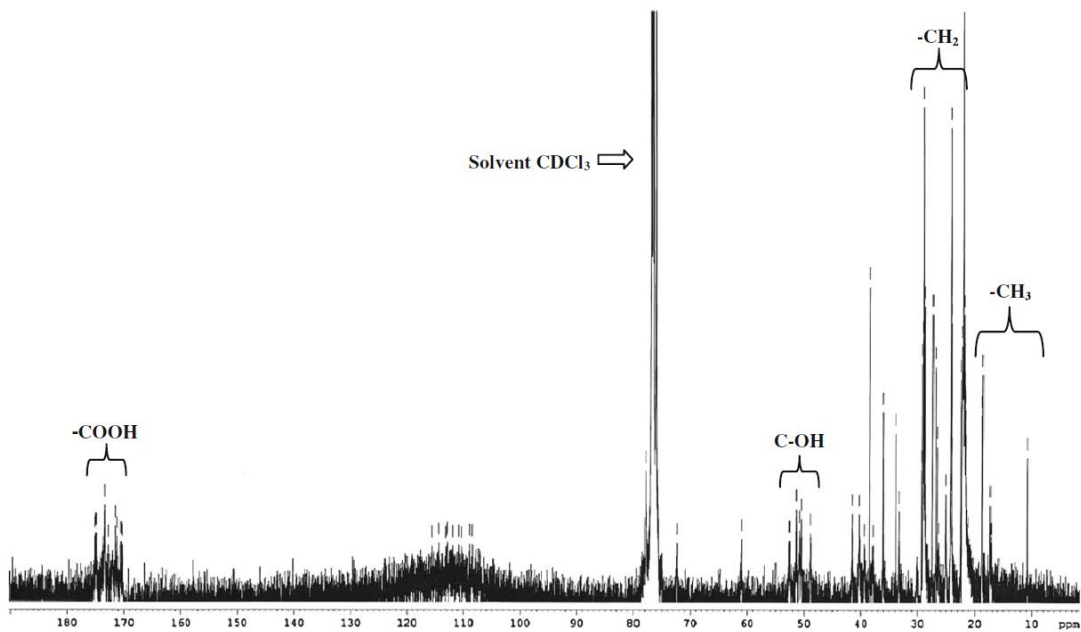
ภาพที่ 17  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03



ภาพที่ 18  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03



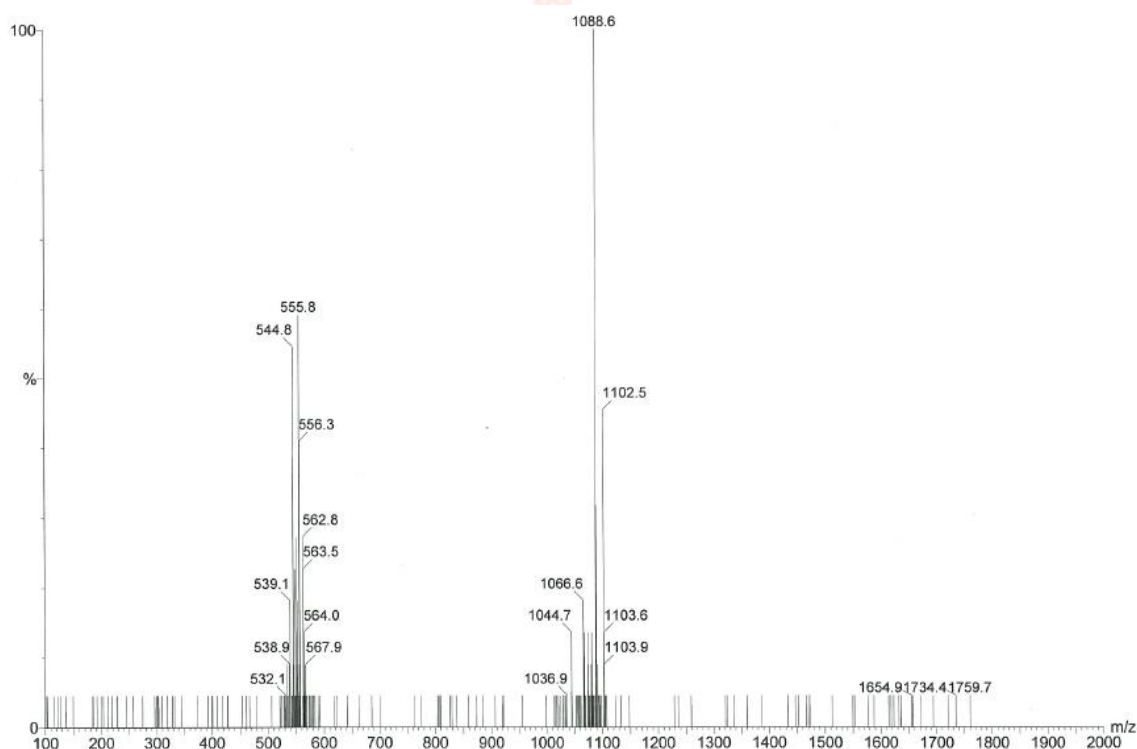
ภาพที่ 19  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Halobacteriaceae archaeon AS65* ที่มา Chooklin *et al.* (2014)



ภาพที่ 20  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Halobacteriaceae archaeon AS65* ที่มา Chooklin *et al.* (2014)

#### 9.4 Mass spectroscopy

ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ด้วย liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS) พบว่าสามารถตรวจพบสัญญาณที่มีมวลโมเลกุลเด่นชัดเท่ากับ 544, 555, 1,088, และ 1,102 m/z (ภาพที่ 21) โดยสัญญาณที่ห่างกัน 14 ดาลตัน มาจากการแตกตัวของหมู่เมทิล ( $\text{CH}_2$ ) มวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 มีค่าเท่ากับ 1088 m/z สอดคล้องกับรายงานของ Mnif และคณะ (2016) ที่ศึกษาพบว่ามวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จะอยู่ในช่วง 996-1,446 m/z โดยเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ในกลุ่ม surfactin, iturin และ fengycin



ภาพที่ 21 Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03

10. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่า (MFC, Minimum Fungicidal Concentration) เชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยวิธี broth microdilution assay

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ทั้ง 7 ไอโซเลท ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ที่สกัดโดยใช้ ethyl acetate ด้วยวิธี broth microdilution assay พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ทั้ง 7 ไอโซเลท (ตารางที่ 12) โดยมีค่า MIC (Minimum Inhibition Concentration) และ MFC (Minimum Fungicidal Concentration) ต่ำสุดเท่ากับ 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบ



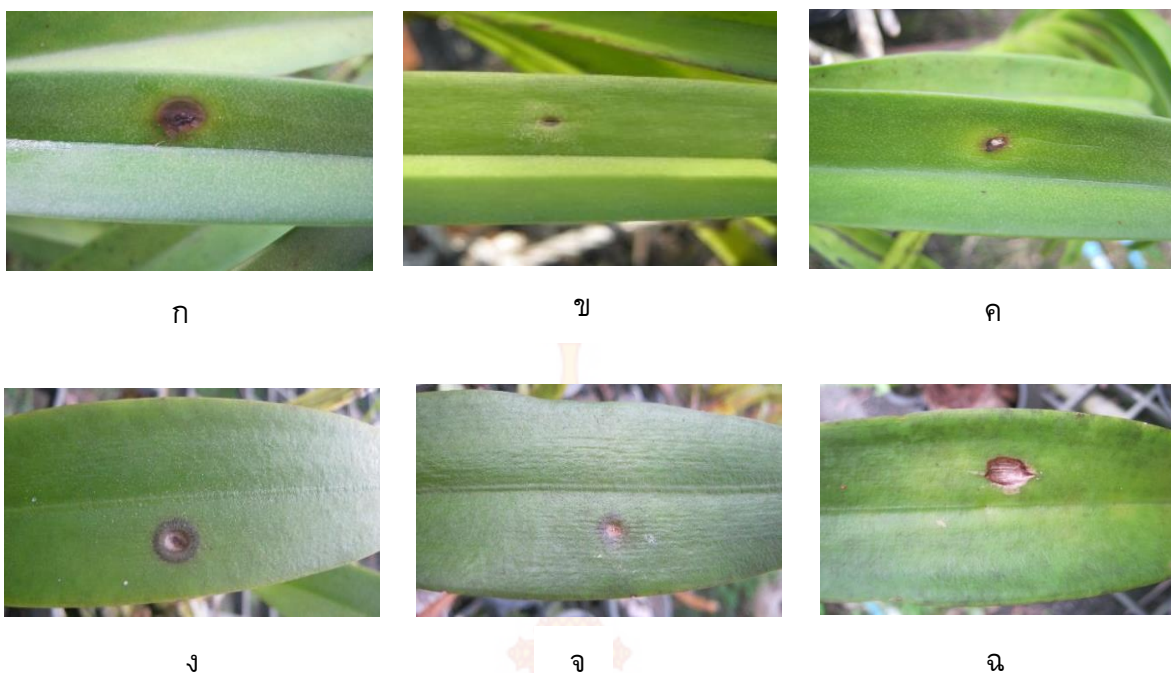
กับเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท AL4 และ AL6 สำหรับเชื้อรา *P. palmivora* ไอโซเลทอื่นๆ มีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.56 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะนำสารสกัดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ไปใช้ยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ในระดับแปลงทดลองต่อไป

ตารางที่ 12 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่า (MFC, Minimum Fungicidal Concentration) เชื้อราของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยวิธี agar diffusion assay

Fungal strain	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)
<i>Phytophthora palmivora</i> AL1	0.56	1.13
<i>Phytophthora palmivora</i> AL2	0.56	1.13
<i>Phytophthora palmivora</i> AL3	0.56	1.13
<i>Phytophthora palmivora</i> AL4	0.28	0.56
<i>Phytophthora palmivora</i> AL5	0.60	1.13
<i>Phytophthora palmivora</i> AL6	0.28	0.56
<i>Phytophthora palmivora</i> AL7	0.60	1.13

11. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ด้วยวิธี detached leaf technique

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้สกุลมอศคาร่าและแคทลียา ในระดับเรือนเพาะปลูก โดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ระดับต่างๆ หลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นพบว่าค่าขนาดของแผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 1.12 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับการใช้สาร fosetyl-Al ในการยับยั้งการเกิดแผล ค่าเฉลี่ยขนาดของแผลในกล้วยไม้ทั้งสองสกุลเท่ากัน คือ 3.0 มิลลิเมตร รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 0.56 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 8.0 และ 10.0 มิลลิเมตร สำหรับมอศคาร่าและแคทลียา ตามลำดับ โดยชุดควบคุมที่มีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 25.0 และ 26.0 มิลลิเมตร สำหรับมอศคาร่าและแคทลียา ตามลำดับ (และ ภาพที่ 22 ตารางที่ 13)



ภาพที่ 22 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่า (ก-ค) และสกุลแคทลียา (ง-ฉ) หลังการปลูกเชื้อ *P. palmivora* AI2 เป็นเวลา 7 วัน: (ก) และ (ง); น้ำกลั่น, (ข) และ (จ); สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, (ค) และ (ฉ); สารfosetyl-Al ความเข้มข้น 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 13 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำในกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและสกุลแคทลียา โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

Treatment	Diameter of infection (mm)	
	Mokara	Cattleya
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อลิตร	12.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	13.0 ± 1.0 <sup>b</sup>
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ความเข้มข้น 0.56 มิลลิกรัมต่อลิตร	8.0 ± 1.5 <sup>c</sup>	10.0 ± 1.5 <sup>c</sup>
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมต่อลิตร	3.0 ± 0.5 <sup>d</sup>	3.0 ± 0.5 <sup>d</sup>
Fosetyl-Al ความเข้มข้น 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	3.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	3.0 ± 0.0 <sup>d</sup>
น้ำกลั่น	25.0 ± 3.0 <sup>a</sup>	26.0 ± 2.0 <sup>a</sup>

\* Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

\*\* Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.0$ )

## บทที่ 4

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

แยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 231 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินน้ำและของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากจังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย 101 ตัวอย่าง นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทำ primary screening โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal salt medium (MSM) ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วัดกิจกรรมการลดแรงดึงผิวโดยวิธี oil displacement plate test พบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการลดแรงดึงผิวจำนวน 85 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 85 ไอโซเลทมาทำ secondary screening โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วัดกิจกรรมการลดแรงดึงผิวโดยวัดค่าแรงดึงผิว ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงดึงผิวได้ดีที่สุดจำนวน 30 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราจากสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย 30 สายพันธุ์โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่าสารลดแรงดึงผิวจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราทดสอบและชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยสารละลายส่วนใสจากเชื้อไอโซเลท CT 03 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราทดสอบมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายส่วนใสจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น โดยสามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora palmivora* Al2 ด้วยค่าวงใส (clear zone) ที่ 10.74 มิลลิเมตร เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเทียบเคียงลำดับของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมบริเวณ 16S rRNA พบว่าเชื้อไอโซเลท CT 03 เป็นมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* PA (KT878384) ถึง 100% องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 คือ อาหาร MSM ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยใช้ น้ำตาลกลูโคสและ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ร้อยละ 4.0 และ 1.0 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง มีค่าการลดแรงดึงผิว ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* Al2 ที่สูงที่สุดเท่ากับ 46 มิลลิวัตตันต่อเมตร ร้อยละ 54 และ 17.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ วิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 คือการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (เอทิลอะซิเตต) สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ 0.94 กรัมต่อลิตร มีค่า CMC ที่ 0.30 กรัมต่อลิตร สารสกัดหยาบที่ได้มีความคงตัว

ในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 5.0 - 10.0 อุณหภูมิในช่วง 25-90 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และ Mass Spectroscopy (MS) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบโดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,088 m/z และมีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และ MFC (Minimum Fungicidal Concentration) ต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora* เท่ากับ 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้สกุลมอศคาร่าและแคทลียาของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยวิธี detached leaf technique พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1.12 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบเท่าสารยั้งเชื้อราทางการค้า (fosetyl-Al)

### ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
2. ศึกษาการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในระดับแปลงทดลอง
3. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดี ควรนำไปทดสอบกับเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มอื่นๆ เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้นต่อไป
4. จากการทดสอบในแปลงทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเทียบเท่าสารยั้งเชื้อราทางการค้า อย่างไรก็ตามควมศึกษาวิธีการในการเก็บรักษาและพัฒนาารูปแบบของสารละลายให้เหมาะสมและสะดวกต่อการใช้งานมากยิ่งขึ้น
5. ควรมีการประชาสัมพันธ์ถึงประโยชน์และข้อดีของการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากธรรมชาติเพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากสารชีวภาพเป็นที่รู้จักและแพร่หลายมากยิ่งขึ้น



## เอกสารอ้างอิง

- จิตรภาพรรณ พิสิท (2542) การผสมพันธุ์กล้วยไม้กระถางดอกหอมเพื่อการส่งออก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ทัศนพร ทศคร (2543) การควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้โดยชีววิธีด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์จากผิวพืช. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิยมรัฐ ไตรศรี. (2541) โรคที่เกิดจากเชื้อราของปทุมมาในส่วนของใบ ต้น ดอก และราก. เอกสารประกอบคำบรรยายการฝึกอบรม หลักสูตรเทคโนโลยีการผลิตหัวพันธุ์ปทุมมาเพื่อการส่งออก. วันที่ 13-14 พฤษภาคม 2541 ณ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 จังหวัด เชียงใหม่. 2 หน้า.
- ปราณี เรืองกระโทก วรัญญู แก้วดวงตา พนิดา อริมัตสี และ วราภรณ์ สุทธิสา (2557) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้หวายเอียสกุล. แก่นเกษตร 42 ฉบับพิเศษ 1:578-582.
- ฝ่ายกักกันพืช (2543) ข้อมูลการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร.
- พิบูลย์ มงคลสุข (2517) โรคเน่าดำของกล้วยไม้ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Phytophthora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัชนิบุญเรือง (2552) การยับยั้งราก่อโรคใบร่วงบนต้นยางพาราด้วยสารสกัดจากพืช. สารนิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2548) กล้วยไม้. ข้อมูลงานค้นคว้าวิจัย สถาบันวิจัยพืชสวน. แหล่งที่มา: <http://www.doa.go.th/data-agri/ORCHID/1stat/st01.html>, 10 พฤษภาคม 2548.
- Abbasi H., Hamed M.M., Lotfabad T.B., Zahiri H.S., Sharafi H., Masoomi F., Moosavi-Movahedi A.A., Ortiz A., Amanlou M., Noghabi K.A. (2012). Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. J. Biosci. Bioeng. 113(2):211-219.
- Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination. 223:143-151.
- Abraham T., Prenner E.J., Lewis R.N., Mant C.T., Keller S., Hodges R.S., McElhaney R.N. (2014). Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1838:1420-1429.
- Abushady H.M., Bashandy A.S., Aziz N.H., Ibrahim H.M.M. (2005). Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. Int. J. Agri. Biol. 7:337-344.

- Antunes L.C., Visca P., Towner K.J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* 71:292-301.
- AOAC International. (2000). Official methods of analysis of AOAC International. 17<sup>th</sup> edition. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.
- Aparna A., Srinikethan G., Smitha H. (2012). Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloid. Surface. B.* 95:23-29.
- APHA, AWWA, WPCF. (1999). Standard methods for the examination of water and waste. (16<sup>th</sup> ed.) APHA, Washington, DC
- Asano T., Senda M., Suga H., Kageyama K. (2010). Development of multiplex PCR to detect five *Pythium* species related to turfgrass diseases. *J. Phytopathol.* 158: 609-615.
- Ausubel F.M., Brent R.E., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1995). Short protocols in molecular biology (3<sup>rd</sup> ed.) John Wiley and Sons, Inc., New York. USA.
- Balaji V., Jeremiah S.S., Baliga P.R. (2011). Polymyxins: antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. *Indian. J. Med. Microbiol.* 29:230-242.
- Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 87:427-444.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (2000). Yeast: Characterization and identification (3<sup>rd</sup> ed) London, UK: Cambridge.
- Baruah R., Mishra S.K., Kalita D.J., Silla Y., Chauhan P.S., Singh A.K., Deka Boruah H.P. (2017). Assessment of bacterial diversity associated with crude oil-contaminated soil samples from Assam. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* doi:10.1007/s13762-017-1294-2.
- Batista S.B., Mounter A.H., Amorim F.R., Totola M.R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Biores. Technol.* 97:868-875.
- Bhardwaj G., Cameotra S.S., Chopra H.K. (2013). Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. *AMB. Express.* 21:68.
- Bicca F.C., Fleck L.C., Ayub M.A.Z. (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev. Microbiol.* 30:231-236.
- Bodour A.A., Drees K.P., Raina M.M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3280-3287.

- Bodour A.A., Maier R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* 32:273-280.
- Cahill D.M., Rookes J.E., Wilson B.A., Gibson L., McDougall K.L. (2008). *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. *Australian. J. Botany.* 56:279-310.
- Chandankere R., Yao J., Cai M., Masakorala K., Jain A.K., Choi M.M.F. (2014). Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel.* 122:140-148.
- Chooklin C.C., Petmeun S., Maneerat S., Saimmai A. (2014). Isolation and characterization of a biosurfactant from *Deinococcus caeni* PO5 by using jackfruit seed powder as a substrate. *Ann. Microbiol.* 64:1007-1020
- Cooper D.G., Goldenberg B.G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:224-229.
- Cooper D.G., Paddock D.A. (1983). *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1426-1429.
- Cooper D.G., Paddock D.A. (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ.* 47:173-176.
- Dahal R.H., Chaudhary D.K., Kim J. (2017). *Acinetobacter halotolerans* sp. nov., a novel halotolerant, alkalitolerant, and hydrocarbon degrading bacterium, isolated from soil. *Arch. Microbiol.* 199:701-710.
- Das P., Mukherjee S., Sen R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Biores. Technol.* 100:1015-1019.
- Desai J.D., Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:47-64.
- El-sersy N.A. (2012). Plackett-Burman design to optimize biosurfactant production by marine *Bacillus subtilis* N10. *Rom. Biotechnol. Lett.* 17:7049-7064.
- Ersek T., Ribeiro O.K. (1996). Mini review article: an annotated list of new *Phytophthora* species described post. *Acta. Phytopathol. Entomol. Hungar.* 45:251-266.
- Fagade O.E., Okolie B.I. Balogun S. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources on biosurfactant producing *Bacillus* species isolates. *Nig. J. Microbiol.* 23:1915-1921.
- Fernandez J.M., Plaza C., Polo A., Plante A.F. (2012). Use of thermal analysis techniques (TG-DSC) for the characterization of diverse organic municipal waste streams to predict biological stability prior to land application. *Waste. Manag.* 32(1):158-64.
- Folman L.B., Postma J., van Veen J.A. (2003). Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. *Microbiol. Res.* 158:107-15.

- Folmsbee M., Duncan K., Han S.O., Nagle D., Jennings E., McInerney M. (2006). Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojavensis* strain JF-2. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:645-649.
- Fonseca R.R., Silva A.J.R., de Franca F.P., Cardoso V.L., Servulo E.F.C. (2007). Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 471:136-140.
- Gadd C.H. (1924). *Phytophthora faberi* Maubl. *Ann. Roy. Bot. Peradeniga.* 9:47-90.
- Ghribi D., Ellouze-Chaabouni S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnol Res Int* doi:10.4061/2011/653654.
- Gnanamani A., Kavitha V., Radhakrishnan N., Mandal A.B. (2010). Bioremediation of crude oil contamination using microbial surface-active agents: isolation, production and characterization. *J. Bioremed. Biodegrad.* 1:107-115.
- Gogotov I.N., Miroshnikov A.I. (2009). The influence of growth medium composition and physicochemical factors on biosurfactant production by the bacterium *Bacillus licheniformis* VKM B-511. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45:588-592.
- Hamzah M., Manikan V., Abd Aziz N.A.F. (2017). Biodegradation of tapis crude oil using consortium of bacteria and fungi: optimization of crude oil concentration and duration of incubation by response surface methodology. *Sains. Malaysiana.* 46:43-50.
- Hayder N.H., Alaa S., Abdulmalik H. (2014). Optimized conditions for bioemulsifier production by local *Streptomyces* sp. SS 20 isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Rom. Biotechnol. Lett.* 19:8979-8993.
- He H., Shen B., Korshalla J., Carter G.T. (2001). Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus curculans* J2154. *Tetrahedron.* 57:1189-1195.
- Hewald S., Josephs K., Bolker M. (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3033-3040.
- Hoakova M., Jezdik R., Schreiberova O., Chudoba J., Sir M., Cejkova A., Masak J., Jirku V., Rezanka T. (2015). Structural and physicochemical characterization of rhamnolipids produced by *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* in single strain and mixed cultures. *J. Biotechnol.* 193:45-51.
- Hommel R.K., Stower O., Staber W., Haferburg D., Kleber H.P. (1987). Production of water soluble surface active exolipids by *Torulopsis agricola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:199-205.
- Jeffers S.N., Martin S.B. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pyrhium* species. *Plant. Disease.* 70:1038-1043.



- Joshi S., Bharucha C., Desai A.J. (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Biores. Technol.* 99:4603-4608.
- Judelson H.S., Blanco F.A. (2005). The spores of Phytophthora: weapons of the plant destroyer. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:47-58.
- Katamai W. (2009). Screening of biosurfactant-producing yeast, purification, characterization and application. Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Thailand.
- Kim P.I., Ryu J., Kim Y.H., Chi Y.T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:138-145.
- Kosaric N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food. Technol. Biotechnol.* 39:295-304.
- Lang S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* 7:12-20.
- Liu G., Zhong H., Yang X., Liu Y., Shao B., Liu Z. (2017). Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: a review. *Biotechnol. Bioeng.* 15(4):796-814.
- Liu X.Y., Yang S.Z., Mu B.Z. (2009). Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Process Biochem.* 44:1144-1151.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lukacs A., Korting H.C., Lemke O., Ruckdeschel G., Ehret W. (1995). Braun-Falco O. The influence of the pH-value on the growth of *Brevibacterium epidermidis* in continuous culture. *Acta. Derm. Venereol.* 75:280-2.
- Maneerat S., Bamba T., Harada K., Kobayashi A., Yamada H., Kawai F. (2006). A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *App. Micro. Biotechnol.* 70(2): 254-259.
- Maneerat S., Phetrong K. (2007). Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29(3):781-791.
- Mani P., Sivakumar P., Balan S.S. (2016). Economic production and oil recovery efficiency of a lipopeptide biosurfactant from a novel marine bacterium *Bacillus simplex*. *Achieve. Life. Sci.* 10:102-110.
- McInerney M.J., Javaheri M., Nagle Jr. D.N. (1990). Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *J. Ind. Microbiol.* 5:95-102.

- Mercade M.E., Monleon L., de Andres C., Rodon I., Martinez E., Espuny M.J., Manresa, A. (1996). Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *J. Appl. Bacteriol.* 81:161-166.
- Mnif I., Grau-Campistany A., Coronel-León J., Hammami I., Triki M.A., Manresa A., Ghribi D. (2016). Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23(7):6690-9.
- Mukherjee A.K., Das K. (2010). Microbial surfactants and their potential applications: an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672:54-64.
- Mukherjee S., Das P., Sivapathasekaran C., Sen R. (2009). Antimicrobial biosurfactant from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:281-288.
- Nagal S., Jain P.C. (2010). Production of feather hydrolysate by *Elizabethkingia meningoseptica* KB042 MTCC 8360 in submerged fermentation. *Indian. J. Microbiol.* 50:541-545.
- Najafia A.R., Rahimpoura M.R., Jahanmiria A.H., Roostaazadb R., Arabianb D., Ghobadib Z. (2010). Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *J. Chem. Eng.* 163:188-194.
- Noparat P., Maneerat S., Saimmai A. (2014). Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 30:865-877.
- Osterreicher-Ravid D., Ron E.Z., Rosenberg E. (2000). Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. *Environ. Microbiol.* 2:366-372.
- Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12:633-654.
- Park C.B., Lee S.B. (1998). Ammonia production from yeast extract and its effect on growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 3:115-118.
- Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. (2013). Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food. Bioprod. Process.* 91:149-157.
- Pirog T.P., Konon A.D., Beregovaya K.A., Shulyakova M.A. (2014). Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus*

- erythropolis* IMB Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Mikrobiologija*. 83:631-9.
- Providenti M.A., Flemming C.A., Lee H., Trevors J.T. (1995). Effect of addition of rhamnolipid biosurfactant or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 17:15-26.
- Rahman K.S.M., Rahman T.J., Kourkoutoas Y., Petsas I., Marchant R., Banat I.M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipids and micronutrients. *Biores. Technol.* 90:159-168.
- Rasooli I., Abyaneh M.R. (2004). Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food. Cont.* 15:479-483.
- Ristaino J.B., Gumpertz M.L. (2000). New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38:541-576.
- Ron E.Z., Rosenberg E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3:229-236.
- Saimmai A., Rukadee O., Onlamool T., Sobhon V., Maneerat S. (2012). Characterization and phylogenetic analysis of microbial surface active compounds-producing bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168:1003-1018.
- Saimmai A., Sobhon V., Maneerat S. (2011). Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165:315-335.
- Saimmai A., Udomsilp S., Maneerat S. (2013). Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium of *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 grown on low-cost raw materials. *Ann. Microbiol.* 63:1327-1339.
- Saisard K., Maneerat S., Saimmai A. (2013) Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. *Biotechnol.* 94:275-284.
- Saisard K., Saimmai A., Maneerat S. (2014). Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.* 36:163-175.
- Sazykin I., Sazykina M., Khmelevtsova L., Khammami M., Karchava S., Zhuravleva M., Kudeevskaya E. (2016). Expression of SOD and production of reactive oxygen species in *Acinetobacter calcoaceticus* caused by hydrocarbon oxidation. *Ann. Microbiol.* 66:1039-1045.

- Schulz D., Pasheri A., Schmidt M., Lang S., Wagner F., Wray V., Gunkel W. (1991). Marine biosurfactants, I. screening for biosurfactant among crude oil degrading marine microorganisms from the north sea. *Z. Naturforsch.* 46:197-203.
- Shekhar S., Sundaramanickam A., Balasubramanian T. (2015). Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45:DOI:10.1080/10643389.2014.955631.
- Silva N.M.P., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. (2014). Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3:132-139.
- Singer M.E., Tyler S.M., Finnerty W.R. (1985). Growth of *Acinetobacter* sp. strain HO1-N on *n*-hexadecanol:physiological and ultrastructural characteristics. *J. Bacteriol.* 162:162-169.
- Singh P., Jain R., Srivastava N., Borthakur A., Pal D.B., Singh R., Madhav S., Srivastava P., Tiwary D., Mishra P.K. (2017). Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: a review. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 47(3):155-201.
- Uchida J.Y., Aragaki M. (1991). *Phytophthora* diseases of orchids in Hawaii. Honolulu (HI): University of Hawaii. Research Extension Series; RES-129.
- Uzoigwe C., Burgess J.G., Ennis C.J., Rahman P.K. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front. Microbiol.* 6:245.
- Varjani S.J., Upasani V.N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 232:389-397.
- Vasdinyei R., Deak T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. Food. Microbiol.* 86:123-170.
- Vaz D.A., Gudina E.J., Alameda E.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloid. Surf.* 89:167-174.
- Wang J., Ji G., Tian J., Zhang H., Dong H., Yu L. (2011). Functional characterization of a biosurfactant-producing thermo-tolerant bacteria isolated from an oil reservoir. *Pet. Sci.* 8:353-356.
- Wang S.L., Mulligan C.N. (2009). Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. *Process. Biochem.* 44:296-301.



- Wei Y.H., Chou C.L., Chang J.S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *J Biochem Eng* 27:146-154.
- Wei Y.H., Lai C.C., Chang J.S. (2007). Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Proc. Biochem.* 42:40-45.
- Wilkinson S.G. (1972). Composition and structure of the ornithine-containing lipid from *Pseudomonas rubescens*. *Biochem. Biophys. Acta.* 270: 1-17.
- Yeh M.S., Wei Y.H., Chang J.S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Proc. Biochem.* 41:1799-1805.
- Younis M.A.M., Hezayen F.F., Nour-Eldein M.A., Shabeb M.S.A. (2010). Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *American-Eurasian. J. Agricul. Environ. Sci.* 7:31-37.
- Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L., Bertagnolli B.L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil. Biol. Biochem.* 34:955-963.
- Zhao B.G., Wang Z.S., Zhou A.G., Wang L.Z., Yu Q.L. (2009). Effect of microbial degradation lignin on fermentation characteristic of distillers grain *in vitro*. *Pakistan. J. Nutri.* 8:1411-1414.
- Zhao Z., Wong J.W. (2009). Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Technol.* 30:291-299.