การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการคืนกลับของน้ำมัน และการบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน

Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria for Application of Oil Recovery and Oil Pollution Remediation

ศิริพรรณ สารินทร์

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน เช่น อู่ซ่อมรถ (G) และบริเวณบ่อดักตะกอนน้ำมันของหลุมขุดเจาะน้ำมัน แหล่งสิริกิติ์ อำเภอลานกระบือ จังหวัดกำแพงเพชร จำนวน 3 บริเวณ ได้แก่ หลุมขุดเจาะน้ำมัน K(LK), F(LF) และ C(LC) ศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการประยุกต์ใช้ในการคืนกลับของน้ำมันและการบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน จากผลการศึกษาพบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 50 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการวัดค่า Emulsifying capacity (EC) และ Emulsification activity (EA) พบว่า ไอโซเลท LK5 ให้ค่า EC สูงที่สุด คือ 31.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท G2 ให้ค่า EA สูงที่สุด คือ 83.1 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทจัดอยู่ในสายพันธุ์ *Enterobacter cloacea* เมื่อทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared พบว่า ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน NH_2, OH, C-H(CH_2,CH_3), COOH, C=C, C=N และเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพพบว่า สามารถทำให้เกิดการคืนกลับของน้ำมัน (Oil recovery) ได้โดยเฉลี่ยประมาณ 51.7 และ 45.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถชะน้ำมันออกจากเม็ดทราย (Oil removal) ได้โดยเฉลี่ยประมาณ 75.7 และ 77.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันทั้งสองแหล่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคืนกลับของน้ำมันและการบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The aims of this research were to study 1) biosurfactant-producing bacteria isolated from oil contaminated soil, 2) the chemical composition of biosurfactant and 3) the potential of biosurfactant in enhancing oil recovery and oil pollution remediation. Fifty bacterial isolates were screened for biosurfactant production when grown in submerged culture with crude oil soil sediments from the Sirikitti petroleum refinery, Lankrabeor, Kampangpet (LK, LF and LC site) and lubricating oil for the garage soil sample. The highest emulsification capacity (EC) obtained from the isolate LK5 was 31.1 % and the highest emulsifying activity (EA) of 83.1 % was given by the isolate G2. Both isolates were then found to be same specie, as *Enterobacter cloacea*. The extracted and partial purified surface–active compounds produced by these isolates were identified by means of FT-IR spectroscopy and revealed the chemical groups of NH_2, OH, C-H(CH_2,CH_3), COOH, C=C, C=N and CO-NH_2 in the components. The evaluation of *E. cloacea* LK5 and *E. cloacea* G2 crude biosurfactants for theirs de-emulsification capabilities in enhancing oil recovery using a surfactant-stabilized kerosene-water model system were 51.7 and 45.4 %, respectively, while the ability of both crude biosurfactants in oil removal using sand pack test were 75.7 and 77.7 %, respectively, in 24 hours, indicating their potential application in microbiologically for enhancing oil recovery and oil pollution remediation.

คำสำคัญ (Keywords) : biosurfactant, oil recovery, oil pollution remediation

1. บทนำ

สารลดแรงตึงผิวที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ถูกนำมาใช้ในกระบวนต่างๆ ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมัน โดยใช้คุณสมบัติในการทำให้เกิด emulsification/de-emulsification เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันดิบจากกระบวนการขุดเจาะมากขึ้น รวมทั้งการลำเลียงน้ำมันดิบในท่อส่งน้ำมัน การทำความสะอาดถังเก็บน้ำมัน การนำส่วนที่เป็นของเสีย (liquid waste) กลับมาใช้ใหม่ (oil recovery) และการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนน้ำมัน(oil pollution remediation) แต่สารเคมีเหล่านี้บางชนิดไม่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้และยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลายชนิดที่ผลิตจาก จุลินทรีย์ได้แสดงให้เห็นว่า มีคุณสมบัติดังกล่าวดีพอๆ กับการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ และมีต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำ [1] ซึ่งในอุตสาหกรรมน้ำมันนั้น ไม่ว่าจะเป็นในกระบวนการขุดเจาะหรือกระบวนการผลิตก็สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ประโยชน์ได้ โดยใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการขุดเจาะน้ำมันดิบจะมีน้ำและก๊าซธรรมชาติปนขึ้นมาด้วย ซึ่งน้ำมันดิบกับน้ำเป็นของเหลวที่ไม่สามารถละลายซึ่งกันได้ จำเป็นต้องใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็น emulsifier ทำหน้าที่เป็นตัวที่เชื่อมโยงของเหลวสองชนิดเข้าด้วยกันกระจายตัวอยู่ในรูปสารแขวนลอยเพื่อลดแรงตึงผิว โดยการผสมสารลดแรงตึงผิวกับน้ำและฉีดเข้าไปในบ่อน้ำมัน ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะ oil - water emulsion ที่เป็นของเหลวผสมที่ประกอบด้วยหยดน้ำมันกระจายไปทั่วน้ำ ทำให้ได้น้ำมันดิบจากบ่อน้ำมันเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ในขั้นตอนของการลำเลียงน้ำมันดิบที่ได้จากกระบวนการขุดเจาะน้ำมันดิบไปตามท่อส่งนั้น น้ำมันดิบที่อยู่ในสภาพ oil - water emulsion สามารถทำให้เกิดการกัดกร่อนของท่อลำเลียงและเกิดการตกตะกอน ทำให้ลำเลียงน้ำมันได้ปริมาณน้อยลง [2] ซึ่งโดยปกติแล้วในช่วงที่มีการลำเลียงน้ำมันดิบไปตามท่อส่ง ปริมาณของตะกอนและน้ำที่ยอมให้มีปะปนได้สูงสุดในน้ำมันดิบควรอยู่ประมาณ 0.5 - 2.0% เท่านั้น [3] ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันในระบบท่อลำเลียงเพิ่มมากขึ้น ลดการกัดกร่อนของท่อและการตกตะกอน สามารถใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติทำให้เกิด de - emulsification เพื่อลดสภาพ oil - water emulsion โดยใช้คุณสมบัติการเป็น hydrophobic ของผิวเซลล์จุลินทรีย์ (cell surface) หรือคุณสมบัติ hydrophobic/ hydrophilic ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้าไปแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ emulsifier ของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในช่วงของกระบวนการขุดเจาะน้ำมันดิบ [4] นอกจากนี้ในขั้นตอนการขุดเจาะแหล่งน้ำมันดิบจะเกิด liquid waste ขึ้น ซึ่งสามารถทำการกำจัดได้โดยใช้สารเคมี แต่ทำให้มีต้นทุนสูง เนื่องจากราคาของสารเคมีแพง อีกทั้งยังก่อให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้ ส่วนในขั้นตอนของการลำเลียงน้ำมันดิบไปตามท่อส่งก็สามารถเกิดตะกอนบริเวณผนังท่อได้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจากเวลากลางวันเป็นกลางคืนทำให้น้ำมันดิบเกิดการตกตะกอนและไปจับกับผนังท่อ จึงทำให้ต้องมีการทำความสะอาดท่อโดยใช้สารเคมีอยู่บ่อยครั้งเพื่อลดการอุดตัน แต่ตะกอนที่เกิดขึ้นมานี้ยังมีน้ำมันดิบปนอยู่ ซึ่งถ้ามีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพก็จะสามารถนำน้ำมันกลับมาใช้ใหม่ได้ และลดการอุดตันภายในท่อลำเลียง สำหรับการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนนั้น โดยเฉพาะการนำมาย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน เกิดขึ้นได้เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ (solubilization) ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น [5],[6] หรือเกิด emulsification และลดการถูกดูดซับของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยอินทรียวัตถุในดิน ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสภาพหรืออยู่ในรูปที่ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ง่ายขึ้น (bioavailable form) ซึ่งมีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ [7]

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และทดสอบประสิทธิภาพในการคืนกลับของน้ำมันและด้านบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีการวิจัย

2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM, ที่ประกอบด้วยสารละลาย A 1 ลิตร และสารละลาย B 1 มิลลิลิตร โดยสารละลาย A 1 ลิตร ประกอบด้วย $NaNO_3$ 2.5 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 กรัม NaCl 1.0 กรัม KCl 1.0 กรัม $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05 กรัม Phosphoric acid (85%) 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วย KOH และสารละลาย B ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 กรัม $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.5 กรัม Boric acid 0.3 กรัม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.15 กรัม และ $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร) [8] ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี crude oil และน้ำมันหล่อลื่น (10W-40, Shell) อยู่ 2% (v/v) สำหรับทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณบ่อดักตะกอนน้ำมันของหลุมขุดเจาะน้ำมัน แหล่งสิริกิติ์ อำเภอลานกระบือ จังหวัดกำแพงเพชร จำนวน 3 บริเวณ ได้แก่ หลุมขุดเจาะน้ำมัน K (LK), F (LF) และ C (LC) และบริเวณอู่ซ่อมรถ (G) ตามลำดับ ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างดินลงไป 5 กรัม แล้วนำไปเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ปิเปตน้ำหมัก (fermentation broth) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10%) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ซึ่งมี crude oil หรือน้ำมันหล่อลื่น 2% (v/v) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ จากนั้นนำไปเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำเช่นนี้ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มี crude oil หรือน้ำมันหล่อลื่นใหม่ทุกครั้งๆ ละ 72 ชั่วโมง จนครบ 4 ครั้ง รวมระยะเวลาการบ่มเชื้อทั้งหมด 12 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา นำน้ำหมักจากชุดทดลองสุดท้ายไปทำเจือจาง (serial dilution) ด้วย sterile saline 0.85% (w/v) แล้วเกลี่ย (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าว ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ cross streak plate และถ่ายเชื้อลงในอาหารวุ้นเอียง (Nutrient agar slant) ไว้ใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี drop-collapse และวิธีทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement area; ODA)

2.2.1) การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี drop-collapse [8] ทำโดยการเพาะเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง 1 ลูป ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM และ กลูโคส 2% (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ จากนั้นนำไปเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เตรียม assay plates โดยการทำความสะอาด microwells plate โดยการชะล้างด้วยน้ำกลั่นต้มเดือด 3 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย 75% ethanol และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการเคลือบ microwells plate แต่ละหลุมให้มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ด้วยน้ำมันหล่อลื่น 1.8 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้น้ำมันที่เคลือบไว้คงตัว ปิเปตน้ำหมักลงตรงกลางหลุมของ microwells plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เคลือบน้ำมันเตรียมไว้ แล้วสังเกตผลที่เกิดขึ้นภายในเวลา 1 นาที แล้วทำการทดสอบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ sodium dodecyl sulfate (SDS) ถ้าหยดน้ำมันที่เกิดขึ้นยังคงมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ ให้แสดงผลเป็นลบ และถ้าเกิดการสลายของหยดน้ำมัน ให้แสดงผลเป็นบวก

2.2.2) การทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน [9] ทำโดยปิเปตน้ำมันหล่อลื่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 95 มิลลิเมตร ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ขึ้นทันที ค่อยๆ หยดน้ำหมัก ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนตรงกลางของแผ่นฟิล์มน้ำมัน ซึ่งจะทำให้เกิดช่องว่างใสขึ้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงกลมใสที่เกิดขึ้นแล้วนำไปคำนวณจากสูตร

ODA = 22/7 (รัศมี)^2 ตารางเซนติเมตร

2.3 การทดสอบคุณสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Emulsification capacity test (EC) [10] ซึ่งสามารถทำได้ดังนี้คือ ปิเปตน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตรและ 0.02 M Tris-HCl buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง (ขนาด 1.6 x 15 ซม.) จากนั้นเติมน้ำมันหล่อลื่นลงไป 2 หยด แล้วทำการชั่งน้ำหนักไว้ [ให้เป็น W_1 (หักน้ำหนักหลอด)] เติมน้ำมันหล่อลื่นลงไปอีก 2 หยด ทำให้ผสมกันโดยใช้เครื่องผสม (vortex) ที่ระดับความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที ตรวจผลการทดลอง โดยตรวจลักษณะของอิมัลชันว่าเกิดการสลายตัวหรือไม่ ถ้าไม่สลายตัวให้ทำซ้ำ โดยเติมน้ำมันหล่อลื่นลงไปอีก 2 หยด ทำให้ผสมกันโดยใช้ vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที ทำไปเรื่อยๆ จนลักษณะของอิมัลชันสลายตัว แล้วทำการชั่งน้ำหนักไว้ [ให้เป็น W_2 (หักน้ำหนักหลอด)] นำค่ามาแทนในสูตร

$\%EA = (W_2 - W_1)/W_1 \times 100$

และทำการทดสอบ Emulsification activity test (EA) [11] โดยนำน้ำมันก๊าดปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำหมักอยู่ 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วย vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งพักทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกความคงตัวของการเกิดอิมัลชัน (emulsion stability) นำค่ามาแทนในสูตร

%EA = (ความสูงของของเหลวที่เกิดอิมัลชัน/ ความสูงของของเหลวทั้งหมด) x 100

2.4 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยดูการติดสีแกรม (Gram's stain) และการทดสอบทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API system (bioMerieux Vitek, Inc)

2.5 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ทำการเก็บน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ (supernatant) ไปปรับ pH ให้เท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.0 ด้วย 6 M HCl แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตะกอนที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ปรับ pH เท่ากับ 2.0 เป็นจำนวน 3 ครั้ง ตะกอนที่ได้เรียกว่า "acid precipitate" จากนั้นนำมาละลายกับน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 2 M NaOH แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer [12] นำตะกอน acid precipitate มาสกัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยการเติมเมทานอล/คลอโรฟอร์ม โดยใช้ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันในกรวยแยก โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะละลายอยู่ในชั้นของตัวทำละลายส่วนบน แล้วนำมาสกัดซ้ำอีก 5 ครั้ง รวบรวมตัวทำละลายที่ได้ทั้งหมดมากำจัดตัวทำละลายออกด้วยการระเหยโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยหมด ได้ของเหลวหนืดสีขาวขุ่น นำไปทำให้แห้งและเก็บไว้เป็น "crude biosurfactant" เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป [13]

2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared (FT-IR) เพื่อหาหมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่องมือ FT-IR spectroscopy โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการประยุกต์ใช้

2.7.1) การคืนกลับของน้ำมัน (Oil recovery) นำ "crude biosurfactant" ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพ Oil recovery ด้วยวิธีทดสอบการเกิด De-emulsification โดยใช้ Kerosene emulsion model [4] ซึ่งทำโดยการเตรียมสารเคมีที่ 1 ประกอบด้วยน้ำมันก๊าด (Kerosene oil) ปริมาตร 1 ลิตรที่มี span 80 อยู่ 0.8 กรัม และสารเคมีที่ 2 ประกอบด้วย น้ำกลั่นปราศจาก อิออนปริมาตร 1 ลิตรที่มี tween 80 อยู่ 1 กรัม ทำการปิเปตสารเคมีที่ 2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไปในหลอดทดลองแล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นค่อยๆ หยดสารเคมีที่ 1 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ลงไปให้ผสมกับสารเคมีที่ 2 บนเครื่อง vortex เมื่อหยดสารเคมีที่ 1 จนหมดแล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ต่อไปอีก 3 นาที แล้ววัดความสูงของอิมัลชันที่เกิดขึ้น ปิเปต crude biosurfactant ที่ละลายอยู่ใน 0.02 M Tris-HCl pH 7.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 0.6 % (w/v) ใส่ลงไปในหลอดทดลองแล้วนำไปทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ประมาณ 3 นาที ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง บันทึกความสูงของอิมัลชันที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเปรียบเทียบกับ SDS และ 0.02 M Tris-HCl buffer นำผลการทดลองที่ได้ มาคำนวณจากสูตร

% Oil recovery = (ความสูงของอิมัลชันทั้งหมด – ความสูงของอิมัลชันที่เหลืออยู่)/ความสูงของอิมัลชันทั้งหมด X 100

2.7.2) การบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน (Oil removal) นำ "crude biosurfactant" ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี Sand pack test [13] ซึ่งมีวิธีทดสอบดังนี้คือ ทำการเตรียมทรายคอลัมน์ (Sand pack column) โดยทำการร่อนทรายละเอียด โดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 250 – 500 ไมครอน แช่ทรายในน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มี HCl ความเข้มข้น 1 โมล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปอบที่อุณหภูมิ105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนทรายแห้ง ทำการชั่งทรายหนัก 50 กรัม เทใส่ลงในบิวเรตต์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่ทำความสะอาดแล้วด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 1 โมลแล้ว จากนั้นทำการเติม kerosene oil ปริมาตร 10 มิลลิลิตร รอจนกระทั่ง kerosene oil ซึมผ่านทรายจนถึงปลายบิวเรตต์ ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้ทรายอิ่มตัวด้วย kerosene oil แล้วจึงเติม crude biosurfactant ที่ละลายใน 0.02 M Tris-HCl buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 0.6 % (w/v) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกปริมาตรน้ำมันที่ออกมาโดยเปรียบเทียบกับ Tris HCl buffer และ SDS นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณจากสูตร

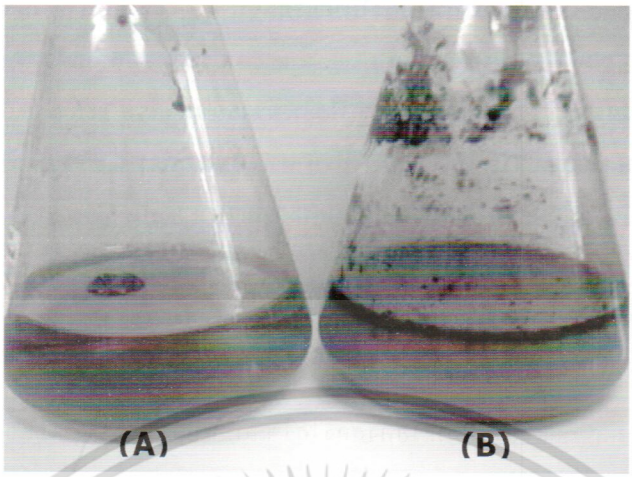
% Oil removal = ปริมาณ kerosene oil ที่ออกมา/ปริมาณ kerosene oil ที่เติม x 100

3. ผลการวิจัย

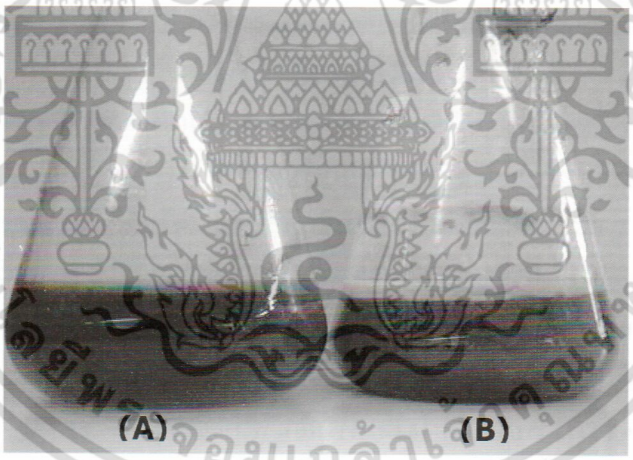
3.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน

ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้จากดินบริเวณ LK, LF, LC และ G ในอาหาร MSM ซึ่งมี crude oil หรือน้ำมันหล่อลื่น 2% เป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะกายภาพของน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ (รูปที่ 1 และ 2) และเมื่อนำมาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวิธี drop-collapse และวิธีหาค่า ODA ได้แบคทีเรียจำนวน 50 ไอโซเลท และเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบประสิทธิภาพ Emulsification capacity (%EC) และ Emulsification activity (%EA) ดีที่สุดจำนวน 6 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) พบว่าแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ให้ %EC สูงที่สุด เท่ากับ 31.1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลท LK5 แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความสามารถในการรองรับปริมาณน้ำมันที่ทำให้เกิดอิมัลชันได้มากที่สุด เมื่อนำไปใช้ส่งเสริมการเร่งกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะใช้ในปริมาณเล็กน้อยก็สามารถเกิดอิมัลชันได้ในปริมาณมาก [11] และแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ให้ค่า %EA สูงที่สุด เท่ากับ 83.1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลท G2 ซึ่ง %EA เป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้น้ำมันเกิดอิมัลชันกับน้ำ เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เท่ากัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงมีคุณสมบัติในการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้นและช่วยให้แบคทีเรียเข้าสัมผัสกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้มากขึ้น และเกิดย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ง่ายยิ่งขึ้นด้วย [6]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะกายภาพของน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินจากบริเวณแหล่งขุดเจาะน้ำมัน (LK, LF และ LC) ในระยะเวลา 12 วัน (B) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A)



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะกายภาพของน้ำมันหล่อลื่นโดยจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินจากบริเวณอู่ซ่อมรถ (G) ในระยะเวลา 12 วัน (B) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่คัดลือก

ไอโซเลท	EC (%)	EA (%)
LK5	31.1	56.7
LC1	5.1	53.3
LC2	6.3	52.9
LC11	15.4	48.8
LC12	3.151	55.4
G2	24.5	83.1

3.2 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท LK5 และ G2 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันคือ *Enterobacter cloacae* (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Toledo และคณะ [14] ที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. ได้จากตะกอนน้ำมัน และBatista และคณะ [15] พบว่า ส่วนใหญ่แบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบปิโตรเลียมเป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนชนิดแกรมลบ

3.3 ผลการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ผลจากการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากเชื้อ *E. cloacae* LK5 และ *E. cloacae* G2 มาสกัดและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนได้สารที่มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่นและเหนียว และเมื่อนำไปทดสอบเพื่อหาค่า %EC และ %EA พบว่า *E. cloacae* LK5 และ *E. cloacae* G2 มีค่า %EC เท่ากับ 33.9 และ 29.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับ %EA มีค่าเท่ากับ 73.8 และ 91.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นจากการทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก่อนทำการสกัด (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการสกัดแล้วมีความเข้มข้นมากขึ้น จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้เพิ่มขึ้น

3.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเทคนิค FT-IR เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าโครงสร้างหลักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยเชื้อ *E. cloacae* LK5 และ *E. cloacae* G2 ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน NH_2, OH, C-H(CH_2,CH_3), COOH, C=C, C=N และ CO-NH_2 (ตารางที่ 3) ซึ่งโครงสร้างหลักของสารสกัดที่ได้จากเชื้อนี้ ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าเป็นสารกลุ่มใด เนื่องจากมีสารประกอบอินทรีย์บางส่วนที่มาจากส่วนประกอบของสารเยื่อเมือก (exopolysaccharide) ของเซลล์แบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ [16] จึงทำให้มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่นและเหนียว แต่เนื่องจากสารเยื่อเมือกมีคุณสมบัติเป็น bioemulsifier ซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับของเหลว (liquid-liquid interface tension) จึงสามารถทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำมันและน้ำได้ [15]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียไอโซเลท LK5 และ G2

ลักษณะ	ปฏิกิริยา
Gram reaction	-ve
β-galactosidase production	+
(ortho-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside)	
Arginine dihydrolase production	+
Lysine decarboxylase production	-
Ornithine decarboxylase production	-
Citrate utilization	+
H_2S production	-
Urease production	-
Tryptophane deaminase production	-
Indole production of tryptophane	-
Acetoin production	+
Hydrolysis of gelatin	-
Fermentation or oxidation of :	
- Glucose	+
- Mannitol	+
- Inositol	-
- Sorbitol	+
- Rhamnose	+
- Sucrose	+
- Melibiose	+
- amygdalin	+
- Arabinose	+
Cytochrome oxidase	-

หมายเหตุ -ve = แบคทีเรียแกรมลบ, + = ผลบวก, - = ผลลบ

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียไอโซเลท LK5 และ G2

หมู่ฟังก์ชัน	ค่าความยาวคลื่นมาตรฐาน (cm^{-1})	ค่าความยาวคลื่นที่วัดได้ (cm^{-1})
NH_2	3530-3400	3443.21
OH	3500-3250	3381.30
COOH	3300-2400	2454.83
C=C,C=N	1680-1630	1660.41
$CO-NH_2$	1420-1400	1403.30
$R-NH_2$	860-760	860.68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการประยุกต์ใช้

3.5.1) การคืนกลับของน้ำมัน (Oil recovery)

จากการศึกษาพบว่า *E. cloacae* LK5 และ *E. cloacae* G2 สามารถทำให้เกิดการคืนกลับของน้ำมันได้โดยเฉลี่ยประมาณ 51.7 และ 45.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4)

3.5.2) การบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน (Oil removal)

จากการศึกษาพบว่า *E. cloacae* LK5 และ *E. cloacae* G2 มีประสิทธิภาพในการชะน้ำมันออกจากเม็ดทรายได้โดยเฉลี่ยประมาณ 75.7 และ 77.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4)

อย่างไรก็ตาม การที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ให้ประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ทั้งๆ ที่เชื้อ *E. cloacae* LK5 และ *E. cloacae* G2 เป็นเชื้อสายพันธุ์ (specie) เดียวกัน แต่อาจอยู่ต่าง strain กัน [17] ซึ่งต้องมีการตรวจสอบเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของแบคทีเรียต่อไป นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของบริเวณที่เก็บดินตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ ซึ่งทั้งสองบริเวณมีทั้งแหล่งอาหารและปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณไนโตรเจน และชนิดของน้ำมันที่ปนเปื้อนที่ต่างกัน จึงทำให้แบคทีเรียมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้แตกต่างกันด้วย [18]

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการประยุกต์ใช้

ไอโซเลท	Oil recovery (%)				Oil removal (%)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
SDS solution	4.4	5.8	4.4	4.8	90.0	91.0	90.0	90.3
Tris-HCl buffer	13.0	11.6	11.6	12.1	32.0	30.0	29.0	30.3
E. cloacae LK5	49.3	52.2	53.6	51.7	75.0	76.0	76.0	75.7
E. cloacae G2	46.4	44.9	44.9	45.4	78.0	79.0	76.0	77.7

4. สรุป

จากการวิจัยนี้พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันบริเวณบ่อดักตะกอนน้ำมันของหลุมขุดเจาะน้ำมัน แหล่งสิริกิติ์ อำเภอลานกระบือ จังหวัดกำแพงเพชร และอู่ซ่อมรถ ที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและนำไปประยุกต์ใช้ในการคืนกลับของน้ำมันและการบำบัดสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันได้ดีที่สุด ได้แก่ *E. cloacae* LK5 และ *E. cloacae* G2 ซึ่งการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้วิธีคัดเลือกที่ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพนั้นยังเป็นการคัดแยกเชื้อที่มีศักยภาพสำหรับการใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] Banat, I.M. "Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation : a review." **Bioresoure Technology**. 1995, **51**,1-12.

[2] Mouraile, O., Skodvin, T., Sjoblom, J. and Peytavy, J. "Stability of water-crude oil emulsion: role played by the stage of solvation of asphaltaenes and by waxes." **J. Dis. Sci. Technol**. 1998, **19**, 339-367.

[3] Lee, R.F. "Agents which promote and stabilize water-in-oil emulsion." **Spill. Sci. Technol. Bull**. 1999, **5**, 117-126.

[4] Nadarajah, N., Singh, A. and Ward, O.P. "De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture." **Process Biochemistry**. 2002, **37**, 1135-1141.

[5] Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. and Bisallon, J.G. "Biosurfactant production by a soil pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons." **Appl. Environ. Microbiol**.1996, **62**, 1908-1912

[6] Kosaric, N. "Biosurfactant and their application for soil bioremediation." **Food Technol. Biotechnol**. 2001, **39**, 295-304.

[7] Banat, I.M., Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. "Potential commercial applications of microbial surfactants." **Appl. Microbial Biotechnol**. 2000, **53**, 495-508.

[8] Bodour, A.A., Drees, K.P. and Miller-Maier, R.M. "Distribution of biosurfactant producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soil." **Appl. Environ. Microbiol**. 2003, **69**, 3280-3287.

[9] Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. "A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS 38." **J. Bacteriology**. 1993, **175**, 6459-6466.

[10] Ghurye, G.L. and Vipulanandan, D. "A practical approach to biosurfactant production using non-aseptic fermentation of mixed cultures." **Biotechnol. Bioen**. 1994, **44**, 661-666.

[11] Cooper, D.G. and Goldenberg, B.G. "Surface active agents from *Bacillus* species." **Appl. Environ. Microbiol**. 1987, **53**, 224-229.

[12] Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H.L. "Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant substrate *Bacillus licheniformis* BAS50." **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 1995, **61**, 1706-1713.

[13] Prommachan, O. "Production and application of biosurfactant from *Bacillus* MUV4." Master of Science Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University. 2002.

[14] Toledo, F.L., Calvo, C., Rodelas and Gonzales-Lopez, J. "Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities". **Syst. Appl. Microbiol.** 2006, **29**, 244-252.

[15] Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R. and Totola, M.R. "Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites". **Bioresoure Technology.** 2006, **97**, 868-875.

[16] Bandaiphet, C. and Prasertsan, P "Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, $k_L a$ in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae*." **Carbohydrate Polymers**. 2006, **66**, 216-228.

[17] Gibson, D.T. "Microbial Degradation of Organic Compounds." Marcel Dekker Inc., New York.1984.

[18] Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., Salem, A and Kadri, M. "Isolation of biosurfactant-producing bacteria, product characterization and evaluation." **Acta. Biotech**. 1991, **11**, 315-324.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้