

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพ และการประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING
BACTERIA FROM SOIL AND DETERMINATION OF THEIR
ANTIFUNGAL ACTIVITIES

พรสวรรค์ เทวานาดำรงกุล
เพชรรัตน์ ลีทับขวา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพ และการประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING
BACTERIA FROM SOIL AND DETERMINATION OF THEIR
ANTIFUNGAL ACTIVITIES

พรสวรรค์ เทวานาถดำรงกุล

เพชรรัตน์ ลีทับขวา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING
BACTERIA FROM SOIL AND DETERMINATION OF THEIR
ANTIFUNGAL ACTIVITIES

PHONSAHWAN THEWANATDAMRONGKUN

PETCHARAT LEETHABKWA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา	
	Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria From Soil and Determination of Their Antifungal Activities	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรสวรรค์ เทวานาดำรงกุล	รหัสนักศึกษา 57050859
	นางสาวเพชรรัตน์ ลีทับขวา	รหัสนักศึกษา 57050867
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2560	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ	

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการ	วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	กานต์ วงศาริยะ

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา	
	ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA FROM SOIL AND DETERMINATION OF THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITIES	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรสวรรค์ เทวานาดำรงกุล	รหัสนักศึกษา 57050859
	นางสาวเพชรรัตน์ ลีทับขวา	รหัสนักศึกษา 57050867
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	
ปีการศึกษา	2560	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ	

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตสาร Aflatoxin และก่อให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ จากการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวก สามารถทนความร้อนได้ 6 สายพันธุ์ได้แก่ MT1 MT2 MT3 MT4 MT5 และ MT6 สามารถสร้างสปอร์ จำนวน 1 สายพันธุ์ได้แก่ MT4 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัด emulsification index และวัดการกระจายตัวของน้ำมันโดยวัดการกระจายตัวของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องใช้แล้ว พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ MT4 และ MT1 มีค่าการเกิดอิมัลชันกับน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องใช้แล้วได้สูงที่สุด และเมื่อวัดการกระจายตัวของน้ำมันพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ MT4 และ MT1 ให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงที่สุด เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อราพบว่า MT4 และ MT1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้

คำสำคัญ : แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียทนความร้อน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อิมัลชัน

Title	ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA FROM SOIL AND DETERMINATION OF THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITIES		
Student	Miss Phonsahwan Thewanatdamrongkun	ID 57050859	
	Miss Petcharat Leethabkwa	ID 57050867	
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Factory	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2017		
Advisor	Dr.Karn Wongsariya		

Abstract

The aim of this special project is to isolate biosurfactant producing bacteria which capable of producing antifungal substance against the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. These fungi are known as Aflatoxin producer and cause of the problems in the animal feed industry. Among six strains of thermophilic Gram-positive MT1, MT2, MT3, MT4, MT5 and MT6 which are isolated from soil, only one isolate (MT 4) is spore forming bacteria. The ability to produce biosurfactant is determined by oil spreading assay and emulsification activity assay against vegetable oil and used motor oil. The bacteria that exhibit the best activity in production of biosurfactant are selected to evaluate antifungal activity by dual culture test. The results found that the bacteria, MT 4 and MT 1 exhibit the highest emulsification index and the highest dispersion in vegetable oils and used motor oil, repectively. For antifungal test, the mycelium growths of *A. flavus* and *A. parasiticus* are decreased after co-culture with MT 1 and MT 4.

Keywords : Gram positive bacteria, Thermophilic bacteria, Biosurfactant, Emulsion

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณพระคุณอาจารย์ ดร.กานต์ วงศาริยะ และ ดร.ผกากรอง วนไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้ความรู้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จไปด้วยดีขอขอบคุณอาจารย์ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นกรรมการสอบโครงการพิเศษ รวมถึงตรวจแก้ไขรูปเล่มโครงการพิเศษนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์และบุคลากรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ได้ให้คำแนะนำ และสั่งสอนให้ความรู้ในด้านต่างๆ ตลอดจนความอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์ต่างๆ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ จนสำเร็จจุฬาลงกรณ์และเพื่อนๆ ที่คอยสนับสนุน แนะนำ และเป็นกำลังใจจนทำให้สำเร็จการศึกษาไปด้วยดี

พรสวรรค์ เทวานาดำรงกุล

เพชรรัตน์ ลีทับขวา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เชื้อราที่สร้างสารพิษและพบในอาหารสัตว์.....	4
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างสาร Aflatoxin.....	4
2.3 Aflatoxin.....	6
2.4 สารลดแรงตึงผิว (Surfactant).....	12
2.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant).....	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	24
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	24
3.2 วิธีการทดลอง.....	26
3.2.1 การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์.....	26
3.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น.....	27
3.2.2.1 การย้อมแกรม.....	27
3.2.2.2 การย้อมเอนโดสปอร์.....	27
3.2.3 การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน.....	28
3.2.4 การทดสอบการเกิดอิมัลชัน.....	28
3.2.5 การทดสอบทางชีวเคมี.....	28
3.2.5.1 การใช้อากาศในการเจริญ.....	28
3.2.5.2 ความสามารถในการสร้างกรดจากการหมัก.....	28
3.2.5.3 การสร้างเอนไซม์ amylase.....	29
3.2.5.4 การสร้างเอนไซม์ caseinase.....	29

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2.5.5 การสร้างเอนไซม์ lipase.....	29
3.2.5.6 การสร้างเอนไซม์ gelatinase	29
3.2.6 ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา	30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	31
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ.....	31
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการกระจายตัวของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำมันพืชและ น้ำมันเครื่อง.....	36
4.3 การทดสอบ Emulsion index ในน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง.....	39
4.4 การทดสอบทางชีวเคมี.....	41
4.5 การทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา	43
บทที่ 5 สรุปงานวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	45
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	45
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	50
ภาคผนวก ก.....	51
ภาคผนวก ข.....	55

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เชื้อราที่สร้างสารพิษและมักพบในอาหารสัตว์ทั่วไป	4
2.2 ผลของสารพิษจากเชื้อราในสัตว์ปีก	10
2.3 กำหนดระดับ Aflatoxin ที่ผ่านการพิจารณาของอนุกรรมการพิจารณากำหนดมาตรฐาน อาหารสัตว์	10
2.4 ปริมาณสูงสุดของสารพิษจากเชื้อราแต่ละชนิดที่แต่ละประเทศอนุญาตให้ปนเปื้อนได้ ในอาหาร	11
2.5 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ	20
4.1 แสดงผลการย่อยแอมและการย่อยสปอร์ ของเชื้อที่คัดแยกได้จากดิน ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า	33
4.2 แสดงการกระจายตัวของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง	36
4.3 แสดงค่าร้อยละการกระจายตัวของน้ำมัน	38
4.4 แสดงผลการทดสอบ Emulsion index ในน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง	39
4.5 แสดงค่า Emulsification Index	40
4.6 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมี	41
4.7 แสดงผลการทดลองของเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	43
4.8 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	44

สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ภาพโครงสร้าง Aflatoxin B ₁ และ B ₂	7
2.2 ภาพโครงสร้าง Aflatoxin G ₁ และ G ₂	7
2.3 ภาพโครงสร้าง Aflatoxin B _{2a} และ G _{2a}	8
2.4 ภาพโครงสร้าง Aflatoxin M1 และ M2.....	8
2.5 โครงสร้างของ cationic surfactant.....	13
2.6 โครงสร้างของ anionic surfactant.....	14
2.7 โครงสร้างของ nonionic surfactant	14
2.8 โครงสร้างของ zwitterionic surfactant.....	15
2.9 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม Glycolipid	16
2.10 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม Lipopeptide	18
2.11 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม Polymeric surfactant	19
3.1 วิธีการเจือจางแบบ tenfold dilution	26
3.2 การคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว.....	26
3.3 วิธี Cross streak plate	27
3.4 การขีดเชื้อทดสอบการผลิตเอนไซม์.....	29
3.5 การขีดเชื้อสำหรับทดสอบการยับยั้งเชื้อรา	30
3.6 การวางชั้นวุ้นสำหรับทดสอบการยับยั้งเชื้อรา	30
4.1 ลักษณะของเชื้อที่แยกได้จากดิน MT1(ก) MT2 (ข) MT3 (ค) MT4 (ง) MT5 (จ) และ MT6 (ฉ) ที่เจริญบนอาหาร TSA	31

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
PDA	Potato Dextros Agar
<i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
μ l	ไมโครลิตร
ml	มิลลิลิตร
g	กรัม
CMC	Critical Micelle Concentration
mN/m	มิลลินิวตันต่อเมตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีความอุดมสมบูรณ์ทั้งแหล่งเพาะปลูก ความหลากหลายของพันธุ์พืช และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถผลิตสินค้าเกษตรได้ตลอดทั้งปี มีเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตที่ทันสมัย มีการลงทุนในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีทั้งปริมาณและคุณภาพเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะปลูกและหลังการเก็บเกี่ยวที่อาจส่งผลกระทบต่อความสูญเสียของผลผลิตทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ ซึ่งความสูญเสียมีสาเหตุหลักมาจาก การเข้าทำลายของแมลงศัตรู การเข้าทำลายของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส การเปลี่ยนแปลงทางสรีระและเกิดจากการกระทำของมนุษย์และสภาพแวดล้อม ทำให้ผลิตผลเกษตรเกิดการเน่าเสีย คุณภาพไม่ได้มาตรฐานและไม่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งปัจจุบันในประเทศไทยและทุกประเทศในแถบร้อนชื้น พบว่าปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษ Aflatoxin จากเชื้อรา ซึ่งเป็นสารพิษที่พบได้ง่ายโดยเฉพาะในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วลิสง กระเทียม พริกแห้ง กุ้งแห้ง สมุนไพร อาหารที่ทำจากนม และสมุนไพรอีกหลายชนิด โดยพบว่าเชื้อราที่สร้างสารพิษ Aflatoxin และก่อให้เกิดปัญหามากที่สุด ได้แก่ *Aspergillus flavus* *Aspergillus niger* *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus glaucus* เป็นปัญหาสำคัญเนื่องจากก่อให้เกิดความเสียหายหลายด้านได้แก่ ทำให้การผลิตผลเกษตรเสียหาย ไม่มีคุณภาพ ราคาตกต่ำ สัตว์เลี้ยงมีคุณภาพต่ำหรือตายเป็นจำนวนมากและที่สำคัญประชาชนที่บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษเข้าไปอาจได้รับอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ และการสร้างข้อกีดกันทางการค้าเนื่องจากเกิดการปนเปื้อนสารพิษทำให้ไม่สามารถส่งออกได้และทำให้มูลค่าทางการตลาดของผลผลิตลดลง (บดินทร์, 2555)

Aflatoxin คือ สารพิษที่สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus* spp. ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเชื้อราที่สร้างสาร Aflatoxin ได้ดีคือ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยเชื้อราทั้งสองชนิดนี้จะสร้างสารพิษในสภาวะที่อาหารมีค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (water activity) มากกว่า 0.93 และอุณหภูมิประมาณ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส ลักษณะทั่วไปของสาร Aflatoxin สามารถละลายน้ำได้เล็กน้อย คงตัวในสภาพที่เป็นกรด แต่จะสลายตัวในสภาพที่เป็นด่าง และทนความร้อนได้สูงถึง 260 องศาเซลเซียส Aflatoxin สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางตรง โดยการบริโภคผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ปนเปื้อนสาร Aflatoxin และทางอ้อมโดยการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีการปนเปื้อนสาร Aflatoxin ปัจจุบันองค์การ IARC (International Association Research Cancer) ได้จัดสาร Aflatoxin เป็นสารก่อมะเร็ง Class I ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ตับและอาจก่อมะเร็งในอวัยวะอื่นๆ เช่น ไต ระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์และระบบภูมิคุ้มกัน (ดวงจันทร์ และวนิดา, 2545) เนื่องจาก Aflatoxin เป็นสารพิษที่ก่อมะเร็งชนิดรุนแรงนักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจที่จะศึกษาหาวิธีที่ใช้ในการสลายหรือลดความเป็นพิษของสารพิษชนิดนี้ให้ลดลง ซึ่งโดยส่วนใหญ่สนใจการใช้วิธีทางชีวภาพ เนื่องจากวิธีนี้ ช่วยรักษาคุณภาพของอาหารคนและอาหารสัตว์ได้โดยที่คุณภาพอาหารยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคอยู่ (Hormisch et al., 2004)

การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) เป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่สนใจในการศึกษาค้นคว้า เนื่องจากสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์และรา (Lang and Wullbrandt, 1999) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ห่อหุ้มอนุภาคนอกเซลล์ซึ่งง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างหลากหลาย ทำให้มีลักษณะเฉพาะตัว มีคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ในอุตสาหกรรมการเกษตร ก่อสร้าง อาหารและเบียร์ เครื่องหนัง กระจก เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Desai and Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นสารที่สามารถลดแรงตึงผิวได้สูง (surface active) ซึ่งโมเลกุลประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ (hydrophilic) และส่วนที่ละลายน้ำไม่ได้ (hydrophobic) โดยส่วนใหญ่ของ hydrophobic จะประกอบไปด้วยสารพวกไฮโดรคาร์บอนที่มีรูปแบบทั้งแบบเส้นตรง (linear chain) และแบบแตกกิ่งก้านสาขา (branched chain) Biosurfactant จัดว่าเป็น extracellular metabolic products ของจุลินทรีย์ ที่มีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เป็น lipid มีหลายชนิด ได้แก่ glycolipid lipopeptide phospholipid และ lipopolysaccharides (Georgiou et al., 1992) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลายชนิดและมีคุณสมบัติต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงให้ความสนใจที่จะศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสาร Aflatoxin ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus*

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)
- 2) เพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดิน ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบคุณสมบัติการเกิดอิมัลชัน (emulsification index) ทดสอบการกระจายตัวในน้ำมัน (oil dispersion) ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อราที่สามารถผลิตสาร Aflatoxin ได้สองสายพันธุ์คือ *A. flavus* และ *A. parasiticus*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ผลิตสาร Aflatoxin ได้สองสายพันธุ์คือ *A. flavus* และ *A. parasiticus*

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรมากที่สุด เมื่อผลิตผลติดโรคจากเชื้อราแล้วจะก่อให้เกิดความเสียหาย ที่ส่งผลต่ออายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้นเหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. และ *Rhizopus* spp. จึงมักพบการเจริญของเชื้อราและสารพิษของเชื้อราปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสงและพริกแห้ง ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่คนไทยนิยมนำมาประกอบอาหารและพบว่ามี การตรวจพบสารพิษ Aflatoxin มากกว่าผลผลิตทางการเกษตรชนิดอื่น การปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษ ปริมาณมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตผลเกษตร และลักษณะการเก็บรักษา ซึ่งพบว่า การปนเปื้อน ของ *Aspergillus niger* สูงสุด รองลงมา ได้แก่ *Aspergillus flavus* *Penicillium* spp. และ *Fusarium* spp. นอกจากนี้ ยังพบว่าผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรหลายชนิดทั้งรูปแบบผง แคปซูล และแบบถุงชา มีการปนเปื้อนของเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวโดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus* spp. ซึ่งอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ Aflatoxin ไม่เพียงแต่จะทำให้สุขภาพของคนและสัตว์โดยตรงเท่านั้นแต่สารพิษอาจถ่ายทอดไปสู่ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ นมและไข่ หรือตกค้างในอวัยวะสัตว์เช่น ตับ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพได้ (กนิษฐา, 2536)

การเจริญของเชื้อรามีผลทำให้อาหารเน่าเสียทำให้กลิ่นและรสเปลี่ยนไปรวมทั้งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อผู้บริโภค ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ในปัจจุบันเชื้อราปนเปื้อนในอาหารและสิ่งแวดล้อมเป็นกลุ่มเชื้อราที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเชื้อรามีการสร้างสารทุติยภูมิที่เป็นพิษต่อคนและสัตว์ ในปี ค.ศ. 1960 มีการค้นพบสาร Aflatoxin จากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ต่อมาพบว่า มีเชื้อราอีกจำนวนมากที่สามารถสร้างสารพิษเช่นเดียวกัน ปัจจุบันมีการค้นพบสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา (mycotoxin) มากกว่า 400 ชนิด ซึ่งสารพิษจากเชื้อราชนิดที่สำคัญและมักพบปนเปื้อนในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สารอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin: AF) สารโอคราทอกซิน (Ochratoxins: OT) สารพิษฟูโมนิซิน (Fumonisin: FM) สารพิษพาทุลิน (Patulin) สารพิษไตรโคทีซีน (Trichothecenes) และสารพิษซีราลีโนน (Zearalenone) บางครั้งพบสารพิษมากกว่าหนึ่งชนิดในผลิตผลเกษตรชนิดเดียวกัน เช่น พบสาร Aflatoxin ร่วมกับสาร Fumonisin และพบสาร Ochratoxins ร่วมกับสาร Aflatoxin เป็นต้น

ตัวอย่างเชื้อราที่สร้างสารพิษ ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus* spp. สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น Aflatoxin Ochratoxins Cyclopiazonic acid Citrinin Patulin และ Penicillic acid เชื้อรา *Fusarium* spp. สามารถสร้างสารพิษ เช่น Zearalenone Fumonisin Trichothecenes Moniliformin Fusaric acid และ Fusarochromanone เชื้อรา *Penicillium* spp. สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น Ochratoxins Cyclopiazonic acid Citrinin Patulin Penicillic acid และ Penitrem A เชื้อรา *Claviceps* spp. สามารถสร้างสารพิษ Ergot alkaloids และ เชื้อรา *Oospora* spp. สามารถสร้างสารพิษ Oosporein (Majerus and Otteneder, 1996)

2.1 เชื้อราที่สร้างสารพิษและพบในอาหารสัตว์

ในปี ค.ศ. 1960 มีการค้นพบสารอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) จากเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ต่อมาพบว่าเชื้อราอีกจำนวนมากที่สามารถสร้างสารพิษเช่นเดียวกัน ปัจจุบันมีการค้นพบสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา (mycotoxin) มากกว่า 400 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.1 (Shane, 1994)

ตารางที่ 2.1 เชื้อราที่สร้างสารพิษและมักพบในอาหารสัตว์ทั่วไป

ชนิดของเชื้อรา	สารพิษที่สร้าง
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxin B
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxin B1, B2, G1, G2
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxin A
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclauine
<i>Fusarium tricinctum</i>	T-2 toxin
<i>Fusarium sporotrichoids</i>	T-2 toxin, Strachybotryotoxins
<i>Fusarium roseum</i>	T-2 toxin
<i>Fusarium moniliforme</i>	Zearalenone (F-2 toxin)
<i>Gibberella zeae</i>	2-Deoxynivalenol (DON)
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ochratoxin A
<i>Penicillium cyclopium</i>	Ochratoxin A
<i>Claviceps purpurea</i>	Sclerotoxins

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษ Aflatoxin

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตได้ด้วยอาหาร ซึ่งมักเป็นวัตถุดิบจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีสารอาหารต่างๆ เชื้อราดูดซึมสารอาหารเข้าสู่เซลล์ และเมื่อมีสภาวะแวดล้อมเหมาะสมจึงสร้างสารทุติยภูมิหลายชนิด รวมถึงสารพิษจากเชื้อรา การสร้างสารพิษของเชื้อรามีปัจจัยหลักๆ ได้แก่ ชนิดของเชื้อรา แหล่งอาหาร และความเหมาะสมของสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด ค่าความเป็นกรด เบส ปริมาณเชื้อราและปัจจัยอื่นๆ (Dorner and Cloe, 2002)

2.2.1. ชนิดของเชื้อราที่สร้างสารพิษ Aflatoxin

Aflatoxin สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus* 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Aspergillus nomius*, *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* นอกจากนั้นยังพบว่าสปีชีส์อื่นสามารถสร้างสาร Aflatoxin ได้ แต่ไม่พบรายงานว่ามีการสร้าง Aflatoxin ปนเปื้อนในอาหารได้แก่ *A. nomius* และพบว่า *A. parasiticus* เป็นตัวที่สร้างสาร Aflatoxin ชนิดบี และสามารถสร้างสาร Aflatoxin ชนิดจีได้ด้วย (Eaton and Groopman, 1993) เชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสาร Aflatoxin ได้แตกต่างกัน และบางสายพันธุ์ไม่สามารถสร้าง Aflatoxin ได้ จากการศึกษาพบว่า *A. flavus* มากกว่า 500 ตัวอย่าง สามารถสร้างสาร Aflatoxin ได้ประมาณร้อยละ 40 ของตัวอย่าง และมีความสามารถในการสร้างสาร Aflatoxin ได้ในระดับที่ต่างกัน (Dorner and Cloe, 2002)

2.2.2 แหล่งอาหาร

ธีรยุทธ์ และชัยวัฒน์ (2524) รายงานว่าแหล่งอาหารมีผลต่อการเจริญของเชื้อราจากการนำเชื้อรามาล้างบนอาหารชนิดต่างกัน พบว่าปริมาณของ Aflatoxin ที่สร้างขึ้นแตกต่างกัน ความแตกต่างในการสร้าง Aflatoxin จากเชื้อราชนิดเดียวกันบนอาหารสังเคราะห์หรือในธัญพืชต่างชนิดกัน เนื่องจากสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารชนิดเหล่านั้นแตกต่างกันตั้งแต่ คาร์โบไฮเดรต น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส ไซโลส แลโรโบส เป็นต้น ในบรรดาแหล่งคาร์บอนพบว่าซูโครสช่วยให้เชื้อราสร้าง Aflatoxin ได้ดีที่สุด ส่วนแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) ในเกลือแอมโมเนียมชนิดต่างๆ พบว่าเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้เชื้อราสร้างสาร Aflatoxin ได้มากกว่าเกลือแอมโมเนียมชนิดอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม การสร้างสาร Aflatoxin ของเชื้อราที่ใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นยังพบว่าปริมาณสารพิษที่สร้างได้น้อยกว่าอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนสกัดของข้าวโพดที่มีกรดเคสมีโน (Casamino acid) และจากส่วนสกัดของยีสต์และเปปโตน เป็นต้น เกลือแร่ (Minerals) ที่สำคัญที่กระตุ้นให้เชื้อราสร้างสาร Aflatoxin ได้ดีคือ สังกะสีไอออน (Zn^{2+}) ดังนั้นเมื่อปริมาณของสังกะสีไอออนในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราลดลง พบว่าทำให้ปริมาณการสร้าง Aflatoxin ลดน้อยลงไปด้วย

2.2.3 ความชื้น

ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้าง Aflatoxin ของเชื้อราคือ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศร้อยละ 85 อาหารที่มีความชื้นสูงหรือได้รับการถ่ายเทความชื้นที่สูงจากอากาศจะทำให้เชื้อรามีการเจริญได้ดี และสร้างสารพิษได้มาก เช่น เมล็ดถั่วที่มีความชื้นของเมล็ดสูงกว่าร้อยละ 9 (อรุณศรี, 2540 ; Kolte, 1984)

2.2.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา เชื้อราสามารถสร้างสารพิษได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างมากคือ 12 ถึง 35 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิต่ำสุดพบว่าเชื้อรา *A. flavus* สามารถสร้าง Aflatoxin ได้ที่ 12 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 27 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่สูงที่สุดที่สามารถสร้างสารพิษได้คือตั้งแต่ 40-42 องศาเซลเซียส (ทิพยา และคณะ, 2530) บางรายงานกล่าวว่า เชื้อรา *A. flavus* เจริญและสร้าง Aflatoxin ได้ในช่วงอุณหภูมিরะหว่าง 11-37 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 25-30 องศาเซลเซียส โดยเชื้อรา *A. flavus* จะสร้างสาร Aflatoxin ต่อเมื่ออาหารและความชื้นเพียงพอโดยจะสร้างสารพิษภายในเวลา 48 ชั่วโมง (อรุณศรี, 2540)

2.2.5 แสงแดด

แสงแดดมีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อราในผลผลิตทางการเกษตรและเกิดการปนเปื้อนของสาร Aflatoxin จากการศึกษาของ Joffe และ Lisker (1969) พบว่าในที่มืดเชื้อรา *A. flavus* จะสร้างสาร Aflatoxin ได้น้อยลง

2.2.6 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH)

เชื้อราสามารถเจริญได้ในช่วง pH ที่กว้างคือตั้งแต่ 2 ถึง 8.5 แต่ส่วนใหญ่ชอบสภาพที่เป็นกรด (สุมาลี, 2539) จากรายงานของ Buchanan และ Ayres (1976) พบว่า *A. parasiticus* สามารถสร้างสาร Aflatoxin ได้ในช่วง pH 3.0 ถึง 8.0

2.2.7 ปริมาณของเชื้อรา

ปริมาณของเชื้อราเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณการปนเปื้อนสาร Aflatoxin ในถั่วลิสง ทิพย์วรรณ (2531) พบว่าเมล็ดถั่วลิสงมีการปนเปื้อนสาร Aflatoxin มากขึ้นเมื่อปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* เพิ่มขึ้น เชื้อราในเมล็ดถั่วลิสงจะรอกการเจริญเติบโตเมื่อมีความชื้นที่เหมาะสม ต่อมาเชื้อราจะเจริญและสร้างสารพิษ ปริมาณสารพิษที่สร้างมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไปจากชนิดอาหารที่เจริญ

2.2.8 ปัจจัยอื่นๆ

นอกเหนือจากปัจจัยที่กล่าวมาในข้างต้น ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการสร้างสาร Aflatoxin เช่น ชนิดสายพันธุ์ของเชื้อรา อายุการเก็บเกี่ยวพืชผลทางการเกษตรเช่น พืชบางชนิดถ้าเก็บเกี่ยวในช่วงอายุมากเกินไปสามารถทำให้เชื้อราเข้าทำลายได้ง่าย ปัจจัยต่อมาคือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาในโรงเก็บ ความเสียหายของเมล็ด การแข่งขันการเจริญระหว่างเชื้อราด้วยกัน ปริมาณยาฆ่าแมลงและโลหะหนักที่ปนเปื้อนในเมล็ดพืช เป็นต้น

2.3 Aflatoxin

Aflatoxin เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. และ *Rhizopus* spp. แต่สายพันธุ์ที่สำคัญต่อการสร้างสาร Aflatoxin ในอาหารและก่อให้เกิดความเสี่ยงในการบริโภคมากที่สุดคือ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดย *A. flavus* สร้างสารพิษเฉพาะ Aflatoxin B₁ (AFB₁) และ Aflatoxin B₂ (AFB₂) ในธัญพืช เช่น ถั่วลิสง งาดำและข้าวกล้อง และ *A. parasiticus* สร้างสารพิษ 4 ชนิด ได้แก่ AFB₁ AFB₂ Aflatoxin G₁ (AFG₁) และ Aflatoxin G₂ (AFG₂) ในเมล็ดพืชน้ำมัน เช่น ถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน งา ข้าวโพด และปาล์ม สารพิษชนิดนี้เป็นอันตรายต่อสัตว์ปีกและก่อให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจการเลี้ยงสัตว์ปีก ก่อให้เกิดมะเร็งตับในมนุษย์ และสัตว์ที่ได้รับสารพิษนี้ (Allcroft and Carnnagh, 1963) นอกจากนี้ผลผลิตทางการเกษตรที่อยู่ในเขตร้อนชื้น มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน Aflatoxin ด้วย (Lawlor and Lynch, 2001)

2.3.1 คุณสมบัติของ Aflatoxin

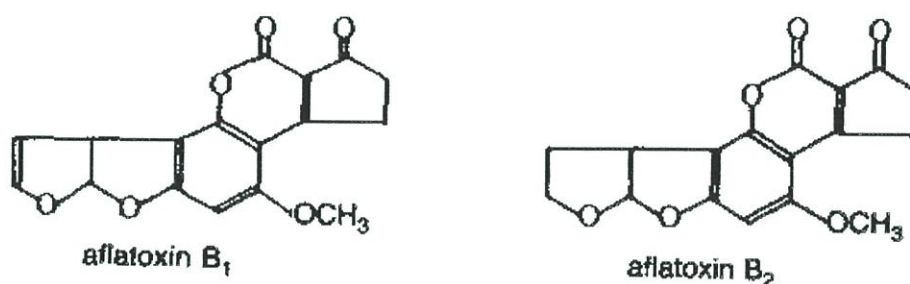
2.3.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

Aflatoxin ละลายได้ในน้ำ และแอลกอฮอล์ และละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ เช่นคลอโรฟอร์ม เบนซินและอะซิโตน Aflatoxin สามารถเรืองแสงได้ เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตขนาดความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดย Aflatoxin B จะเรืองแสงสีน้ำเงิน ส่วน Aflatoxin G จะเรืองแสงสีเขียว คุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของสารพิษ Aflatoxin ได้แก่ สามารถ

ทนความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส วิธีพาสเจอร์ไรซ์ และสเตอริไรซ์ ไม่สามารถทำลาย Aflatoxin ให้หมดไปได้ มีเพียงสารเคมีบางชนิดที่สามารถลด หรือทำลายความเป็นพิษของ Aflatoxin ได้บ้าง เช่น แอมโมเนีย ต่างแก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่สารเหล่านี้จะทำให้โครงสร้างของ Aflatoxin เปลี่ยนแปลงไปชั่วคราวเท่านั้น เนื่องจากจะสามารถกลับสู่โครงสร้างเดิมที่เป็นพิษได้อีก ในสภาวะที่เป็นกรดหรือกลาง แต่จะเสื่อมสลายได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แสงแดด และรังสีแกมมา

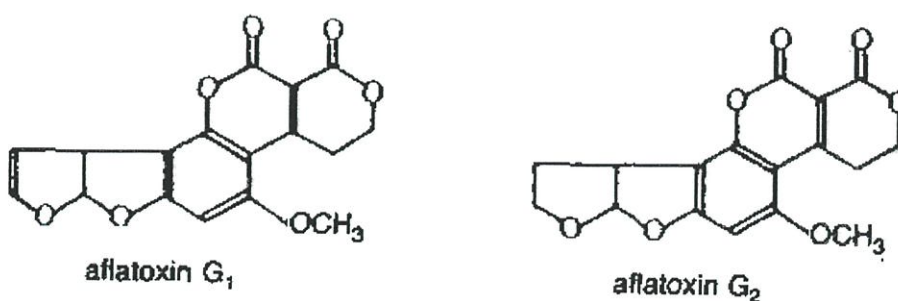
2.3.1.2 คุณสมบัติทางเคมี

Aflatoxin มีโครงสร้างเป็น difuranocoumarins แบ่งตามโครงสร้างได้ 2 กลุ่ม คือ difuranocoumarocyclopentenone ได้แก่ AFB₁ AFB₂ AFB_{2a} AFM₁ AFM₂ AFM_{2a} และ Aflatoxicol และอีกกลุ่มคือ difuranocoumarolactone ได้แก่ AFG₁ AFG₂ AFG_{2a} AFGM₁ AFGM₂ AFGM_{2a} AFB₃ และ AFQ₁ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 2.2 2.3 และ 2.4 (Reddy and Waliyar, 2008)



รูปที่ 2.1 ภาพโครงสร้าง Aflatoxin B₁ และ B₂,

ที่มา : Reddy and Waliyar (2008)



รูปที่ 2.2 ภาพโครงสร้าง Aflatoxin G₁ และ G₂

ที่มา : Reddy and Waliyar (2008)

2.3.2.1 ความเป็นพิษของ Aflatoxin ต่อมนุษย์

ในปี พ.ศ. 2517 มีรายงานจากประเทศอินเดีย ว่าเด็กที่รับประทานข้าวโพดที่ขึ้นรา ป่วยด้วยโรคตับอักเสบเฉียบพลัน มีผู้ป่วยอย่างน้อย 397 ราย และเสียชีวิต 106 ราย ชาวบ้านที่ล้มป่วยมีอาการไข้สูง ตัวเหลือง (ดีซ่าน) และท้องมาน ผลการชันสูตรศพผู้ที่เสียชีวิตและสุนัขที่เสียชีวิต พบว่า เนื้อเยื่อตับถูกทำลาย เส้นเลือดในตับอุดตัน และท่อน้ำดีบวม ผลการวิเคราะห์ข้าวโพดที่ชาวบ้านใช้เป็นอาหารหลักในช่วงเวลาที่เกิดโรค พบการปนเปื้อนของ Aflatoxin ระหว่าง 2,500-15,600 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb) แสดงว่าชาวบ้านที่ล้มป่วยได้บริโภคอาหารที่ปนเปื้อน Aflatoxin ในปริมาณสูงถึง 2-6 มิลลิกรัมต่อวันติดต่อกันหลายวัน (Krishnamachare et al., 1975) การติดตามดูอาการผู้ป่วยที่รอดชีวิตตลอดระยะเวลา 10 ปี พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดสามารถฟื้นสภาพได้เป็นปกติ ในปี 2524 ได้เกิดเหตุการณ์ในลักษณะเดียวกันนี้ที่อำเภอมาซาโคส (Machakos district) ประเทศเคนยา ทำให้มีผู้ป่วย 20 ราย และ 12 รายเสียชีวิตจากการบริโภคข้าวโพดที่มี Aflatoxin ชนิด B₁ ปนเปื้อนในระดับ 3,200-12,000 ppb (Nagindu et al., 1982) ทั้ง 2 กรณีที่กล่าวถึงนี้เป็นพิษในลักษณะเฉียบพลันของ Aflatoxin ที่มีต่อมนุษย์ ซึ่งพบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับอาการที่พบในสัตว์ สำหรับพิษชนิดเรื้อรังที่เกิดขึ้นกับมนุษย์ แม้ว่าจะไม่สามารถทำการศึกษโดยตรงได้ในลักษณะที่ศึกษากับสัตว์ แต่ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดมะเร็งในตับกับการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน Aflatoxin ในมนุษย์พบว่า มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ที่เปื้อนพาหะของไวรัสตับอักเสบ (Hepatitis viruses) หรือป่วยจากโรคดังกล่าว (Yeh et al., 1989) นอกจากนี้มีรายงานว่า ในประเทศไทยมีรายงานโรค Udorn Encephalopathy ซึ่งมีลักษณะคล้ายกลุ่มอาการ Reye's Syndrome เป็นกลุ่มอาการของโรคที่มักเกิดขึ้นในเด็กวัยก่อนเรียน (3-8 ขวบ) มีอาการไข้ปวดท้อง อาเจียน และชัก มักถึงเสียชีวิตภายใน 24-72 ชั่วโมง ซึ่งเกิดจากผู้ป่วยกินข้าวเหนียวค้างคืนที่ขึ้นราจากการตรวจเนื้อเยื่อตับของเด็กที่เสียชีวิตพบสาร Aflatoxin สะสมอยู่มาก (โสภณ, 2547)

2.3.2.2 ความเป็นพิษของ Aflatoxin ต่อสัตว์

ความเป็นพิษต่อสัตว์ของ Aflatoxin ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยนับตั้งแต่ ชนิดสายพันธุ์ เพศ อายุ ปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับพิษ รวมถึงสภาพแวดล้อม และโภชนาการที่สัตว์ได้รับ โดยทั่วไปสัตว์ที่มีอายุน้อยจะมีความไวต่อพิษ (sensitivity) มากกว่าสัตว์ที่มีอายุมากขึ้น ในกลุ่มของสัตว์เศรษฐกิจ ลูกเป็ดจัดเป็นสัตว์ปีกในขณะที่ลูกสุกรจัดเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่มีความไวต่อพิษจาก Aflatoxin มากที่สุด ความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ในสัตว์ที่ได้รับ Aflatoxin ในปริมาณมากถึง 2.0 พีพีเอ็ม (ppm) ในระยะเวลาอันสั้น ส่วนใหญ่จะมีการเปลี่ยนแปลงในร่างกายคล้ายกัน คือ มีจุดเลือดออก (haemorrhage) ในอวัยวะภายใน ตับถูกทำลาย (acute liver damage) ท่อน้ำดีบวม (bile duct hyperplasia) ตับโต (enlarged hepatic cells) และบวมน้ำ (oedema) สัตว์จะมีอาการซึม เบื่ออาหาร น้ำหนักลด หดแรง และมักจะตายภายใน 72 ชั่วโมง กรณีสัตว์ที่ได้รับ Aflatoxin ในปริมาณต่ำ 0.5-1.0 พีพีเอ็ม (ppm) อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ส่วนใหญ่จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงประสิทธิภาพในการใช้อาหารต่ำลง ภูมิคุ้มกันบกพร่องและสมรรถนะการสืบพันธุ์ลดลง สัตว์ที่แสดงอาการเหล่านี้มักตรวจพบอาการตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งในตับ (liver cancer) (Wogan, 1966; เยาวมาลย์ และคณะ, 2543) ผลของสารพิษจากเชื้อราในสัตว์ปีกจากรายงานของ Pier และคณะ 1980 ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลของสารพิษจากเชื้อราในสัตว์ปีก

Mycotoxin	Effects	Quantity of toxin (ppm)
Aflatoxin	- Acute death, hepatic necrosis and haemorrhage	1 – 10
	- Impaired immunogenesis	0.25
	- Reduced resistance	0.6 – 1.0
	- Decreased weight gain	1.5 – 2.5
	- Decreased egg production	2 – 8
Ochratoxin	- Acute disease, diarrhoea, death	4 – 16
	- Toxic nephropathy	4
	- Reduced weight gain	2 – 4
	- Decreased egg production	2
T-2 toxin	- Oral necrosis	4
	- Reduced gain	4
	- Decreased egg production	20

สารพิษจากเชื้อรา มีผลกระทบต่อสัตว์ทำให้ไม่เจริญเติบโตเท่าที่ควร หรือให้ผลผลิตลดลง ดังนั้นจึงมีกฎหมายเข้ามาควบคุมโดยกรมปศุสัตว์ได้ร่างมาตรฐานกำหนดระดับ Aflatoxin โดยผ่านการพิจารณาของอนุกรรมการพิจารณากำหนดมาตรฐานอาหารสัตว์ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 กำหนดระดับ Aflatoxin ที่ผ่านการพิจารณาของอนุกรรมการพิจารณากำหนดมาตรฐานอาหารสัตว์

วัตถุดิบ หัวอาหารสัตว์ หัวอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป	ปริมาณ Aflatoxin (ppb)		
	ระดับที่อนุกรรมการ* เห็นชอบ	ระดับที่กำหนด ตาม ประกาศ**	ระดับที่ EU กำหนด
กากถั่วลิสง	300	500	20
กากถั่วเหลือง	30	50	50
ถั่วเหลืองอบ (Full fat soybean)	20	-	50
ข้าวโพดเมล็ด ข้าวโพดป่น Corn gluten meal	20	-	-

วัตถุติด หั่วอาหารสัตว์ หั่วอาหารสำเร็จรูป	ปริมาณ Aflatoxin (ppb)		
	ระดับที่อนุกรรมการ* เห็นชอบ	ระดับที่กำหนด ตาม ประกาศ**	ระดับที่ EU กำหนด
รำละเอียด รำหยาบ รำสกัด	50	100	20
น้ำมัน	25	50	50
ปลาป่น	20	40	50
ปลาและกระดูกป่น	20	-	50
ขนไก่ป่น	20	-	50
เนื้อป่น เนื้อและกระดูกป่น	20	-	50
กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และ กากผลปาล์ม	50	-	20
กากมะพร้าว	50	-	20
มันเส้น มันอัดเม็ด	25	-	20
หั่วอาหารไก่	30	50	-
อาหารไก่ไข่	30	100	50
อาหารไก่เนื้อ	20	100	50

* อนุกรรมการพิจารณา กำหนดมาตรฐานอาหารสัตว์

** พรบ. ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ.2525

ที่มา : ดัดแปลงจากธวัชชัย และคณะ (2545)

ปัจจุบันพบสารพิษจากเชื้อรามากกว่า 400 ชนิด แต่สารพิษที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหาร มีประมาณ 20 ชนิด ตัวอย่างสารพิษจากเชื้อราที่มีการกำหนดค่าสูงสุดที่อนุญาตให้ปนเปื้อนได้ในอาหารดังแสดงในตารางที่ 2.4 (Chinaphuti,A. and R. Suttayakom, 2011) ตารางที่ 2.4 ปริมาณสูงสุดของสารพิษจากเชื้อรา แต่ละชนิดที่แต่ละประเทศอนุญาตให้ปนเปื้อนได้ในอาหาร

ชนิดสารพิษจากเชื้อรา	ประเทศ	ชนิดอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่อนุญาต (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)
Aflatoxin	นิวซีแลนด์	อาหารนำเข้าทุกชนิด	15
	ไทย	อาหารทุกชนิด	20
	สหรัฐอเมริกา	อาหารทุกชนิด	20
	สหรัฐอเมริกา	อาหารสัตว์	20-300

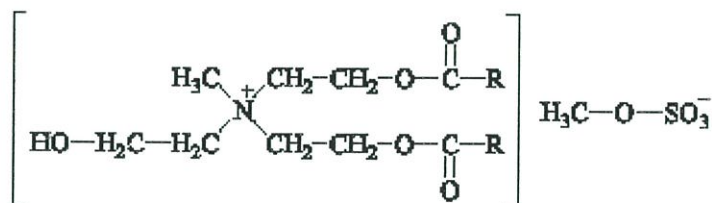
ชนิดสารพิษจากเชื้อรา	ประเทศ	ชนิดอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่อนุญาต (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)
Deoxynevalenol	สหรัฐอเมริกา แคนาดา	ข้าวสาลี ธัญพืชสำหรับทารก	500-1000 0
Ochratoxin A	บราซิล เดนมาร์ก	ธัญพืช เนื้อสุกร ตับและไตสุกร	30 25 10
Patulin	สหภาพยุโรป	น้ำแอปเปิล	30-50
T-2 toxin	รัสเซีย	เมล็ดพืชอาหาร	100
Zearalenone	บราซิล โรมาเนีย	ข้าวโพด อาหารทุกชนิด	200 5

2.4 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

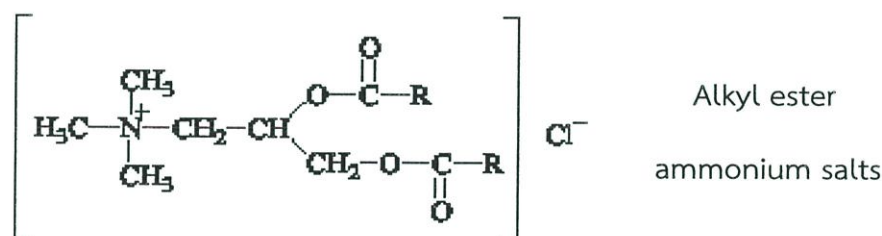
สารลดแรงตึงผิว หรือ surface active agent มีชื่อเรียกโดยทั่วไปทางวิทยาศาสตร์ว่า “Surfactant” สารลดแรงตึงผิวเดิมที่เดิยมาจากภาษาเยอรมันว่า Tensid ซึ่งตั้งโดยนักเคมีชาวเยอรมันในปี ค.ศ. 1960 สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำมักจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน คือมีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนใหญ่จะมาจากไขมันและน้ำมันตามธรรมชาติ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และโพลีเมอร์สังเคราะห์ ลักษณะที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิวคือเมื่อใส่สารลดแรงตึงผิวเพียงเล็กน้อยลงในน้ำ สารลดแรงตึงผิวจะไปลดแรงตึงผิวของน้ำเพื่อให้เกิดกระบวนการต่างๆ ง่ายขึ้น เช่น การเกิดฟอง การทำให้เปียก และกระบวนการทำความสะอาด เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะพยายามหนีน้ำโดยไปเกาะกับพื้นผิวที่ว่าง เช่น อากาศ ส่วนที่ชอบน้ำจะยังคงอยู่ในน้ำ สารลดแรงตึงผิวสามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภทซึ่งแบ่งตามลักษณะหรือประจุของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (Cationic surfactant), สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (Anionic surfactant), สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (Nonionic surfactant) และสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ (Zwitterionic surfactant) เป็นต้น (Krister Holmberg, 2001)

1. สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (Cationic surfactant) ได้แก่ Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3+Br^-$ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกมักจะพบในผลิตภัณฑ์ยาสีฟัน ครีมนวดผม และน้ำยาปรับผ้านุ่ม เป็นต้น (Krister Holmberg , 2001)

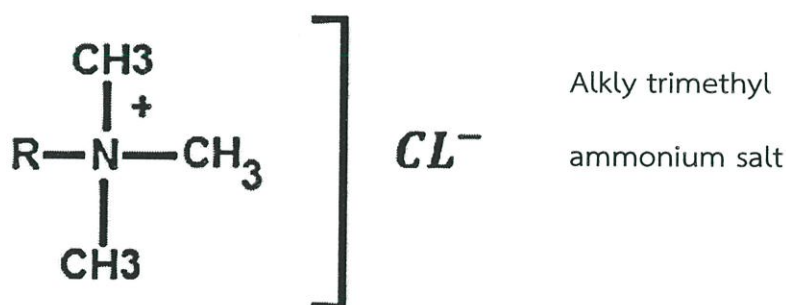
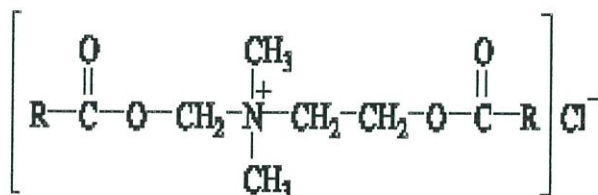
Esterquat (EQ)



Diesterquat (DEQ)



DEEDMAC



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ cationic surfactant

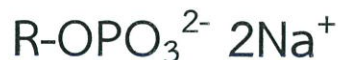
ที่มา : www2.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-596-9/html/kap05_eng.htm

(สืบค้นวันที่ 26/5/2561)

2. สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (Anionic surfactant) ได้แก่ Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$ มักจะเป็นส่วนประกอบในผงซักฟอกและสบู่ เป็นต้น (Krister Holmberg , 2001)



Sodium alkyl sulfate (AS)

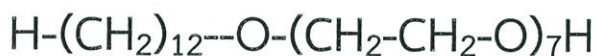


Sodium alkyl phosphate

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ anionic surfactant

ที่มา : Own work, 2009

3. สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (Nonionic surfactant) ได้แก่ Polyoxyethylene alcohol ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $(\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH})$ สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุนี้มักจะนำไปผสมในสบู่เหลวล้างหน้า (Krister Holmberg , 2001)



Alcohol ethoxylates (AE)



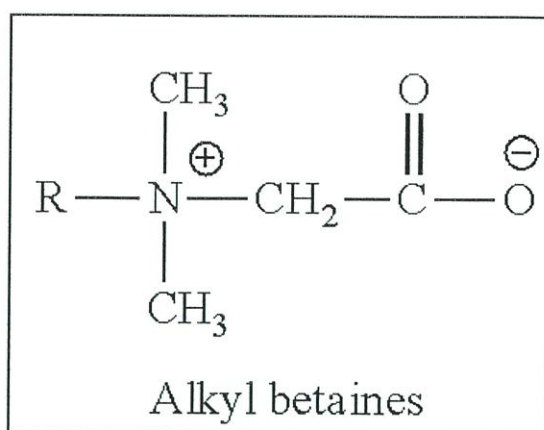
Alcohol alkoxyates (AA)

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ nonionic surfactant

ที่มา : www.assetsstock.com/chemicals/global-alcohol-ethoxylates-ae-market.html

(สืบค้นวันที่ 26/5/2561)

4. สารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ (Zwitterionic surfactant) ได้แก่ b-N-Alkylaminopropionic Acids มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{RN}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ ซึ่งเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง สารป้องกันการกัดกร่อน และสารยับยั้งแบคทีเรีย เป็นต้น (Krister Holmberg , 2001)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของ zwitterionic surfactant
ที่มา : Meiers and R.G. Bausch, 1995

2.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ สารที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำหรือมีขั้ว และส่วนที่ชอบน้ำหรือไม่มีขั้ว ซึ่งส่งผลให้สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้เช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี ส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ โปรตีน และ น้ำตาล ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น ส่วนที่ไม่มีขั้วจะเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีทั้งขนาดและโครงสร้างแตกต่างกันไป และทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปด้วย สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถละลายได้ทั้งในสารละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยส่วนที่มีขั้วจะละลายอยู่ในน้ำและหันส่วนไม่มีขั้วออกมาสัมผัสอากาศทำให้ปลดแรงตึงผิวของสารละลายได้ โดยสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 mN/m เหลือ 30±5 mN/m ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนั้น (Miller RM., Zhang, Y., 1997)

2.5.1 การจัดจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

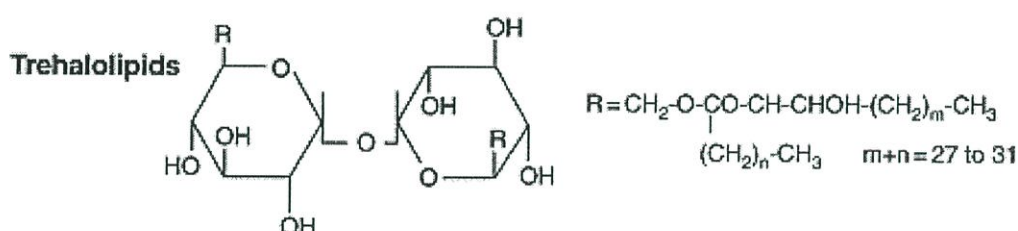
การจัดจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthetic surfactant) สามารถจำแนกได้ตามหมู่ที่มีขั้วในสูตรโครงสร้าง แต่สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะจัดจำแนกตามโครงสร้างทางเคมี ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย ส่วนที่ชอบน้ำ ได้แก่ กรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่เป็นประจุลบ หรือประจุบวก น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่หรือเป็นสาย และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ สารประกอบของไขมันทั้งไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว ซึ่งทำให้สามารถจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ คือ (Desai and Bannat, 1997)

2.5.1.1 ไกลโคลิพิด (Glycolipid)

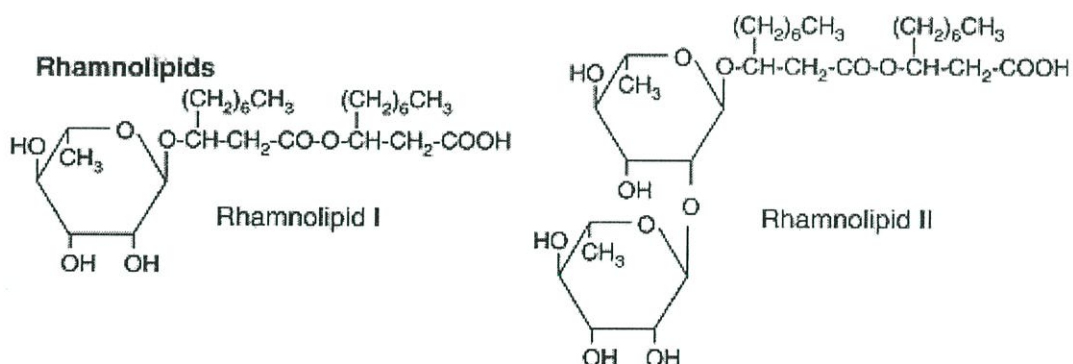
สารลดแรงตึงผิวที่พบส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มนี้ มีโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต มักเป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาล rhamnose trehalose sucrose และ glucose เชื่อมต่อกับ long chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids สารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคลิพิดแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ แรมโนลิพิด (rhamnolipid) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มักพบในแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ซึ่งปัจจุบันพบว่า rhamnolipid มีโครงสร้างแตกต่างกันถึง 5 แบบ โดยโครงสร้างแรกพบเมื่อปี ค.ศ. 1946 ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa*

(Lang, et al., 2002) ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipid) มักพบในผนังเซลล์โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาล trehalose 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ mycolic acids ประกอบด้วยสายยาวของ α -branched- β -hydroxy fatty acid มักพบในแบคทีเรียที่เรียจ่าพวก *Mycobacterium* *Nocardia* *Corynebacterium* และ *Rhodococcus erythropolis* (Kosaric, 1996) และ โซโฟโลลิพิด (sophololipid) ซึ่งมักพบในกลุ่มยีสต์สกุล *Torulopsis* มีโครงสร้างที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันโดยพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างน้ำตาล sophorose กับ hydroxyl fatty acid residue และพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Torulopsis magholiae* (*bombicola*) ในอาหารที่มีกลูโคส ยีสต์สกัด และยูเรียจะสามารถผลิต sophorolipids 2 ชนิด ได้แก่ lactic และ acidic (Kosaric, 1996; Lang, 2002)

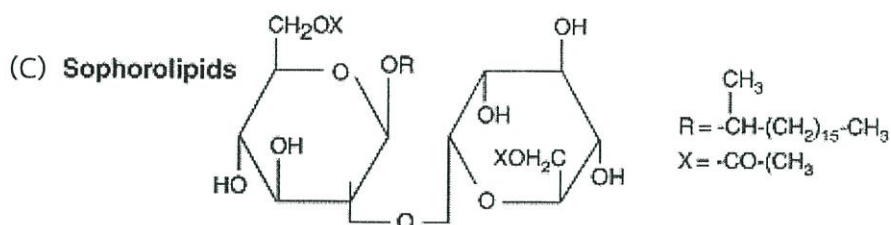
(A)



(B)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม glycolipid (A) : trehalolipid (B) : rhamnolipid
 ที่มา : Ahimou F, Jacques P, Deleu M ,2001



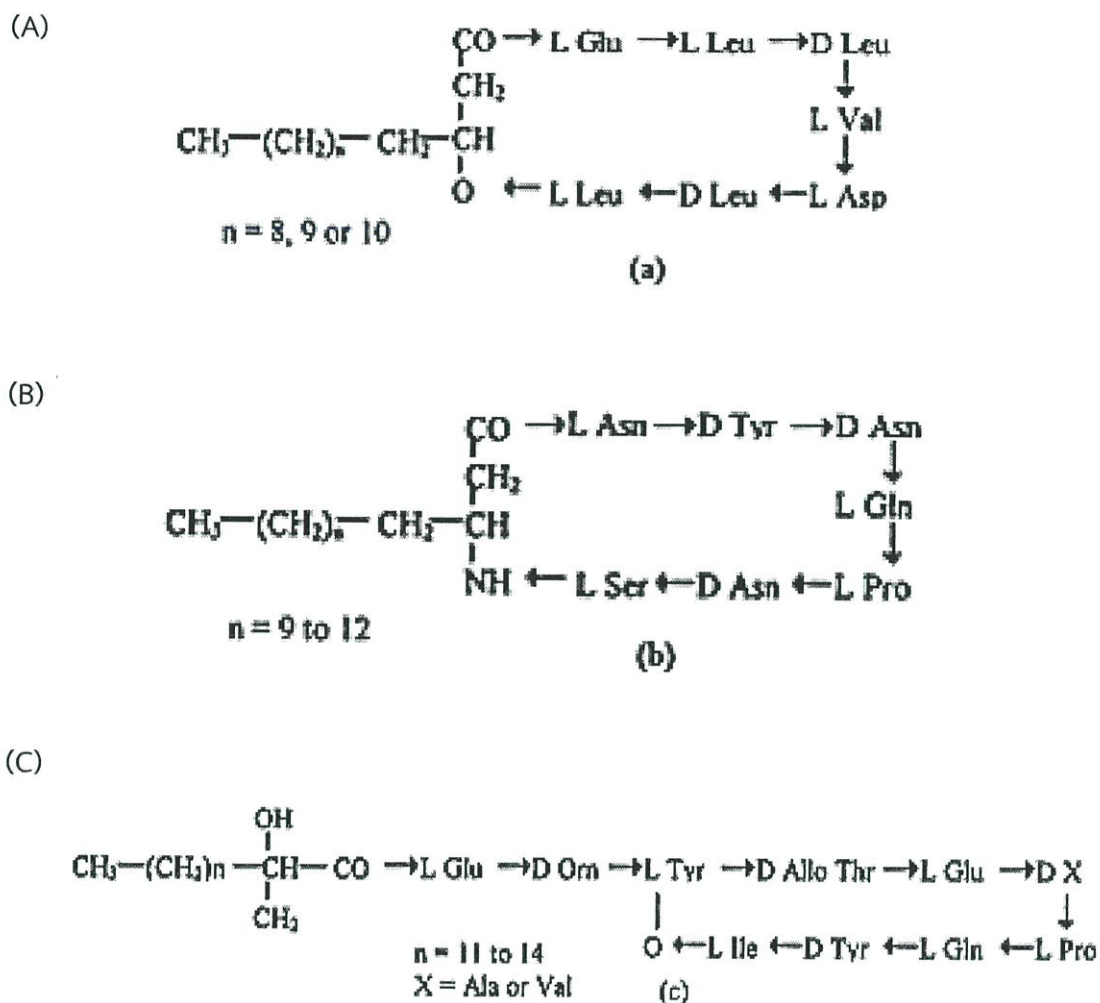
รูปที่ 2.9 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม glycolipid (C) : sophorolipid

ที่มา : Ahimou F, Jacques P, Deleu M ,2001

2.5.1.2 ลิโปเปปไทด์และไลโปโปรตีน (Lipopeptide and Lipoprotein)

จุลินทรีย์ในสกุล *Bacillus* มักผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มลิโปเปปไทด์ โดยมีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้นับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ตัวอย่างของสารกลุ่ม cyclic lipopeptides ในกลุ่มนี้ เช่น decapeptide antibiotics (gramicidins) จากเชื้อ *Bacillus brevis* และ lipopeptide antibiotic (polymyxins) จากเชื้อ *Bacillus polymyxa* และแสดงคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีสารลดแรงตึงผิวที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ เช่น Ornithine-containing lipid จากเชื้อ *Thiobacillus thiooxidans* และ *Pseudomonas rubescens* หรือสาร Cerilipin ซึ่งมี ornithine และ taurine เป็นองค์ประกอบโดยผลิตจากเชื้อ *Gluconobacter cerinus* IFO 3267 และชนิดที่มีกรดอะมิโน lysine เป็นองค์ประกอบผลิตจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 (Besson et al., 1992)

ลิโปเปปไทด์และไลโปโปรตีน เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ เช่น Surfactin มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรีย Iturin และ Fengycin มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเชื้อรา (Lang, 2002) โดยมีความแตกต่างกันที่โครงสร้างและคุณสมบัติ กล่าวคือ Surfactin มีกรดอะมิโนชนิดแอลฟา 7 โมเลกุล คือ L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-Lieu และ β -hydroxy fatty acid คาร์บอน 13-15 อะตอม สำหรับ Fengycin มีกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นวงซึ่งมีคาร์บอน 14-18 อะตอม ขณะที่ Iturin A ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดเบต้า 7 โมเลกุลต่อกันเป็นวงและมีโมเลกุลของกรดไขมัน 14-17 คาร์บอนอะตอม สารในกลุ่ม Itulin A ประกอบด้วย bacillomycin D, bacillomycin L และ mycosubtilin ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (Besson et al., 1992)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม Lipopeptide (A) : Surfactin (B) : Iturin และ (C) : Fengycin
 ที่มา : Deleu et al., 1999

2.5.1.3 ฟอสโฟลิปิดและกรดไขมัน (Phospholipid and Fatty acid)

2.5.1.3.1 ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid)

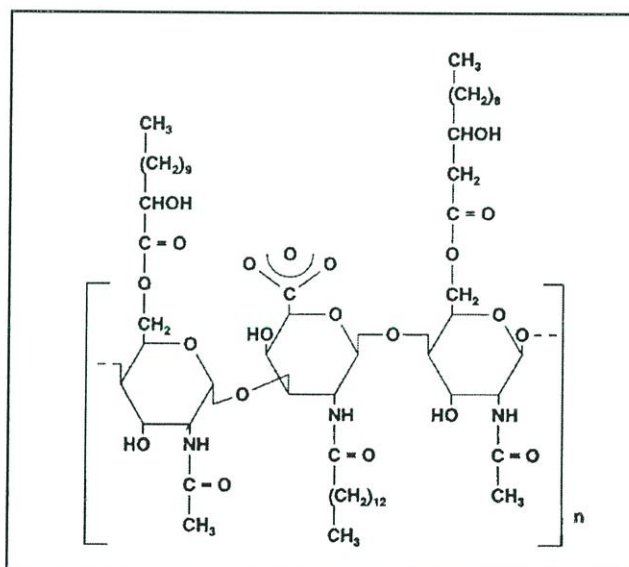
พบได้ในจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดเนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ แต่มีส่วนน้อยที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ทำให้วัดค่าลดแรงตึงผิวได้ยาก โครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยกลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน เช่น phosphatidylinositol phosphatidylglycerol และ phosphatidic acid ที่ผลิตจากเชื้อ *Thiobacillus thiooxidans* และ *Rhodococcus erythropolis* (Cooper และ Zajic, 1980)

2.5.1.3.2 กรดไขมันและกรดไขมันธรรมชาติ (Fatty acid and Neutral lipid)

สามารถพบได้ในเซลล์ของจุลินทรีย์ทุกชนิดและมักปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น carboxylic acid alcohol ester monoglyceride diglyceride และ triglyceride ซึ่งต่างก็มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว เช่น corynomycolic acid ที่ผลิตจากเชื้อ *Corynebacterium lepus* (Cooper และ Zajic, 1980) และในปี 1990 Matsuyama และคณะได้รายงานถึงเชื้อแบคทีเรีย *Serratia rudidaea* ATCC27593 ที่ผลิตสาร rubiwettin R1 ซึ่งเป็นไขมันชนิด β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอมเชื่อมต่อกับ hydroxyl fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 12 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Matsuzama, et al., 1990)

2.5.1.4 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ริก (Polymeric biosurfactant)

เป็นสารที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวของหน่วย polysaccharide protein และหน่วยของกรดไขมันมีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ในธรรมชาติ ที่รู้จักทั่วไป คือ emulsan alasan และ liposan โดย emulsan สามารถก่ออิมัลชันระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำได้ดีที่ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 0.001-0.01 โดยปริมาตร (v/v) และอิมัลชันที่เกิดยังมีความคงตัวอีกด้วย จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิด polymeric surfactants ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิด emulsan *Acinetobacter radioresiste* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิด alasan และ *Candida lipolytica* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิด liposan



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม polymeric surfactant : Emulsan จากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus*

ที่มา : J.D. Desai · I.M. Banat, 1997

2.5.1.5 สารลดแรงตึงผิวชนิดอนุภาค (Particulate surfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคเป็นส่วนหนึ่งของ extracellular membrane vesicle สามารถผลิตได้จากเยื่อหุ้มเซลล์ vesicle ซึ่งสารที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่ก่อให้เกิดไมโครอิมัลชัน (microemulsion) กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และเป็นส่วนสำคัญในการลำเลียงอัลเคน (alkane) เข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น vesicle ของ *Acinetobacter* sp. HO1-N มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-50 นาโนเมตร ความหนาแน่น 1.158 g/cm³ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิปิดและไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Kappeli and Finnetry, 1979)

2.5.2 การจัดจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Rosenberg และ Ron (1999) ได้ชี้ให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มของสารมวลโมเลกุลต่ำซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิว (surface tension) และแรงยึดระหว่างผิว (interfacial tension) ของของเหลวกับผิวของสารอื่นที่อาจเป็นของแข็ง ของเหลว และแก๊ส ได้ดี ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่สำคัญได้แก่ กลุ่มไกลโคลิปิด ลิโปเปปไทด์และฟอสโฟลิปิด และกลุ่มสารมวลโมเลกุลสูง โดยหน้าที่หลักของสารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับความคงตัวของสารอิมัลชัน ทำให้แบคทีเรียสามารถติดอยู่กับพื้นผิวที่เป็นส่วน hydrophobic ได้ดีขึ้น ซึ่งทำให้สามารถย่อยสลายสารชีวภาพได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้เกิดจากการรวมตัวของสารพอลิเมอร์ชีวภาพต่างๆ เช่น พอลิแซคคาไรด์โปรตีน และคอมเพลกซ์ของลิโปโพลีแซคคาไรด์โปรตีนและ ลิปิด (Ron and Rosenberg, 2001) ซึ่งชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้มักขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตาราง 2.5 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (Deleu and Paquot, 2004)

ประเภทของสารลดแรงตึงผิว	ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์
Glycolipid	Rhamnolipid Trehalolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus erithropolis</i> <i>Arthobacter</i> sp.
	Sophorolipid	<i>Candida bombicola</i>
Lipopeptides/ Lipoproteins	Surfactin/iturin/fengycin Viscosin Lichenysin Serrawettin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Serratia marcescens</i>

ตาราง 2.5 (ต่อ) ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ
(Deleu and Paquot, 2004)

ประเภทของสารลดแรงตึงผิว	ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์
Phospholipids	Phospholipids	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Corynebacterium lepus</i>
Fatty acid / Natural lipid	Corynomicolic acids	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>
Polymeric surfactants	Emulsan Alasan Liposan Lipomanan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter radioresiste</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida tropicalis</i>
Particulate biosurfactants	Vessicle and fimbriae Whole cells	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Cyanobacteria</i>

2.5.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และ เชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่นำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรองลงมา คือ ยีสต์และเชื้อรียบางสายพันธุ์ โดยการผลิตจะใช้ความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยองค์ประกอบของวัตถุดิบที่เป็นผักผลไม้ โดยวัตถุดิบที่เป็นผักผลไม้เหลือใช้จากอุตสาหกรรมหรือจากการเกษตรสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง องค์ประกอบของวัตถุดิบผักผลไม้มีทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส น้ำตาล และ ส่วนประกอบอื่นๆ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายองค์ประกอบเหล่านี้ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและ แหล่งไนโตรเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เพื่อเจริญเติบโตและมีการสร้างสารเมตาบอไลต์ขึ้นระหว่างกระบวนการเจริญนี้ สารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์จะทำให้เกิดคุณสมบัติที่เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กลุ่มของแบคทีเรียได้แก่ *Bacillus sp.* *Lactobacillus sp.* *Streptococcus sp.* *Pseudomonas sp.* *Pseudozyma sp.* และ *Micrococcus luteus* กลุ่มของเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger* *Penicillium* และ *Rhizopus* และ กลุ่มของยีสต์ ได้แก่ *Candida sp.* (Makkar, Cameotra and Banat, 2011) ในกลุ่มของแบคทีเรียจะมีบทบาทในการย่อยสลายวัสดุที่ใช้ในการผลิต ทำให้สารประกอบโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ให้เล็กลงได้ โดยแบคทีเรีย *Bacillus sp.* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Protease) ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติก มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยแบคทีเรียจะมีการใช้น้ำตาลในผักผลไม้ หรือสารตั้งต้นโดยกระบวนการหมัก (fermentation) สภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย

2.5.4 การตรวจวัดคุณสมบัติพื้นฐานของสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถตรวจวัดได้หลายวิธี เช่น การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) ค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน (interfacial tension) ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsification) และค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เป็นต้น

2.5.4.1 ค่าแรงตึงผิว (surface tension)

แรงตึงผิวเป็นแรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ ส่วนใหญ่ใช้วัดค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ค่าแรงตึงผิวอาจวัดโดยเครื่องมือที่เรียกว่า tensiometer ค่าที่วัดมีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในน้ำ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเกิดการสะสมตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสสองเฟส มีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวมีค่าลดลง โดยปกติค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นมีค่าเท่ากับ 72 mN/m และหากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เติมลงไปมีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนในที่สุดเกิดการอิมัลชัน ค่าแรงตึงผิวที่ลดลงจะคงที่แม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ค่าแรงตึงผิวก็จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวที่ไม่สามารถแทรกตัวที่ผิวสัมผัสระหว่างเฟสทั้งสองได้ จะเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันเกิดเป็นไมเซลล์ เรียกว่า critical micelle concentration (CMC) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด ค่า CMC เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) โมลาร์ (M) หรือร้อยละโดยปริมาตร (%v/v) (เบญจมาศ และคณะ, 2545)

2.5.4.2 ค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน (interfacial tension)

แรงตึงผิวชนิดนี้เป็นแรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกันระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำกับน้ำมัน เฮกซะเดเคน (hexadecane) หรือน้ำมันก๊าด (kerosene) โดยทั่วไปค่าแรงตึงผิวน้ำกับ hexadecane มีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงผิวของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

2.5.4.3 ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsification)

ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน หมายถึง ค่าที่บ่งบอกถึงความเสถียรของอิมัลชันซึ่งอิมัลชันหมายถึงผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อยสองชนิดซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เมื่อผสมกันจะรวมตัวกันเป็นเนื้อเดียวกันโดยอาศัยตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) การวัดความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการเกิดอิมัลชันทำได้โดยการเปรียบเทียบความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวทำอิมัลชันได้ดี (เบญจมาศ และคณะ, 2545)

2.5.4.4 ค่าการกระจายตัวในน้ำมัน (oil displacement)

เป็นค่าที่วัดความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการทำให้ชั้นของน้ำมันบนผิวน้ำเกิดเป็นวงใส (clear zone) แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใส คำนวณค่าพื้นที่ตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร (cm^2) โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตร ของการกระจายน้ำมัน เท่ากับ 1 หน่วย ซึ่งนอกจากจะใช้วัดส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงแล้ว ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีนี้จะใช้สารในการวิเคราะห์

เพียง 10 ไมโครลิตร จึงเหมาะกับสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เนื่องจากมักจะมีปริมาณน้อย (Morikawa, et al., 1993)

2.5.5 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารยับยั้ง ทำลายจุลินทรีย์ สารลดแรงตึงผิว สารเพิ่มความคงตัวในอาหาร เพิ่มการละลายในยาบางชนิด และสารฆ่าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร (Nitschke and Costa, 2007) ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารฆ่าเชื้อ หรือที่เรียกว่า สารฆ่าเชื้อชีวภาพ (biosanitizer) ในอุตสาหกรรมอาหาร แปงเกษตร และฟาร์ม สำหรับล้างวัตถุดิบทางการเกษตร เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ สารกำจัดศัตรูพืช และสารเคมีที่เป็นพิษตกค้างในวัตถุดิบทางการเกษตร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดการใช้สารเคมี และต้องการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่มีรายงานความเป็นพิษต่ำ มีรายงานการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทางการค้ามาใช้ในกระบวนการล้างผักกาดหอมเพื่อลดสารกำจัดศัตรูพืชไซเปอร์เมทริน (cypermethrin) เทียบกับการล้างด้วยเกลือ น้ำส้มสายชู และด่างทับทิม พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพในการลดไซเปอร์เมทรินโดยปริมาณที่ลดลงนั้นแปรผันตรงกับระยะเวลาที่ใช้ในการล้าง (Cheowtirakuland and Nguyen, 2010) และมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มาใช้ในการล้างเพื่อควบคุม *Aspergillus parasiticus* NCIM 898 พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร สามารถควบคุมการงอกของสปอร์ได้

นอกจากการนำไปใช้ล้างผักกาดและมันฝรั่งแล้วยังมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโซโฟลิลิปิด (sophorolipids) ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุที่ผลิตจาก *Candida bombicola* ATCC 22214 โดยมีการประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส นำไปใช้ไปใช้ล้างละมุด มะนาว มะเขือเทศ และแตงกวา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมการงอกของสปอร์ ซึ่งผลการทดสอบพบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญและการงอกของสปอร์รวมถึงแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Pulate, et al., 2014)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus parasiticus*

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Tryptone soya agar
- Tryptone soya broth
- Potato dextrose agar
- Skim milk agar
- Corn oil agar
- Starch agar
- Nutrient gelatin
- Glucose fermentation broth
- Lactose fermentation broth
- Sucrose fermentation broth

3.1.3 สารเคมี

- Tween 80
- Ethanol Alcohol 95%
- Sodium chloride
- Crystal violet
- Safanin o
- Malachite green
- Gram iodine

3.1.4 อุปกรณ์

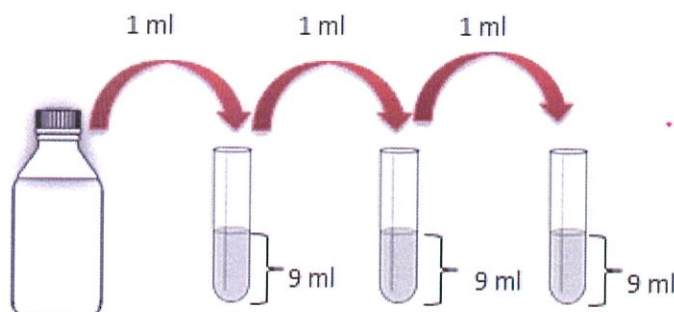
- Plate
- Dropper
- 250 ml Erlenmeyer flask
- Autoclave
- Loop
- 10 ml Test Tube
- 20 ml Cylinder
- Laminar air flow
- 2 Position Digital Precision Balance

- Boiling water bath)
- 1 ml Glasspipette
- 5 ml Glasspipette
- 10 ml Glasspipette
- 1000 ml Beaker
- 500 ml Beaker
- 50 ml Beaker
- 250 ml Duran flask
- Hot air oven
- 1.5 ml Microcentrifuge tube
- Rack
- Forcep
- Stirring rod
- L shape glass rod
- Spectula
- Bunsen burner
- Ligther
- 27 OC Incubator
- Microcentrifuge
- Light microscope
- 100 ul Micropiplate
- 200 ul Micropiplate
- 100 ul Micropiplate Tip
- 200 ul Micropiplate Tip
- Vortex mixer
- Microscope slide
- Cover slide

3.2 วิธีการทดลอง

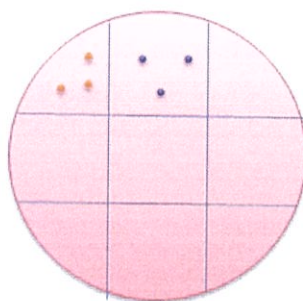
3.2.1 การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างดินเพาะปลูกมาคัดแยกเศษใบไม้ กิ่งไม้ ออก ซึ่งตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งดิจิตอล ให้ได้ปริมาณ 10 กรัม นำไปเจือจางในสารละลาย Normal saline 0.85 % w/v ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อทำลายเชื้อที่ไม่สามารถทนความร้อนได้ โดยให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเจือจางด้วย Normal saline 0.85% จนถึงระดับความเจือจาง 10^{-4} ด้วยวิธี tenfold dilution ดังรูป 3.1



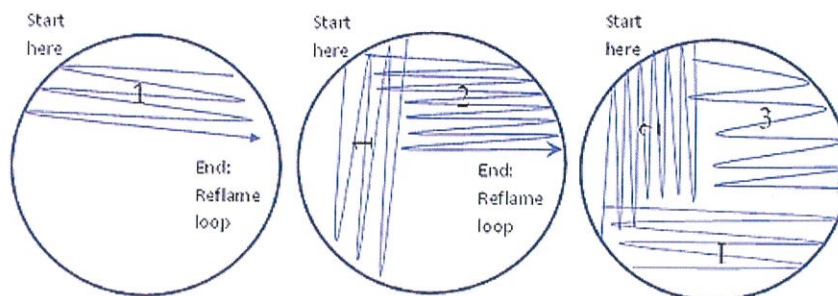
รูปที่ 3.1 วิธีการเจือจางแบบ tenfold dilution

จากนั้นนำสารละลายแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรไป spread plate ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเซลเซียส จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนเพลทอาหาร TSA ที่แบ่งเป็น 9 ช่อง โดยแต่ละช่องจะแตะโคโลนี 3 จุด ดังรูป 3.2



รูปที่ 3.2 การคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว

จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak plate โดยการนำลูปไปลงไฟจนร้อนแดงและทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นแตะเชื้อที่คัดแยกได้ นำมาเขียนลงเพลทอาหาร TSA จากนั้นนำลูปไฟจนร้อนแดงอีกครั้ง และทิ้งไว้ให้เย็น รอยที่ 2 จะลากจากรอยแรก ทำเช่นเดียวกันในรอยที่ 3 และ 4 ดังรูป 3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อ



รูปที่ 3.3 วิธี Cross streak plate

ที่มา : <http://fe.rmutl.ac.th/2012/wp-content/uploads/Lab2.-Basic-Techniques-for-Microbiology-56.pdf> (สืบค้นวันที่ 26/5/2561)

3.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

3.2.2.1 การย้อมแกรม

เตรียมเชื้อโดยนำบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลูปที่มีหยดน้ำมาใส่ตรงกลางแผ่นสไลด์ และเชื้อบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้ในแต่ละเพลท ลงบนหยดน้ำ เกลี่ยเชื้อ (smear) ให้เป็นวงกว้าง รอจนแห้ง นำสไลด์ที่มีเชื้อมาผ่านไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อตรึงเชื้อ หลังจากนั้น หยดสี Crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา แล้วหยดน้ำยาแกรมไอโอดีน ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาและล้างอีกครั้งแอลกอฮอล์ 95% นาน 15-20 วินาที ย้อมทับด้วยสี Safranin o ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 1,000 เท่า ถ่ายรูปและบันทึกการติดสี รูปร่าง และการเรียงตัวของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.2.2 การย้อมเอนโดสปอร์

เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสไลด์ที่จะย้อมโดยหยดน้ำกลั่นบนสไลด์แก้ว 1 หยด ใช้ลูปแตะเชื้อที่แยกได้ในแต่ละเพลท ลงบนหยดน้ำ เกลี่ยเชื้อ (smear) ให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆบนสไลด์ รอจนแห้ง นำสไลด์ที่มีเชื้อมาผ่านไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อตรึงเชื้อ แล้ววางไว้ให้เย็น นำสไลด์ที่เตรียมไปวางบนหม้อน้ำเดือดที่มีไอน้ำนำมาพาความร้อนมาถึงแผ่นสไลด์ได้ หยดสี malachite green ลงบนสไลด์จนท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 5 นาที คอยเติมสีเพื่อป้องกันสีแห้ง เมื่อครบเวลาใช้ปากคีบจับสไลด์เทสีออก ล้างสีด้วยน้ำประปา นำสไลด์ที่เตรียมไว้วางบนที่วางสไลด์สำหรับย้อมสีที่อ่อนน้ำ ย้อมทับด้วยสี Safranin O ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 1,000 เท่า ถ่ายรูปและบันทึกการติดสีของเชื้อและเอนโดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.3 การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน

เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมหัวเชื้อโดยนำลูปเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น และเชื้อที่เตรียมไว้มา 1 ลูป ใส่ลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิเปตส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนเพลทน้ำมันเครื่องและเพลทน้ำมันพืช บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการกระจายตัวของน้ำมัน

3.2.4 การทดสอบการเกิดอิมัลชัน

เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมหัวเชื้อโดยนำลูปเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น และเชื้อที่เตรียมไว้มา 1 ลูป ใส่ลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิเปตส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวปลอดเชื้อซึ่งบรรจุน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเกิดอิมัลชัน และคำนวณดัชนีการเกิดอิมัลชัน ตามสูตร $\frac{A}{B} \times 100$ โดย A คือความสูงของชั้นอิมัลชันซึ่งมองเห็นเป็นชั้นขุ่นๆระหว่างน้ำมันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ B คือความสูงของชั้นของเหลวทั้งหมด

3.2.5 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.2.5.1 การใช้อากาศในการเจริญ

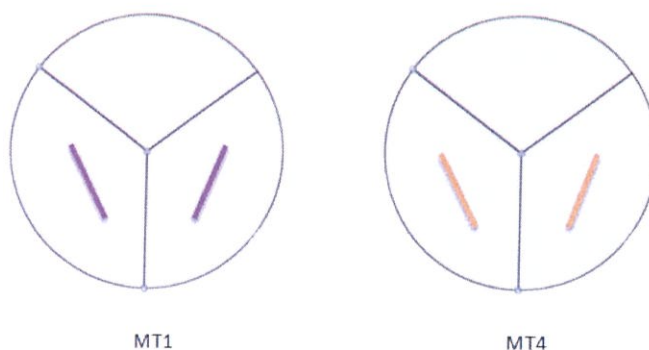
เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อ MT 1 และ MT 4 ซึ่งเป็นเชื้อที่ให้ค่า Emulsification สูงที่สุด 2 อันดับแรก มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น และเชื้อ MT 1 และ MT 4 มาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร TSB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เชื้อละ 2 หลอด หลังจากลงเชื้อแล้วหยด paraffine oil ทับ หลอดใดหลอดหนึ่ง บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตความขุ่นของหลอดทดลอง และบันทึกผล

3.2.5.2 ความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล

เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อ MT 1 และ MT 4 มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลูปเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น และเชื้อ MT 1 และ MT 4 จากเพลท ใส่ลงในหลอด Glucose fermentation broth Lactose fermentation broth และ Sucrose fermentation broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิดกรด ก๊าซและสีของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่ง Bromthymol blue จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง

3.2.5.3 การสร้างเอนไซม์ amylase

เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อ MT 1 และ MT 4 มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลูปเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น และเชื้อ MT1 และ MT4 จากเพลท แต่ละลงบนอาหาร starch agar ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งไม่มีการขีดเชื้อ ส่วนที่เหลือขีดเชื้อ ดังรูป 3.4 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการรดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ทั่วผิวหน้าอาหาร สังเกตการเกิดบริเวณใสรอบ ๆ ขีด แสดงว่าสามารถผลิตเอนไซม์ amylase



รูปที่ 3.4 การขีดเชื้อสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์

3.2.5.4 การสร้างเอนไซม์ caseinase

เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อ MT 1 และ MT 4 มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลูปเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น และเชื้อ MT1 และ MT4 จากเพลท แต่ละลงบนอาหาร skim milk agar ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งไม่มีการขีดเชื้อ ส่วนที่เหลือขีดเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิดบริเวณใสรอบ ๆ ขีดเชื้อ แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์ caseinase ได้

3.2.5.5 การสร้างเอนไซม์ lipase

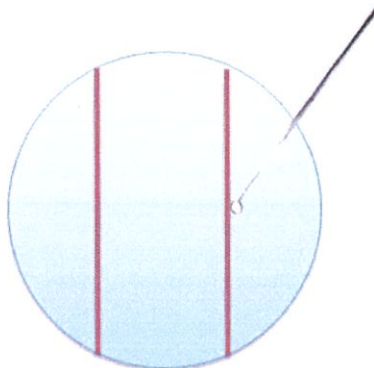
เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อ MT 1 และ MT 4 ได้ มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลูปเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น และเชื้อ MT1 และ MT4 จากเพลท แต่ละลงบนอาหาร corn oil agar ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งไม่มีการขีดเชื้อ ส่วนที่เหลือขีดเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิดสีน้ำเงินของแอสซิดซอลล์ (acid salt) ของกรดไขมันรอบ ๆ ขีดเชื้อ แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้

3.2.5.6 การสร้างเอนไซม์ gelatinase

เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อ MT 1 และ MT 4 มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งให้เย็น จากนั้นเชื้อ MT 1 และ MT4 จากเพลท แทง(stab)ลงไปในหลอดอาหาร nutrient gelatin บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยนำหลอดอาหารที่มีเชื้อมาแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจดูว่าหลอดใดที่อาหารไม่แข็งแสดงว่าสามารถย่อยเจลาตินได้

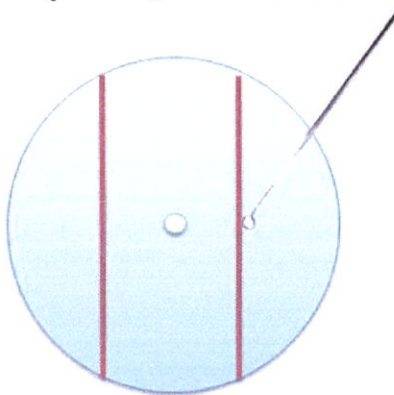
3.2.6 ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อ MT 1 และ MT 4 มา cross streak ลงบนเพลทอาหาร TSA บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งให้เย็นใช้เข็มเผาไฟเชื้อ MT 1 และ MT4 จากเพลท นำมาขีดลงในเพลทอาหาร TSA ดังรูป 3.5



รูปที่ 3.5 การขีดเชื้อสำหรับทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

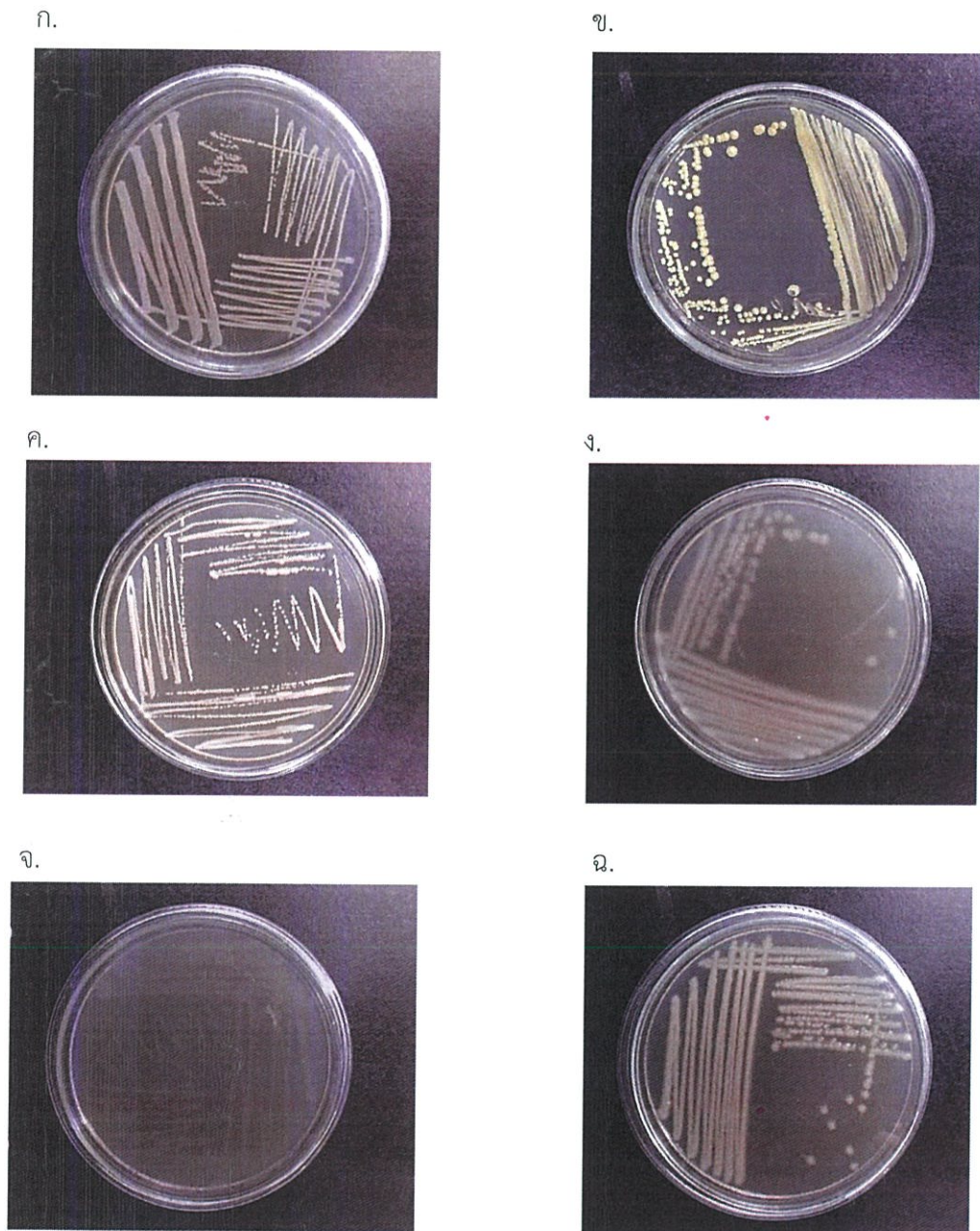
บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เตรียมเชื้อราโดยนำเข็มเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเชื้อเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ลงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดใช้หลอดพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่ทำให้ปลอดเชื้อแล้วเจาะลงไปบนเพลทเชื้อราที่เตรียมไว้โดยเลือกบริเวณที่เป็นเส้นใยอ่อน จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ทำให้ปลอดเชื้อแล้วเขี่ยขึ้นวุ้นที่มีการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ลงบนเพลทอาหาร TSA ที่มีการขีดเชื้อโดยวางขึ้นวุ้นไว้กึ่งกลางเพลทดังรูป 3.6 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเส้นใยราเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 3.6 การวางขึ้นวุ้นสำหรับทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน


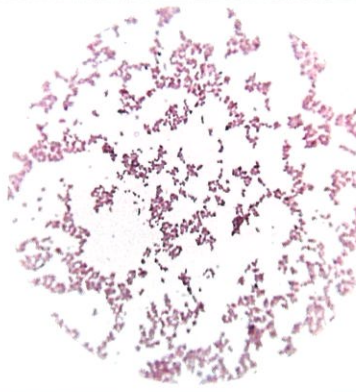

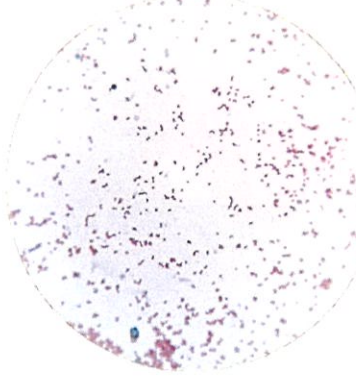
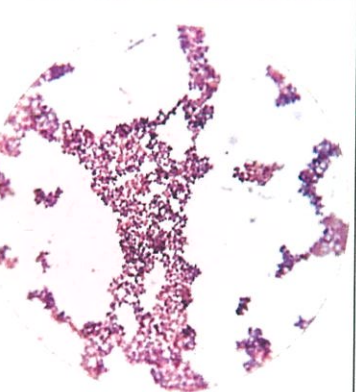
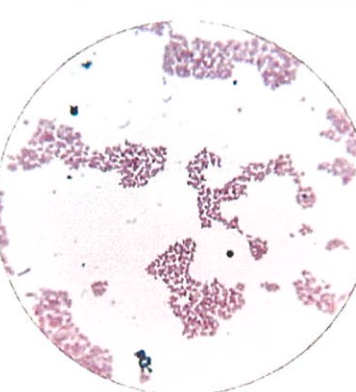


รูปที่ 4.1 ลักษณะของเชื้อที่แยกได้จากดิน MT1 (ก) MT2 (ข) MT3 (ค) MT4 (ง) , MT5 (จ) และ MT6 (ฉ) ที่เจริญบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

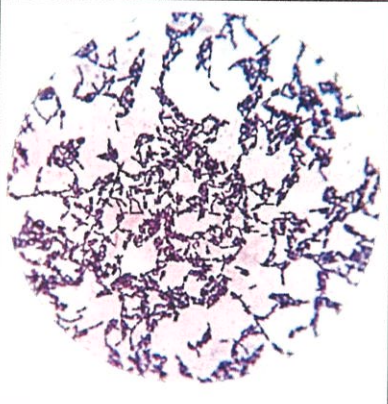
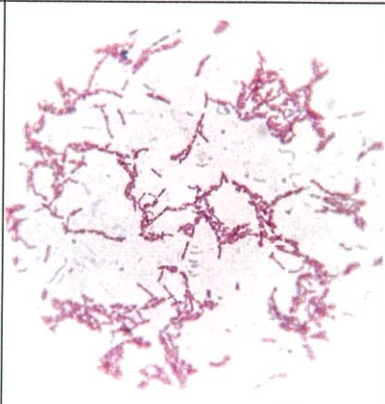
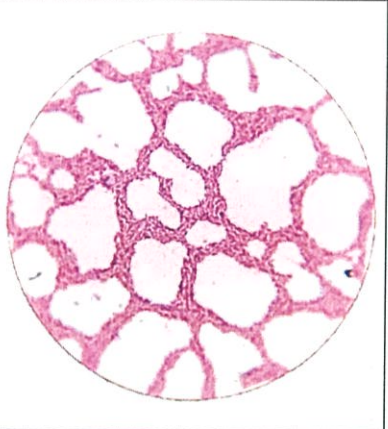
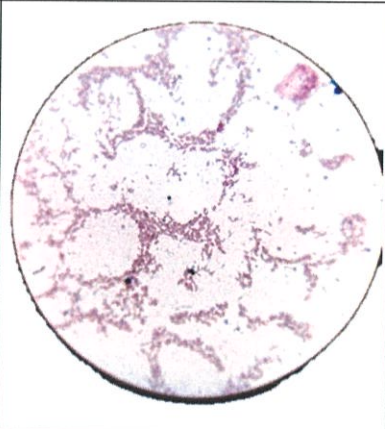

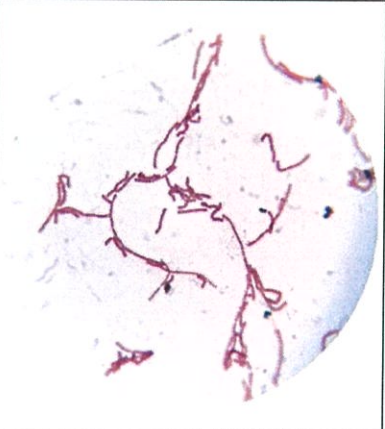
จากรูปที่ 4.1 เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้จากดินไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร TSA ของเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกัน โดย MT1 ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบเรียบ มันวาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดเล็ก นูน MT2 ลักษณะโคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ มันวาว โคโลนีรูปร่างกลม นูน MT3 ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบเรียบ มันวาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดเล็กใหญ่กว่าโคโลนีของ MT1 MT4 ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก ไม่มันวาว ไม่นูน เป็นเส้นใย MT5 ลักษณะโคโลนีสีขาวใส ขอบเรียบ มันวาว โคโลนีรูปร่างกลมนูน และ MT6 ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน ขอบหยัก มันวาว โคโลนีรูปร่างกลมนูน

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียจะเจริญเติบโตบนอาหารและเพิ่มจำนวนทำให้มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเรียกว่า Colony ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันออกไป เช่น ขนาด ความเหนียว ความหยาบ ความละเอียด และสีของโคโลนี ซึ่งความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง และสภาวะที่ใช้ในการบ่ม การศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียโดยดูลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ลักษณะของผิวหน้า ขอบโคโลนี ลักษณะเกี่ยวข้องกับแสง ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นหลักในการจำแนกแบคทีเรียได้ (ศุภณัฐ, 2550)

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการย้อมแกรมและการย้อมสปอร์ ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

เชื้อ	การย้อมแกรม	การย้อมสปอร์	ลักษณะที่สังเกต ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
MT1			ตัวเซลล์ติดสีม่วง รูปร่างกลม อยู่ รวมกันเป็นกลุ่ม การ ย้อมสปอร์ ตัวเซลล์ติดสีแดง ไม่ติดสีเขียว
MT2			ตัวเซลล์ติดสีม่วง รูปร่างกลม อยู่ รวมกันเป็นกลุ่ม การ ย้อมสปอร์ ตัวเซลล์ ติดสีแดง ไม่ติดสี เขียว
MT3			ตัวเซลล์ติดสีม่วง รูปร่างกลม อยู่ รวมกันเป็นกลุ่ม การ ย้อมสปอร์ ตัวเซลล์ ติดสีแดง ไม่ติดสี เขียว

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงผลการย้อมแกรมและการย้อมสปอร์ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน ภายใต้อ่างจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

เชื้อ	การย้อมแกรม	การย้อมสปอร์	ลักษณะที่สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์
MT4			ตัวเซลล์ติดสีม่วง รูปร่างเป็นท่อนสั้น การย้อมสปอร์ ตัวเซลล์ติดสีแดง ติดสีเขียวลักษณะเป็นวงกลมที่กลางเซลล์
MT5			ตัวเซลล์ติดสีม่วง รูปร่างเป็นท่อนสั้น การย้อมสปอร์ ตัวเซลล์ติดสีแดง ไม่ติดสีเขียว
MT6			ตัวเซลล์ติดสีม่วง รูปร่างเป็นท่อนสั้นเรียงต่อกัน การย้อมสปอร์ ตัวเซลล์ติดสีแดง ไม่ติดสีเขียว

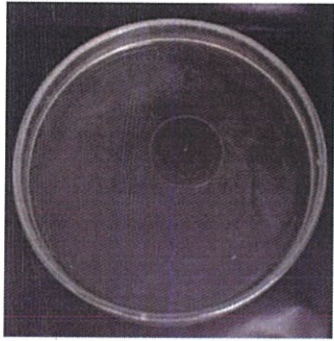
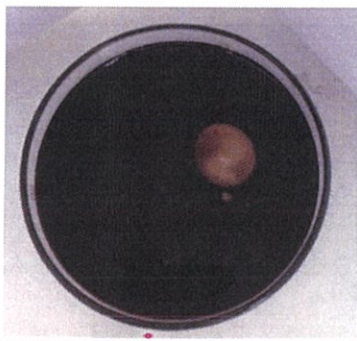
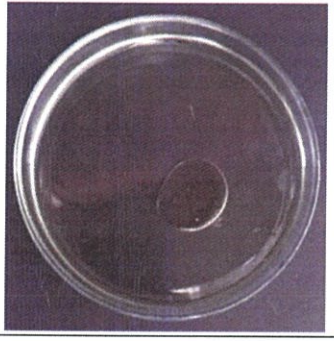
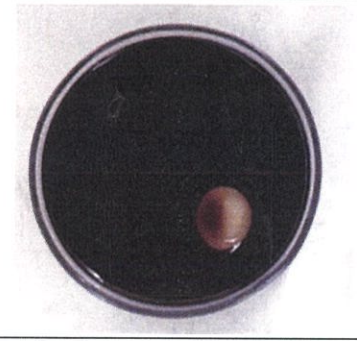
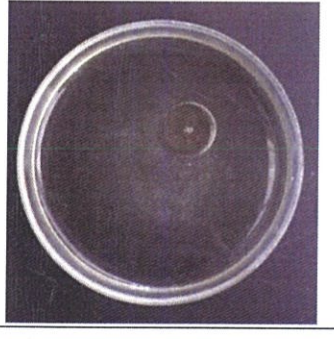
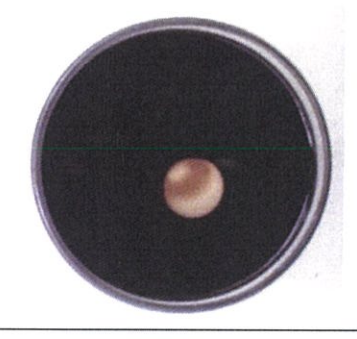

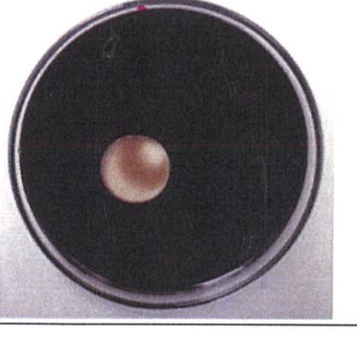
จากตารางที่ 4.1 เมื่อนำเชื้อ MT1 MT2 MT3 MT4 MT5 และ MT6 มาย้อมแกรม จากนั้นส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ติดสีม่วงของ crystal violet และเมื่อนำมาย้อมสปอร์พบว่าเชื้อ MT4 กลางเซลล์ติดสีเขียวของ malachite green และตัวเซลล์ติดสีแดงของ safranin ในขณะที่เชื้ออื่นๆ ติดเพียงสีแดงของ safranin จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์เป็นแกรมบวก และมีเพียง MT4 ที่สามารถสร้างสปอร์ได้

การย้อมแกรม เป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียที่ย้อมติดสี crystal violet เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียที่ย้อมติดสี safranin เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ระหว่างการย้อมจะมีการใส่สารละลายไอโอดีน ซึ่งจับกับ crystal violet เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสารเชิงซ้อน crystal violet-iodine เมื่อล้างออกด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีปริมาณไขมันที่ผนังเซลล์สูงเมื่อชะล้างสีด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์จะไปละลายไขมันที่ผนังเซลล์ทำให้รูของผนังเซลล์กว้างขึ้น สารประกอบเชิงซ้อน crystal violet-iodine จึงหลุดออกมาได้ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกเมื่อชะล้างด้วยแอลกอฮอล์ ผนังเซลล์จะเกิดการสูญเสียน้ำ ทำให้เซลล์เหี่ยวเยื่อหุ้มเซลล์มีรูเล็กลง สารประกอบเชิงซ้อน crystal violet-iodine ไม่สามารถละลายออกมาได้ การติดสีของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง crystal violet มีผลมาจากปัจจัยภายนอกหลายประการ เช่น ปริมาณความร้อนที่ใช้ระหว่างการตรึงรอย smear การใช้ปริมาณเซลล์มากเกินไปบนรอย smear ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมแต่ละขั้นตอน (ปรีชา และคณะ, 2548)

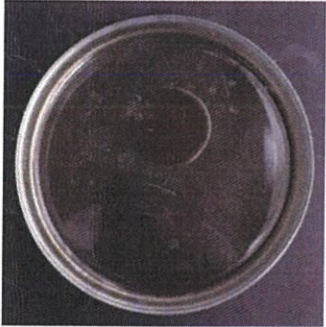

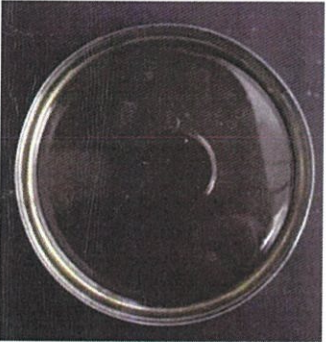
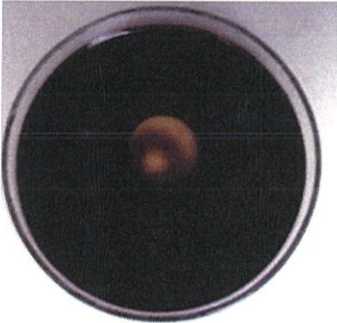

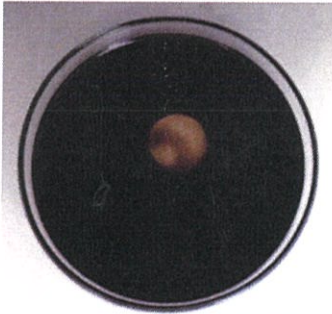

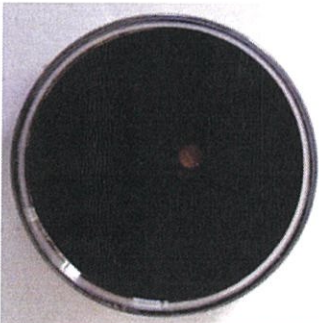
เอนโดสปอร์ (endospore) เป็นส่วนของแบคทีเรียที่ทนทานต่อสภาวะทางกายภาพและเคมี ซึ่งถูกสร้างขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อให้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ในการย้อมสปอร์จะใช้สี malachite green โดยใช้ความร้อนเข้าช่วยในการซึมผ่านของสีเข้าไปในสปอร์ เนื่องจากสปอร์มีผนังที่หนามาก เมื่อย้อมด้วย malachite green ทั้งตัวเซลล์และสปอร์จะติดสีเขียว และเมื่อล้างออกด้วยน้ำ malachite green ที่ตัวเซลล์จะหลุดออกไป ในขณะที่สปอร์ malachite green ไม่สามารถออกมาได้ เมื่อย้อมทับด้วย safranin ตัวเซลล์จึงติดสีแดง และสปอร์ติดสีเขียว (Marise, 2007)

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการกระจายตัวของของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง หลังจากหยดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

ตารางที่ 4.2 แสดงการกระจายตัวของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องหลังจากหยดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ
แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

เชื้อ	การกระจายตัว	
	น้ำมันพืช	น้ำมันเครื่อง
Positive control (Tween 80)		
MT1		
MT2		
MT3		

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงการกระจายตัวของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องหลังจากหยดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ
แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

เชื้อ	การกระจายตัว	
	น้ำมันพืช	น้ำมันเครื่อง
MT4		
MT5		
MT6		
Negative control (broth)		

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าร้อยละการกระจายตัวของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องหลังจากหยดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

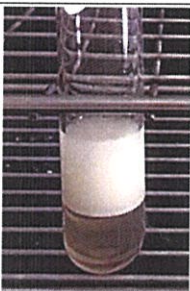

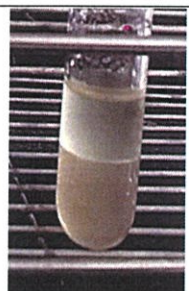

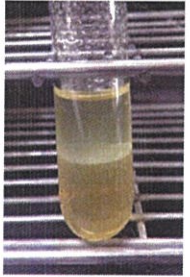
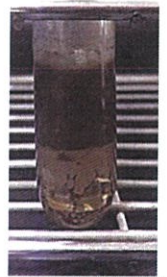
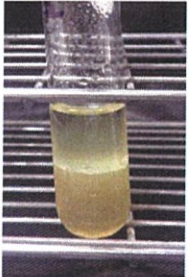

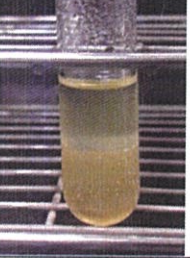



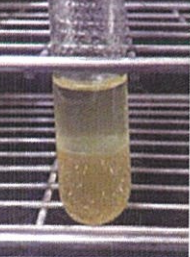

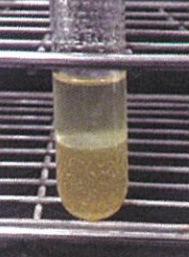

เชื้อ	การกระจายตัวในน้ำมันพืช					การกระจายตัวในน้ำมันเครื่อง				
	เส้นผ่านศูนย์กลางการกระจายตัว(cm)			เฉลี่ย	ร้อยละการกระจายตัว	เส้นผ่านศูนย์กลางการกระจายตัว(cm)			เฉลี่ย	ร้อยละการกระจายตัว
	1	2	3			1	2	3		
Positive control (Tween 80)	2.00	1.80	2.50	2.10	23.33	2.10	2.40	1.50	2.00	22.22
MT1	2.40	1.80	2.00	2.07	23.00	2.00	2.50	1.80	2.10	23.33
MT2	1.80	1.70	1.50	1.67	18.56	1.80	1.50	1.80	1.70	18.89
MT3	1.60	1.60	2.50	1.90	21.11	1.90	2.00	2.10	2.00	22.22
MT4	2.50	2.40	3.00	2.63	29.22	2.00	1.80	1.40	2.07	23.00
MT5	2.00	1.90	1.30	1.73	19.222	1.60	1.80	2.00	1.80	20.00
MT6	1.60	1.70	1.80	1.70	18.89	1.50	1.20	1.50	1.40	15.56
Negative control (TSB)	1.20	0.90	0.80	0.97	10.78	0.70	0.60	0.60	0.63	7.04

จากตารางที่ 4.2 และ 4.3 เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากดินทั้ง 6 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อครบกำหนดนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเอาเซลล์ออก เก็บน้ำเลี้ยงมาทดสอบประสิทธิภาพการกระจายตัวของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องหลังจากหยดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถทำให้น้ำมันทั้งสองชนิดกระจายตัวได้เมื่อเปรียบเทียบกับ Negative control (TSB) และ Positive control (Tween 80) โดยพบว่าน้ำเลี้ยงของเชื้อ MT 4 สามารถทำให้น้ำมันพืชกระจายตัวได้สูงที่สุดคือ ร้อยละ 29.22 รองลงมาคือน้ำเลี้ยงของเชื้อ MT 1 ทำให้น้ำมันพืชกระจายตัวได้ ร้อยละ 23.00 เมื่อพิจารณาความสามารถในการกระจายตัวของน้ำมันเครื่อง พบว่าน้ำเลี้ยงของเชื้อ MT 1 สามารถทำให้น้ำมันเครื่องกระจายตัวได้สูงที่สุดคือ ร้อยละ 23.33 รองลงมาคือน้ำเลี้ยงของเชื้อ MT 4 ทำให้น้ำมันเครื่องกระจายตัวได้ ร้อยละ 23.00

แรงตึงผิว คือ แรงต้านที่ผิวหน้าของของเหลวใด ๆ เป็นแรงเกาะติดระหว่างโมเลกุลที่ผิวของของเหลว โดยของเหลวที่มีแรงตึงผิวสูงจะมีแรงเกาะติดระหว่างโมเลกุลมาก ทำให้ควบคุมรูปร่างให้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรน้อยที่สุดจะเห็นเป็นทรงกลมหรือเป็นหยด เช่น เมื่อหยดน้ำลงบนน้ำมันจะเห็นว่าน้ำไม่สามารถละลายเข้ากับน้ำมันได้ เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิว ทำให้แรงยึดระหว่างโมเลกุลของของเหลวลดลง จึงทำให้น้ำแพร่กระจายในน้ำมันได้ และเห็นเป็นโซนใส (พิมพ์เพ็ญ, 2545)

4.3 การเกิด Emulsion ของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องกับน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการเกิด Emulsion ของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องกับน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

เชื้อ	การเกิดอิมัลชัน		เชื้อ	การเกิดอิมัลชัน	
	น้ำมันพืช	น้ำมันเครื่อง		น้ำมันพืช	น้ำมันเครื่อง
Positive control (Tween 80)			Negative control (TSB)		
MT 1			MT 2		
MT 3			MT 4		
MT 5			MT 6		

ตารางที่ 4.5 แสดงค่า Emulsification Index ของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องกับน้ำเลี้ยงเชื้อ
แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

เชื้อ	การเกิดอิมัลชันในน้ำมันพืช					การเกิดอิมัลชันในน้ำมันเครื่อง				
	ความหนาของชั้น อิมัลชัน (cm)			เฉลี่ย	Emulsifi- cation Index (%)	ความหนาของชั้น อิมัลชัน(cm)			เฉลี่ย	Emulsifi- cation Index (%)
	1	2	3			1	2	3		
Positive control (Tween 80)	1.80	1.80	1.80	1.80	60	1.20	1.20	1.20	1.20	40.00
MT1	0.20	0.20	0.20	0.20	6.67	0.90	0.80	1.00	0.90	30.00
MT2	0.10	0.10	0.10	0.10	3.34	0.50	0.50	0.50	0.50	16.67
MT3	0.10	0.10	0.10	0.10	3.34	0.30	0.30	0.30	0.30	10.00
MT4	1.00	1.00	1.00	1.00	33.34	1.90	1.70	1.80	1.80	60.00
MT5	0.10	0.10	0.10	0.10	3.34	0.10	0.20	0.15	0.15	5.00
MT6	0.10	0.10	0.10	0.10	3.34	0.20	0.40	0.60	0.40	13.33
Negative control (broth)	0	0	0	0	0	0.10	0.10	0.10	0.10	3.33

จากตารางที่ 4.4 และ 4.5 เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากดินทั้ง 6 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยง
ในอาหาร TSB ที่สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
เพื่อให้เชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อครบกำหนดนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเอาเซลล์ออก เก็บน้ำเลี้ยง
มาทดสอบการเกิดอิมัลชันระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อกับน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง และคำนวณ
emulsification index ในน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง พบว่า น้ำเลี้ยงของเชื้อ MT4 เกิดชั้นอิมัลชันได้
สูงที่สุดโดยสังเกตเห็นเป็นชั้นขุ่น ๆ อยู่ระหว่างน้ำมันกับน้ำเลี้ยงเชื้อ และให้ค่า Emulsification index
ร้อยละ 33.34 และ 60 ทั้งในน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องตามลำดับ รองลงมาคือน้ำเลี้ยงของเชื้อ MT 1
ให้ค่า Emulsification index ร้อยละ 6.67 และ 30 ในน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องตามลำดับ ในขณะที่
น้ำเลี้ยงเชื้ออื่นๆ เกิดชั้นอิมัลชันกับน้ำมันได้น้อย

อิมัลชัน (emulsion) คือ ระบบคอลลอยด์ (colloid) ที่ประกอบด้วยของเหลวตั้งแต่ 2 ชนิด
ขึ้นไป ซึ่งปกติไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น น้ำกับน้ำมัน ผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกันได้โดยไม่แยกชั้น
โดยของเหลวส่วนหนึ่งแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ ซึ่งจะกระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง โดย
น้ำกับน้ำมันจะเกิดชั้นอิมัลชันได้ต้องอาศัยอิมัลไฟเออร์ (emulsifier) ซึ่งมักเป็นสารที่สามารถลดแรง
ตึงผิวได้ โดยอาศัยความมีขั้วและไม่มีขั้วของสาร ซึ่งจะหันด้านที่มีขั้วจะจับกับน้ำและด้านที่ไม่มีขั้วจะ
จับกับน้ำมัน ทำให้น้ำกับน้ำมันผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ (พิมพ์เพ็ญ, 2545)

4.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อ MT1 และ MT4

คุณสมบัติทางชีวเคมี	เชื้อ	
	MT 1	MT 4
การใช้อากาศในการเจริญ	+	+
การใช้น้ำตาล glucose	+	-
การใช้น้ำตาล sucrose	-	+
การใช้น้ำตาล lactose	+	+
การสร้างเอนไซม์ caseinase	+	+
การสร้างเอนไซม์ amylase	-	-
การสร้างเอนไซม์ lipase	+	+
การสร้างเอนไซม์ gelatinase	-	+

หมายเหตุ : + เกิดการเปลี่ยนแปลง

- ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง







จากการทดสอบคุณสมบัติการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง และการเกิดอิมัลชันระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อกับน้ำมันพบว่าเชื้อ MT 1 และ MT 4 มีคุณสมบัติในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด จึงนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ผลการทดสอบพบว่าเชื้อทั้ง MT 1 และ MT 4 ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลพบว่า MT 1 สามารถใช้น้ำตาล glucose และ น้ำตาล lactose ในการหมัก โดยไม่เกิดแก๊ส ในขณะที่ MT 4 สามารถใช้น้ำตาล sucrose และ น้ำตาล lactose ในการหมัก โดยไม่เกิดแก๊ส เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างเอนไซม์พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ caseinase และเอนไซม์ lipase ได้ แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase และเชื้อ MT1 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase ได้ ในขณะที่เชื้อ MT 4 สามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น เป็นการทดสอบเพื่อบอกความแตกต่างชนิดของเชื้อ และสามารถนำไปใช้ประกอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีเมตาบอริซึมที่ต่างกัน โดยอาศัยความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล ในหลอดอาหาร fermentation broth ที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบได้แก่ กลูโคส แลคโตส และ ซูโครส เพื่อตรวจสอบกระบวนการหมักของแบคทีเรียเมื่อมีคาร์โบไฮเดรต นอกจากนั้นยังประกอบด้วย nutrient broth ที่เป็นแหล่งกรดอะมิโนและโปรตีน และ phenol red ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ ภายในหลอด fermentation broth จะมีหลอดดักแก๊ส (durham tube) ค้ำอยู่ที่ก้นหลอดเพื่อคอยดักแก๊สที่เกิดจากกระบวนการหมัก โดยสังเกตการเกิดกรด ก๊าซและสีของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป ถ้าอาหารในหลอด fermentation broth เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าแบคทีเรีย

สามารถหมักน้ำตาลได้ให้ผลบวก แต่ถ้าไม่เปลี่ยนสีคือยังเป็นสีน้ำตาลเงินอยู่แสดงว่าเชื้อไม่เกิดการหมักน้ำตาลให้ผลลบ โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งคาร์โบไฮเดรตที่แบคทีเรียย่อยสลายได้มีหลายประเภท ได้แก่ Monosaccharides เช่น glucose fructose xylose Disaccharides เช่น maltose sucrose lactose และ Trisaccharides เช่น raffinose melzitose เป็นต้น (Bulut, 2003) และการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์มีคุณสมบัติในการย่อยสารโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็ก ทำให้ได้เป็นสารอาหารซึ่งจะนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์ ซึ่งแป้ง (starch) เป็นคาร์โบไฮเดรตพวกโพลีแซคคาไรด์ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะเกิดสารประกอบที่มีสีน้ำตาลเงิน แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียจะปล่อยออกนอกเซลล์ (exoenzyme) เพื่อไปย่อยแป้งให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง โดยจะเปลี่ยนแปลงไปเป็น dextrin maltose และ glucose ซึ่งจะสามารถเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ โดยสารประกอบพวก dextrin maltose และ glucose จะไม่ให้สารประกอบสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ caseinase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยเคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนม โดยสามารถเปลี่ยนน้ำนมที่มีลักษณะเป็น colloidal suspension ที่บดแสงและมีสีขาว ให้มีลักษณะเป็น crystalloid suspension คือ ทำให้น้ำนมตกตะกอน และการทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction test) เจลาติน เป็นโปรตีนที่ได้จากการสลายสารพวกคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเอ็นของสัตว์ชั้นสูง แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ gelatinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติย่อยสลาย (proteolytic) เจลาติน โดยสามารถเปลี่ยนเจลาตินจากสภาพแข็ง (gel) ไปเป็นสภาพเหลว (solution) เรียกว่า “liquefaction” แต่แบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญเติบโตใน nutrient gelatin ได้โดยไม่ทำให้เกิด liquefaction ซึ่งจะมีรูปแบบการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ทำให้สามารถนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ (Price and Lee, 1970)

4.5 ทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่สร้างสาร Aflatoxin โดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบ การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่สร้างสาร Aflatoxin โดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
MT 1		
MT 4		
MT 1 และ MT 4		

ตารางที่ 4.8 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสาร Aflatoxin

เชื้อ	<i>Aspergillus flavus</i>						<i>Aspergillus parasiticus</i>					
	Ø การเจริญของเส้นใย(cm)				ร้อยละการเจริญของเส้นใย	ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	Ø การเจริญของเส้นใย(cm)				ร้อยละการเจริญของเส้นใย	ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
	1	2	3	เฉลี่ย			1	2	3	เฉลี่ย		
MT1	0.81	0.79	0.80	0.80	22.86	77.14	0.90	0.87	0.85	0.87	24.86	75.14
MT4	0.60	0.60	0.61	0.60	17.14	82.86	0.62	0.65	0.62	0.63	18.00	82.00
MT1 และ MT4	0.67	0.68	0.66	0.67	19.14	80.86	0.66	0.73	0.72	0.70	20.00	80.00

หมายเหตุ : Ø เส้นผ่านศูนย์กลาง

จากตารางที่ 4.7 และ 4.8 แสดงผลการทดสอบเมื่อนำเชื้อ MT 1 และ MT 4 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* บนอาหาร TSA โดยเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยรากับชุดทดลองควบคุม พบว่า เชื้อ MT4 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้สูงที่สุด ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ MT 1 และ MT4 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ดีใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อ MT4 เพียงเชื้อเดียว และเชื้อ MT1 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้น้อยกว่า MT4 โดยจะสังเกตเห็นเส้นใยราสีขาวแผ่ออกมาจากวงเล็กน้อย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีและชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างได้ 5 ประเภท หนึ่งในนั้นคือ Lipopeptide biosurfactant (LPBSs) ซึ่งประกอบด้วย hydrophobic fatty acid เชื่อมกับ hydrophilic peptide chain โดย LPBSs มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของเซลล์และยับยั้งกระบวนการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และ *pseudomonas* สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ได้ (Washio K., 2010) ซึ่งจากผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นพบว่า เชื้อ MT 4 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อในจีนัส *Bacillus* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนความร้อนจากตัวอย่างดิน ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตสาร Aflatoxin และก่อให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ผลการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวกที่ทนความร้อนได้ 6 สายพันธุ์ได้แก่ MT1 MT2 MT3 MT4 MT5 และ MT6 พบว่าใน 6 สายพันธุ์สามารถสร้างสปอร์ได้ จำนวน 1 สายพันธุ์คือ MT4 เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันโดยวัดการกระจายตัวของน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่อง เมื่อวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันพบว่าทุกสายพันธุ์ให้ค่าการกระจายตัวที่ใกล้เคียงกันแต่แบคทีเรียสายพันธุ์ MT4 เกิดการกระจายตัวของน้ำมันพืชได้สูงที่สุด คือร้อยละ 29.22 และ MT 1 เกิดการกระจายตัวของน้ำมันเครื่องได้สูงที่สุด คือร้อยละ 23.33 การวัด emulsification index พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ MT4 สร้างสารที่เกิดอิมัลชันกับน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องได้สูงที่สุดคือร้อยละ 33.34 และ 60 ตามลำดับ รองลงมาคือสายพันธุ์ MT1 ได้ค่า 6.67 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเชื้อ MT1 และ MT4 ที่ให้ค่า emulsification index และค่าการกระจายตัวในน้ำมันพืชและน้ำมันเครื่องสูงสุดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง เชื้อรา พบว่า MT4 และ MT1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ โดยสายพันธุ์ MT 4 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ดีกว่า MT1 และสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้สูงถึงร้อยละ 82.86 และ 82.00 ตามลำดับ ดังนั้นสรุปว่าเชื้อ MT4 เหมาะสมที่สุด ในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ผลิตสาร Aflatoxin ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมะเร็งในสัตว์ ดังนั้นจึงสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดงานวิจัย โดยศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ โดยต้องศึกษาถึงคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมอื่นๆ ต่อไป

2. สำหรับการต่อยอดงานวิจัยในอนาคตควรศึกษาและระบุสายพันธุ์ของเชื้อที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อเข้าใจคุณสมบัติของเชื้อ การเพาะเลี้ยง และสภาวะการเจริญที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สูงที่สุด นอกจากนี้การระบุสายพันธุ์เชื้อยังสามารถระบุคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพข้ออื่นๆ ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กนิษฐา สังคหะ. 2536. การควบคุมโรคจากเชื้อราในผลผลิตทางการเกษตร. วิทยาศาสตร์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- ดวงจันทร์ สุประเสริฐ และ วนิตา ยุธญาดี. 2545. สารพิษอฟลาทอกซินเอ็ม1ที่ปนเปื้อนในนมโคและนมถั่วเหลือง. วารสารสัตวแพทย์. 12 (2):1-7
- ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2524. อะฟลาทอกซิน. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- บดีนทร์ บุตรอินทร์. 2555. สารพิษจากเชื้อรา อะฟลาทอกซิน. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. 45 (2):1-8.
- ปรีชา สุวรรณพินิจ และนางลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2548. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2545. Surface active / แรงตึงผิว. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1180/coconut-oil>.
- ไพศาล โยธาสมุทร และคณะ. 2551. การเข้าทำลายและพัฒนาของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในเมล็ดข้าวโพด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เยาวมาลย์ และคณะ. 2543 การป้องกันการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์, คู่มือวิชาการเรื่อง อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง. กรมส่งเสริม การเกษตร, กรุงเทพฯ. หน้า 226-228.
- ศุภณัฐ ไพโรหกุล. 2550. Biology : ชีววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: แอกทีฟพริ้นท์.
- โสภณ เอี่ยมศิริถาวร. 2547. โรคจากการได้รับสารพิษจากเชื้อรา อะฟลาทอกซินในคนและสัตว์. วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข. 8 (3): 292-305.
- อรุณศรี วงษ์อุไร. 2540. การตรวจสอบอะฟลาทอกซิน. กรมวิชาการเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร. 240-248.
- Alberts, JF., Gelderblom, WC., Botha, A., van Zyl WH. 2009. Degradation of aflatoxin B(1) by fungal laccase enzymes. Int J Food Microbiol. 135(1):47-52.
- Banat, I.M., Satpute, S.K., Cameotra, S.S., Patil, R., Nyayanit, N. 2014. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production, Front.Microbiol. 5 1-18.
- Besson, J., Nakano MM., Corbell N., Zuber P. 1992. Isolation and characterization of a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet. 232(2):313-21.
- Campos, J.M., Stamford, T.L., Sarubbo, L.A. 2014. Production of bioemulsifier with potential application in the food industry, Appl. Biochem. Biotechnol. 172 3234-3252.

- Christensen, S.A. and Madsen T. 1995. **Cationic surfactants**. [Online]. Available: https://www2.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-596-9/html/indhold_eng.htm
- Coimbra, C.D., Rufino, R.D, Luna, J.M., Sarubbo, L.A. 2009 Studies of the cell surface properties of *Candida* Species and relation with the production of biosurfactants for environmental applications, *Curr. Microbiol.* 58 245–251.
- Cooper, D.G., Zajic J.E. 1980. Surface-Active Compounds from Microorganisms. Chapter in *Advances in applied microbiology* 26:229-253
- Coutinho, J.O.P.A., Silva, M.P.S., Moraes, P.M., Monteiro, A.S., Barcelos, J.C.C., Siqueira, E.P., Santos, L.L. 2013. Demulsifying properties of extracellular products and cells of *Pseudomonas aeruginosa* MSJ isolated from petroleum-contaminated soil, *Bioresour. Technol.* 128 646–654.
- Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol.* 61(1):47-64.
- Dorner, S.M. and Cloe, W.B., 2002. Assessing levels of pathogenic contamination in a heavily impacted river used as a drinking water source. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part A* 67, 1813-1823.
- Edwards, K.R., Lepo, J.E., Lewis, M.A. 2003. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species, *Mar. Poll. Bull.* 46 1309–1316.
- Franzetti, A., Gennaro, P. Di, Bevilacqua A., Papacchini, M., Bestetti, G. 2006. Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation, *Chemosphere* 62 1474–1480.
- George Georgiou, Sung-Chyr Lin and Mukul M. Sharma. 1992. Surface-Active Compounds from Microorganisms. *Bio/Technology* 10(1):60-5
- Geys, W.S., Bogaert, V.B. 2014. Biotechnological opportunities in biosurfactant production, *Curr. Opin. Biotechnol.* 30 66–72.
- Gusmão, C.A.B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A. 2010 Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 1683–1692.
- Herman, D.C., Zhang, Y., Miller-Maier, R.M. 1997. Rhamnolipid (biosurfactant) effect on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 3622–3627
- Huang, X.F., Liu, J., Lu, L.J., Wen, Y., Xu, J.C., D.H. Yang, Q. Zhou., 2009. Evaluation of screening methods for demulsify bacteria and characterization of lipopeptide bio-emulsifier produced by *Alcaligenes* sp., *Bioresour. Technol.* 100 1358–1365.

- Kappeli, O. & Finnetry, W.R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology*. 140, 707-712.
- Kosaric, N. 1996. Biosurfactant in Industry, IUPAC, *Pure and Appl. Chern.* 64(11), 1731-1737.
- Krishnamachari, K.A., R.V. Bhat, V. Nagaragen, and T.B.G. Tilak. 1975. Hepatitis due to aflatoxin-An outbreak in West India. *Lancet I*:1061-1063.
- Krister Holmberg. 2001. Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 148-159
- Lang, S. & Wullbrandt, D. 1999. Microbial biosurfactants production and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 427-444.
- Lawlor, G. Peadar and Lynch PB. 2001. Mycotoxins in pig feeds 1: Source of toxins, prevention and management of mycotoxicosis. In *Irish Veterinary Journal* 54(3):117-120.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M. 2012. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry, *Colloids Surf. B.* 102 202-209.
- Majerus, P. and Otteneder H. 1995. Detection and occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice. *Deutusehe Lebensmittel Rundschau* 92: 388-390
- Morikawa, M., Daido H, Takao T, Murata S, Shimonishi Y, Imanaka T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J Bacteriol.* 175(20):6459-66.
- Nagindu, A., P.K. Johnson, P.R. Kenya, J.A. Ngira, D.M. Ocheng, H. Nandwa, T.N. Omondi, J.J. Jansen, W. Nagre, J.N. Kaviti, D. Gatei, and T.A. Siongok. 1982. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet* 1:1346-1348.
- Rigano, L., Foti C., Vena G.A. and Grandolfo M. 1996. **Chemical structure of surfactant.** [Online]. Available: www.assetsstock.com/chemicals/global-alcohol-ethoxylates-ae-market.html
- Rufino, R.D., Rodrigues, G.I.B., Campos-Takaki, G.M., Sarubbo, L.A., Ferreira, S.R.M. 2011. Application of a yeast biosurfactant in the removal of heavy metals and hydrophobic contaminant in a soil used as slurry barrier, *Appl. Environ. Soil Sci.* 1-7.
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Salgueiro, A.A., Sarubbo, L.A. 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor, *J. Pet. Sci. Eng.* 105 43-50.

- Sarubbo, L.A., Rocha, Júnior, R.B., Luna J.M., Rufino R.D. 2015. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants, *Chem. Ecol.* 31 707–723.
- Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., Chopade, B.A. 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms, *Biotechnol. Adv.* 28 436–458.
- Shane, S.M. 1994. “Economic issues associated with aflatoxin,” in the *Toxicology of Aflatoxins*. London: Academic Press, Inc. pp. 513-527.
- Silva, R.C.F.S., Almeida, D.G., Luna, J.M., Rufino, R.D., Santos, V.A., Sarubbo, L.A. 2014 Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, *Int. J. Mol. Sci.* 15 12523–12542.
- Waliyar, F., Reddy, S.V. 2008. Importance of mycotoxins in food and feed in India. *Aspects of Applied Biology* 68, 147-154.
- Yeh, Y-S, M.C. Yu, C-C. Mo, S. Luo, M.J. Tong, and B.E. Henderson. 1989. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *Cancer Res.* 49:2506-2509.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Tryptic Soy Agar (TSA)

Tryptic Soy Agar	30	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

ซึ่งสารผสมกันตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 ml นำไปอุ่นให้ละลายด้วยไมโครเวฟ ใส่ในขวดฝาเกลียวปริมาตร 250 ml แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptic Soy Agar	30	g
Distilled water	1,000	ml

ซึ่งสารผสมกันตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 ml ใส่ในขวดฝาเกลียวปริมาตร 250 ml แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar	39	g
Distilled water	1,000	ml

ละลาย PDA 39 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Casein agar (Skim milk agar)

Sodium caseinate	20	g
Glucose	1	g
K ₂ HPO ₄	0.2	g
MgSO ₄	0.2	g
FeSO ₄	trace	
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml
pH 7.0		

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7 นำไปตั้งไฟอ่อน จนส่วนผสมละลายเข้ากันดีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Corn oil agar

Peptone	10	g
Yeast extract	3	g
NaCl	5	g
Agar	20	g
Distilled water	900	ml

ต้มส่วนผสมเพื่อให้มันละลาย ปรับ pH เป็น 7.8 ด้วย 1 N NaOH เติม Victoria blue B (1 : 1,500 ในน้ำ) 100 ml เติมน้ำมันพืช ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Starch agar

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Soluble starch	10	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.0

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7 นำไปตั้งไฟอ่อน จนส่วนผสมละลายเข้ากันดีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Nutrient gelatin

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Gelatin	120	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.0

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7 นำไปตั้งไฟอ่อน จนส่วนผสมละลายเข้ากันดีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Sucrose broth

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Sucrose	10	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

Bromthymol blue 0.2%	15	ml
pH 6.8 -7.0		

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 6.8 -7.0 นำไปตั้งไฟอ่อน จนส่วนผสมละลายเข้ากันดีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Glucose broth

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Glucose	10	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml
Bromthymol blue 0.2%	15	ml
pH 6.8 -7.0		

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 6.8 -7.0 นำไปตั้งไฟอ่อน จนส่วนผสมละลายเข้ากันดีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Lactose broth

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Lactose	10	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml
Bromthymol blue 0.2%	15	ml
pH 6.8 -7.0		

ผสมส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 6.8 -7.0 นำไปตั้งไฟอ่อน จนส่วนผสมละลายเข้ากันดีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เพาะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ลงบนอาหาร TSA ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB นำไปบ่มเขย่าด้วยเครื่อง Incubator Shaker ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเก็บรักษาเชื้อ

3.1 การเตรียมอาหาร

Tryptic Soy Agar	3	g
Glycerol	20	ml
Distilled water	100	ml

นำสารผสมกันตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2 การเก็บเชื้อ

ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอด ependroft sterile ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใช้ลูปแตะเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาลงในหลอด ependroft ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 1 นาที พันหลอดด้วยเทปใสและพาราฟิล์ม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมชุดควบคุมเชื้อรา

เชื้อเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus flavus* จาก stock culture มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ภาคผนวก ข

ผลการทดสอบการใช้อากาศในการเจริญ หลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เชื้อสายพันธุ์ MT1

หลอดที่ใส่ paraffin oil

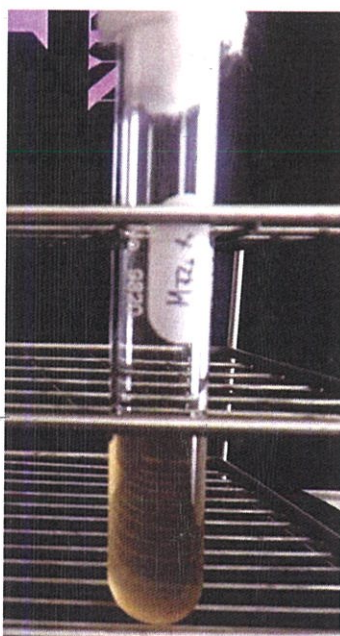


หลอด control

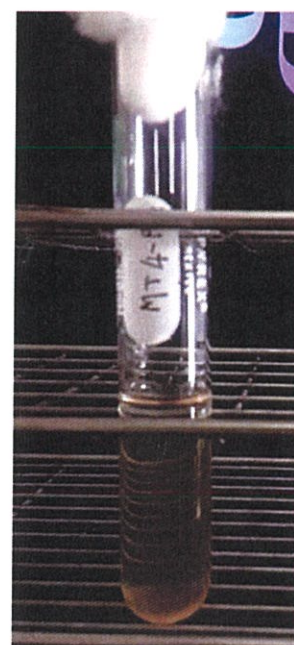


เชื้อสายพันธุ์ MT4

หลอดที่ใส่ paraffin oil



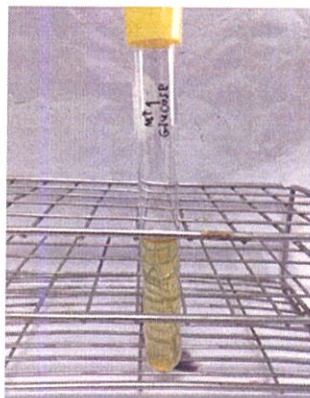
หลอด control



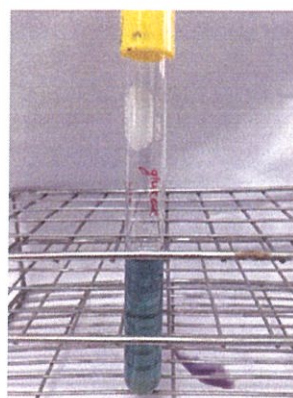
ผลการทดสอบทางชีวเคมี หลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การใช้น้ำตาล glucose

เชื้อสายพันธุ์ MT1



เชื้อสายพันธุ์ MT4



การใช้น้ำตาล sucrose

เชื้อสายพันธุ์ MT1

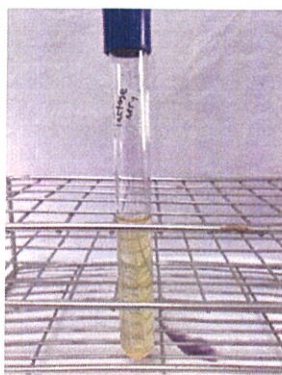


เชื้อสายพันธุ์ MT4

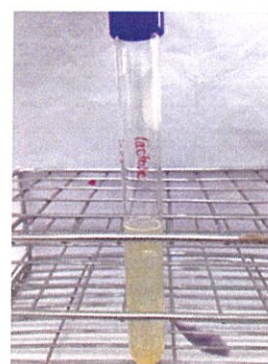


การใช้น้ำตาล lactose

เชื้อสายพันธุ์ MT1



เชื้อสายพันธุ์ MT4



การสร้างเอนไซม์ caseinase

เชื้อสายพันธุ์ MT1

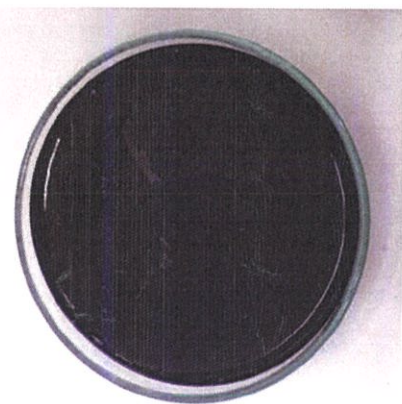


เชื้อสายพันธุ์ MT4



การสร้างเอนไซม์ amylase

เชื้อสายพันธุ์ MT1

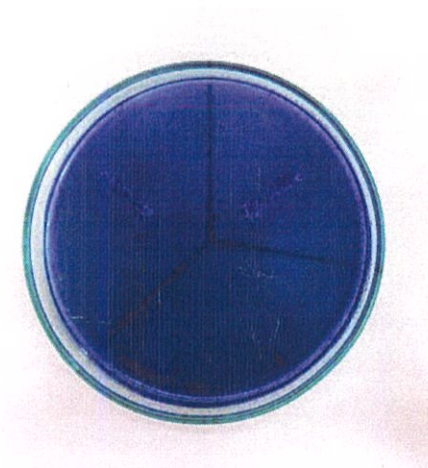


เชื้อสายพันธุ์ MT4



การสร้างเอนไซม์ lipase

เชื้อสายพันธุ์ MT1

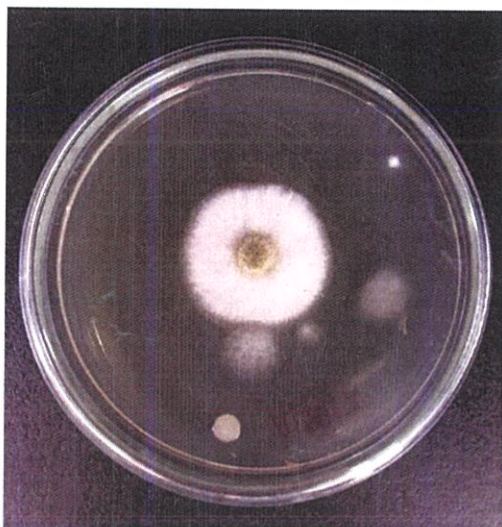


เชื้อสายพันธุ์ MT4

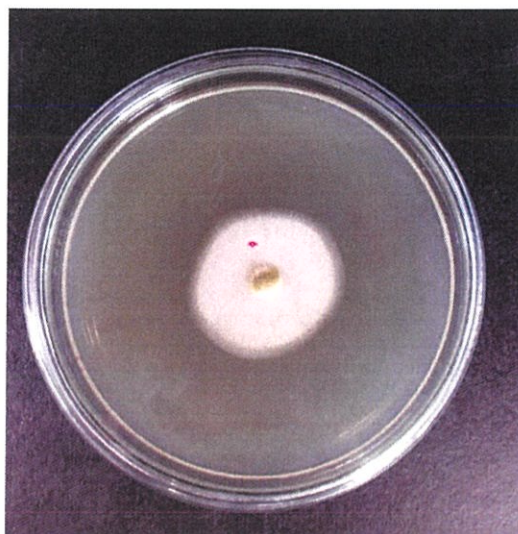


ผลการเตรียมชุดควบคุมเชื้อราบนอาหาร TSA หลังบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

Aspergillus flavus



Aspergillus parasiticus





งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 16 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว พรศิริค์ เทพมงคล รหัสประจำตัว 57050859

นาย/นาง/นางสาว เพชรรัตน์ ลีกันทา รหัสประจำตัว 57050867

นาย/นาง/นางสาว รหัสประจำตัว

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา...จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม...ภาควิชา...ชีววิทยาประยุกต์

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย...การคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

ชื่อภาษาอังกฤษ...ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA FROM SOIL AND DETERMINATION OF THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITIES

ปีการศึกษา... 2560

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักษรวินิจฉัย... 1.57 % หรือโปรแกรม Turnitin... %

ลงชื่อ พรศิริค์ เทพมงคล ลงชื่อ เพชรรัตน์ ลีกันทา ลงชื่อ

(นางสาวพรศิริค์ เทพมงคล) (นางสาวเพชรรัตน์ ลีกันทา) ()

นักศึกษา นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ศ. / รศ. / ผศ. / ดร. / อ. กन्हดี วงศ์วิเศษ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ...ลงชื่อ...ลงชื่อ

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม