

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ธนขวิญ บุษบัน. 2539 . การลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ที่เลี้ยงใน
ภาวะต่างๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- บงกช สุทธิวานิชกุล . 2540 . การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตไบโอเซอร์แฟกแตนท์
จาก *Bacillus licheniformis* F2.2 . วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชา
จุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พิมลพรรณ พิทยานุกุล. 2533 . หลักการตั้งตำรับยาเตรียมและเครื่องสำอาง. คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล
- องอาจ ธเนศนิตย์ และ จิตนภา มาดี. 2537. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันปาล์ม.
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Ainsworth, S.J. 1990 . Chem. Eng. News. 68 : 25-48 cited in Fiechter, A. 1992. Biosurfactant :
moving towards industrial application. Trends in Biotech. 10: 208-217.
- Arima, K., Kakinuma, A., and Tamura, G. 1968. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31:
488-494. cited in Cooper, D.G. and Zajic, J.E. 1980 . Surface active compounds
from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256.
- Banat, I.M. 1995 . Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced
oil recovery and oil pollution remeiation: a review. Bioresource technol. 51: 1-12
- Beebe, J. L., and W. W. Umbreit. 1971. Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*.
J. Bacteriol. 108: 612-615.
- Belsky, I., D.L., Gutnick, and E. Rosenberg. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 :
Determination of emulsifier bound fatty acids. FEBS Lett. 101: 175-178.

- Bernheimer, A. W., and Avigad, L. S. 1970. J. Gen. Microbiol. 61: 361-369. cited in Cooper, D.G. and Zajic, J.E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256.
- Brundish, D. E., Shaw, N., and Baddiley, J. 1967. Biochem. Biophys. Acta. 120: 148-155. cited in Cooper, D.G. and Zajic, J.E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256.
- Burd, G., and Ward O.P. 1997. Energy-dependent accumulation of particulate biosurfactant by *Pseudomonas marginalis*. Can. J. Microbiol. 43: 391-394.
- Cameron, D. R., Cooper D. G., and Neufeld R. J. 1988. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1420-1425.
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., and Giulietti, A. M. 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 12: 82-84.
- Cirigliano, M. C., and Carman, G. M. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 48: 747-750.
- Cirigliano, M. C., and Carman, G. M. 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 50: 846-850.
- Clint, J. H. 1992. Surfactant aggregation. New York: Chapman and Hall.
- Cooper, D.G., and Goldenberg, B.G. 1987. Surface active agent from two *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 53(2): 224-229.
- Cooper, D.G., and Paddock, D. A. 1983. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1426-1429.
- Cooper, D.G., and Paddock, D. A. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 173-176.
- Cooper, D.G., and Zajic, J.E. 1979. Proceedings of Workshop: "Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments," pp.231-240. Washington, D.C.: Environmental Protection Agency. cited in Cooper, D.G. and Zajic, J.E. 1980.

- Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26 : 229-256.
- Cooper, D.G., and Zajic, J.E. 1980 . Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256.
- Cutler, A. J., and Light R. J. 1979. Regulation of hydroxydocosanoic and sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the level of glucose and yeast extract in the growth medium. J. Biol. Chem. 254: 1944-1950. cited in Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997 .Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47- 64.
- Desai, A. J., Patel K. M., and Desai J. D. 1988. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. Curr. Sci. 57: 500-501.
- Desai, J. D., and Banat, I. M. 1997 .Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47- 64.
- Duvnjak, Z., Cooper, D. G., and Kosaric, N. 1982. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. Biotechnol. Bioeng. 24: 165-175.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactant :moving towards industrial application. Trends in Biotech. 10: 208-217.
- Gilman, L. B. 1993. A review of instruments for static and dynamic surface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss Gmbtt and Scientific promotion Co.,Ltd., at Indra Regent Hotel, BK. Thailand, October 30, 1997.
- Goldman, S., Shabtai, Y., Rubinovitz, C., Rosenberg E., and Gutnick, D. L. 1982. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus*. RAG-1. Appl. Environ. Microbiol. 44: 165-170.
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O., and Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Environ. Microbiol. 48(2): 301-305.

- Guerra-Santos, L.H., Kappeli, O., and Fiechter, A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 443-448.
- Hisatsuka, K., Nakahara, T., Sano, N., and Yamada, K. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* : its function in hydrocarbon fermentations. Agric. Biol. Chem. 35: 686-692.
- Hisatsuka, K., Nakahara, T., and Yamada, K. 1972. Protein-like activator for n-alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*. S₇B₁. Agric. Biol. Chem. 36: 1361-1369.
- Holt, J.G. , Krieg,N.R. , Sheath, P.H.A., Staley,J.T. and Williams,S.T. 1994 . Bergey's Manual of determinative bacteriology. Ninth edition., U.S.A.: Williams & Wilkins.
- Hommel, R. K., and Huse K. 1993. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. Biotechnol. Lett. 15: 853-858.
- Horowitz, S., Gilbert J. N., and Griffin W. M. 1990. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. J. Ind. Microbiol. 6: 243-248.
- Inoue, S., and Itoh S. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1278-1283.
- Jarvis, F. G., and Johnson M. J. 1949. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. 71: 4124-4126. cited in Desai,J.D. and Banat,I.M. 1997 .Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47- 64.
- Jenny,K., Deltrieu, V., and Kappli, O. 1993 . Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. :135-156 cited in N. Kosaric(ed.) Biosurfactants. Marcel Dekker,Inc. New York.
- Kappeli, O., and Fiechter, A. 1977. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. J. Bacteriol. 133: 952-958.

- Kappeli, O., and Finnerty, W. R. 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. J. Bacteriol. 140: 707-712.
- Kitamoto, D., Fuzishiro T., Yanagishita H., Nakahara T. 1992. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antartica*. Biotechnol. Lett. 14: 305-310.
- Knoche, H. W., and Shively J. M. 1972. The structure of an ornithine containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. J. Biol. Chem. 247: 170-178
- Koronelli, T. V., Komarova T. I., and Denisov Y. V. 1983. Chemical composition and role of peptidoglycolipid of *Pseudomonas aeruginosa*. Mikrobiologiya, 52: 767-770. cited in Desai, J.D., and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47- 64.
- Kosaric, N. 1993. Biosurfactants *Production *Property*Application. Surfactant Science Series : vol.48 Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kretschmer, A., Bock H., and Wagner F. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkane. Appl. Environ. Microbiol. 44: 864-870.
- Lang, S., and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids biosynthesis microbial production and application potential. Mini-Review Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 22-32
- Lee, K.H., and Kim, J.H. 1993. Distribution of substrates carbon in sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*. Biotechnol. Lett. 15(3): 263-266.
- Mercade, M. E., Manresa, M. A., Robert, M., Espuny, M.J., De Andres, C., and Guinea, J. 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. Bioresource technol. 43 : 1-6
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. J. Bacteriol. 175: 6459-6466.

- Mulligan, C. N., Cooper, D. G., and Neufeld, R. J. 1984. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. J. Ferment. Technol. 62: 311-314.
- Mulligan, C. N., and Gibbs, B. F. 1989. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3016-3019.
- Navonvenezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z., and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3240-3244.
- Palejwala, S., and Desai, J.D. 1989 Production of an extracellular emulsifier by a grain negative bacterium. Biotechnol. Lett. 11(2):115-118.
- Patel, R.M., and Desai, A.J. 1990 . Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses . Letter in Appl. Microbiol. 25 : 91-94
- Persson A. and Molin G. 1987.Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates. Appl.Microbiol. Biotechnol.26: 439-442.
- Persson, A., Osterbery, E., and Dostalek, M. 1988. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* growth and product characteristics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29:1-4.
- Ramana K.V., Charyulu, N.C.L.N., and Karanth, N.G. 1991. A mathematical model for the production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6: Production of biomass. J. Chem. Tech. Biotechnol. 51: 525-538.
- Ramana K.V., and Karanth, N.G. 1989(a). Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J. Chem. Tech. Biotechnol. 45:249-257.
- Ramana K.V., and Karanth, N.G. 1989(b). Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. Biotechnol. Lett. 11(6):437-442.

- Reiling, H.E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L.H., Hirt, R., Kappeli, O., and Fiechter, A. 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 51(5):985-989.
- Ristau, E., and Wagner F. 1993. Formation of novel anionic trehalosetetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. Biotechnol. Lett. 5: 95-100.
- Robert, M., Mercade M. E., Bosch M. P., Parra J. L., Espuny M. J., Manresa M. A., and Guinea J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. Biotechnol. Lett. 11: 871-874.
- Rosenberg, E., Zuckerberg A., Rubinovitz C., and Gutnick D. L. 1979. Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 402-408.
- Sudhakar. Babu, P., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R, Juwarkar, A., and Khanna, P. 1996. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. Biotechnol. Lett. 18(3): 263-268.
- Sim, L., Ward, O.P. , and Li, Z.Y. 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. J. Ind. Microbiol. & biotechnol. 19:232-238.
- Sheppard J.D., and Mulligan C.N. 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grow on peat hydrolysate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:110-116.
- Shaw, N. 1974. Adv. Appl. Microbiol. 17: 63-108. cited in Cooper, D.G. and Zajic, J.E. 1980 . Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26 : 229-256.
- Syldatk, C., Lang S., and Wagner F. 1985. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp. DSM 2874 grown on n-alkanes. Z. Naturforsch. 40C:51-60. cited in Lang, S., and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnolipids biosynthesis microbial production and application potential. Mini-Review Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:22-32.

- Van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., and Trevors, J.T. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant : structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil . Can. J. Microbiol. 39 : 1071-1078.
- Wicken, A. J., and Knox, K. W. 1970. J. Gen. Microbiol. 60: 293-301. cited in Cooper, D.G., and Zajic, J.E. 1980 . Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26 : 229-256.
- Wistreich, G.A. , and Lechtman, M.D. 1988 . Laboratory Exercises in Microbiology . Sixth edition. Macmillan Publishing Company . New York . U.S.A. p.578.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V., and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1706-1713.
- Zhang Y., and Miller R. M. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl. Environ. Microbiol. 58:3276-3282.
- Zukerberg, A., Diver A., Peeri Z., Gutnick D. L., and Rosenberg E. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 414-420.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเหลว วายเอ็ม (YM medium)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3.0 กรัม
เปปโตน (peptone)	5.0 กรัม
กลูโคส (glucose)	10.0 กรัม
วุ้นผง (agar)	20.0 กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121°C เป็นเวลา 15 นาที)

1.2 อาหารวุ้นนิวเตรียนท์ (Nutrient agar)

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0 กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	5.0 กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0 กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.3 อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth)

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

1.4 อาหารเหลวแอลบี (LB broth)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
ทริปโตเน (tryptone)	10.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		
1.5 อาหารกำหนดสูตร (defined medium)		
กลูโคส (glucose)	20.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
กรดฟอสเฟอริก (H_3PO_4)	0.5	มิลลิลิตร
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.284	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.71	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.7	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.9	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.3	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1	มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโทเทเนต (Calcium-Pantothenate)	1.176	ไมโครกรัม
ไบโอติน (Biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (<i>p</i> -aminobenzoic acid)	0.588	มิลลิกรัม
ไพริดอกซีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588	มิลลิกรัม
ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		
1.6 อาหารกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (defined medium)		
น้ำมันปาล์ม (Palm oil)	20.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4	กรัม

โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
กรดฟอสเฟอริก (H_3PO_4)	0.5	มิลลิลิตร
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.284	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.71	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.7	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.9	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.3	มิลลิกรัม
โคบอลคลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1	มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium-Pantothenate)	1.176	ไมโครกรัม
ไบโอติน (Biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (<i>p</i> -aminobenzoic acid)	0.588	มิลลิกรัม
ไพริดอกซีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588	มิลลิกรัม
ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการตรวจผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ในการจำแนกเชื้อที่คัด
เลือกได้

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเตรียมเรียบร้อยแล้วจะนำไปอบฆ่าเชื้อ โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.1 MacConkey agar

เปปโตน (peptone)	17.0 กรัม
พอลิเปปโตน (polypeptone)	3.0 กรัม
แลคโตส (lactose)	10.0 กรัม
Bile salts	1.5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0 กรัม
วุ้นผง	13.5 กรัม
neutral red	0.03 กรัม
crystal violet	0.001 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

pH 7.1

1.2 อาหารเจลาติน (gelatin medium)

อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (nutrient broth)	0.8 กรัม
เจลาติน (gelatin)	12.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

1.3 อาหารแป้ง (starch agar)

อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (nutrient broth)	0.8 กรัม
แป้ง (soluble starch)	1.0 กรัม
วุ้นผง	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

1.4 อาหารกึ่งเหลว (semi- solid medium)

ทริปโตส (tryptose)	1.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5 กรัม
วุ้นผง (bacto-agar)	0.5 กรัม
ไตรฟีนิล เตตระโซเลียมคลอไรด์ 0.5 % (triphenyltetrazoliumchloride)	10.0 มิลลิลิตร

1.5 อาหารเหลวไนเตรท (nitrate broth)

โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)	1.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5 กรัม
เปปโตน	2.0 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000.0 มิลลิลิตร
ใส่หลอด Durham's tube เพื่อดักก๊าซ	

1.6 Triple Sugar Iron (TSI) agar

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0 กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	15.0 กรัม
แบคโตโปรติโอสเปปโตน (bacto proteose peptone)	5.0 กรัม
แบคโตเดรกโตส (dextrose)	1.0 กรัม
แบคโตแลคโตส (lactose)	10.0 กรัม
แบคโตซูโครส (sucrose)	10.0 กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต	0.3 กรัม
วุ้นผง (bacto agar)	12.0 กรัม
แบคโต ฟีนอล เรด (bacto phenol red)	0.024 กรัม

1.7 อาหารสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาล

Phenol red broth base

16.0 กรัมต่อลิตร

น้ำตาลชนิดต่างๆเข้มข้น 1 % w/v ได้แก่ กลูโคส แรมโนส กาแลคโตส แลคโตส มอลโตส ฟรุคโตส ซูโครส แมนโนส เซลโลไบโอส อะราบีโนส ไซโรส แมนนิทอล ซอร์บิทอล อินดิทรีทอล และกลีเซอรอล

2. การตรวจผลการทดสอบ

2.1 การเจริญบน MacCONKEY agar

เพื่อดูการใช้น้ำตาลแลคโตส ถ้าเชื้อแบคทีเรียใช้น้ำตาลแลคโตสไม่ได้ โคโลนีจะใส ไม่มีสี แสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก non-lactose fermentor ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ โคโลนีจะมีสีชมพูแสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก lactose fermentor นอกจากนี้ถ้าเชื้อสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S) ได้ โคโลนีจะมีสีดำ

2.2 การทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction test)

ความสามารถในการย่อยหรือทำให้เจลาตินเหลว มีประโยชน์มากในการดูความแตกต่างของสกุลและชนิดของแบคทีเรีย เช่น Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae . หลังจากปลูกเชื้อในลักษณะ stab ในอาหารเหลวที่มีเจลาติน 12 % เป็นเวลา 2 - 30 วัน ตรวจสอบการเหลวของเจลาติน โดยนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาดูการเหลวเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เติมเชื้อ

strong positive ทำให้อาหารเหลวที่อุณหภูมิห้องภายใน 3 วัน

weak positive ทำให้อาหารเหลวที่อุณหภูมิห้องภายใน 3 วัน

2.3 การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

การทดสอบการย่อยแป้งในแบคทีเรียใช้สารละลายไอโอดีน จะเกิดสีน้ำเงินกับอะไมโลส (amylose) และเกิดสีแดงถึงม่วงกับอะไมโลเปคติน (amylopectin) ดังนั้นถ้าหยดแล้วไม่เกิดสีแดงหรือม่วง แสดงว่าแป้งถูกย่อย การดูผลจะต้องดูทันทีหลังจากหยดสารละลายไอโอดีนลงไป เพราะสีน้ำเงินอาจจะเกิดขึ้นได้กับแป้งส่วนที่เหลือ ถึงแม้จะมีปริมาณน้อย

วิธีทดสอบ เมื่อมีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นบนอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ให้หยดสารละลายไอโอดีน 2 - 3 หยดรอบๆโคโลนี อ่านผลทันที

ผลบวก อาหารจะเป็นสีน้ำเงิน แต่รอบๆโคโลนีจะไม่มีสี (colorless zone)

ผลลบ เป็นสีน้ำเงินทั้งหมด

2.4 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ (Mobility)

ถ้าเชื้อเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งเหลวได้ (semi solid medium) จะเห็นสีแดงของ ไตรฟีนิล เตตระไฮโดรเลียมคลอไรด์ (triphenyltetrazoliumchloride) รอบๆโคโลนีจนทั่วอาหาร แสดงว่า เชื้อมีการเคลื่อนไปในอาหารกึ่งเหลวได้ แต่ถ้าเห็นสีแดงเฉพาะบริเวณที่มีการเจริญของเชื้อ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

2.5 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท (Citrate utilization)

อาหารที่ใช้ทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรทได้แก่ Simmons citrate agar (Difco) ซึ่งจะมีซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว มีบรอมโทไมออน บลู (bromthymol blue) เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อปลูกเชื้อโดยการ stab ลงไปในอาหาร เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ซิเตรทได้จะเจริญมากมาย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีภาวะเป็นด่างและทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีจากเดิมสีเขียวเป็นสีน้ำเงินเข้ม ภายในเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

2.6 การทดสอบความสามารถในการใช้ในเตรท (Nitrate test)

2.6.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบมี 2 ชนิด คือ

A) sulfanilic acid : เตรียมโดยละลาย 8 กรัมของ sulfanilic acid ใน 1 ลิตรของ 5 Nของกรดอะซิติก

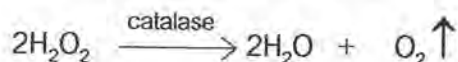
B) α -naphylamine : เตรียมโดยละลาย 5 กรัมของ α -naphylamine ใน 1 ลิตรของ 5 Nของกรดอะซิติก

หมายเหตุ สารเคมีทั้ง 2 นี้ต้องเก็บในตู้เย็น และควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.6.2 หยดสาร A และ B 3 - 4 หยด ตามลำดับ ถ้าเชื้อสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์ได้ แสดงว่ามี กิจกรรมของเอนไซม์ nitratase จะเกิดสีชมพูขึ้น ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนสี อาจแปลผลการทดลองได้สองทางคือ ทางที่หนึ่ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีไนไตรต์ เพราะเชื้อไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรต์ได้ หรือทางที่สอง คือเชื้อสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรต์ และไนไตรต์ที่ได้ถูกรีดิวซ์ต่อไป ดังนั้นถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนสี จำเป็นต้องทำการทดลองต่อไปว่าเชื้อสามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้หรือไม่ ทำการทดลองโดยการเติมผงสังกะสี (zinc dust) เล็กน้อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เกิดการเปลี่ยนสีนั้น ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีไนเตรท จะถูกผงสังกะสีรีดิวซ์ให้เป็นไนไตรต์ทำให้เกิดสีชมพู แสดงว่าเชื้อไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ แต่ถ้าเชื้อสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรต์ซึ่งถูกรีดิวซ์ต่อไปแล้ว จะไม่พบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าเชื้อรีดิวซ์ไนเตรทได้

2.7 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (Catalase test)

ใช้ตรวจสอบว่าเชื้อต้องการออกซิเจนในการเจริญหรือไม่และเชื้อมีเอนไซม์คาตาเลสหรือไม่ กลไกการทำงานของเอนไซม์คาตาเลส มีดังนี้



วิธีทดสอบ

1. หยดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีความเข้มข้น 3% 2-3 หยด ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด

2. ใช้ลูปป้ายเชื้อที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ลงบนสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ แล้วผสมให้เข้ากัน

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส ออกซิเจน

ผลลบ ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น

2.8 การตรวจสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต

เมื่อเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหาร phenol red base broth ที่มีน้ำตาลหรือ คาร์โบไฮเดรต ตรวจสอบผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหาร ซึ่งเดิมอาหารมีสีแดง

ผลบวก สีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองออกส้ม เนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาล หรือ คาร์โบไฮเดรตชนิดนั้นได้และปล่อยกรดออกมา ทำให้สีของอาหารเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองหรือสีส้ม

ผลลบ สีของอาหารจะไม่เปลี่ยน เนื่องจากเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นๆ เป็นแหล่งพลังงานได้

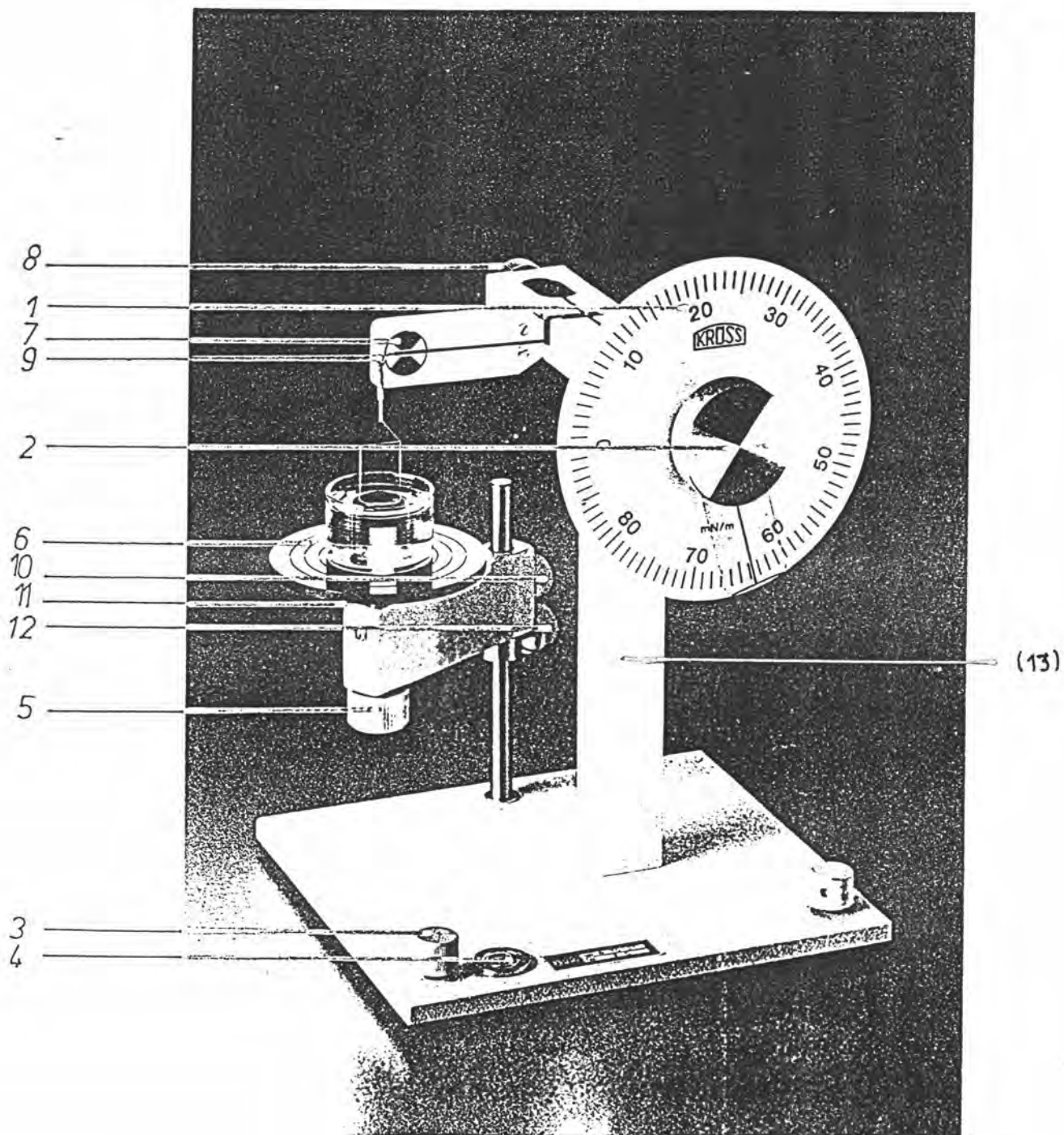
3. การตรวจสอบการติดสีแกรม

เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมสีด้วย สารละลาย crystal violet (Gram CV) เป็นเวลา 1 นาที เชียงสไลด์ เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง พร้อมทั้งหยด แอลกอฮอล์ 95% ล้างสีส่วนเกินออกนาน 20 วินาที ล้างแผ่นสไลด์ ด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย safranin O เป็นเวลา 30-40 วินาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่น อีกครั้งซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์ การจัดเรียงตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

ภาคผนวก ค

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

รูป เครื่องวัดแรงตึงผิว (Tensiometer รุ่น K6 ของบริษัท Kruss , Germany



การใช้เครื่อง Kruss Tensiometer K6

- 1 ปรับ handwheel with pointer [2] ให้สเกลมีค่าเป็นศูนย์
- 2 ปรับ zero adjustment[8] โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกา(ไม่เกินรอบ) ให้ balance beam [9] อยู่ในตำแหน่งสมดุล กึ่งกลางของ mark [7]
- 3 ปรับระดับที่วางตัวอย่างโดยหมุน[10] แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ(สูงพอควร)
- 4 แขนง ring ลงใน balance beam[9] ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุล โดยหมุน zero adjustment[8] หมุนตามเข็มนาฬิกา(ไม่เกินรอบ)
- 5 ใส่ตัวอย่างลงใน vessel[10-50 ml] แล้ววางลงบน sample table[6] แล้วหมุน micrometer screw [5] ตามเข็มนาฬิกา เพื่อยกvessel ขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 mm.
- 6 เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance beam[9] ให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้ง โดยหมุน zero adjustment[8]
- 7 เมื่ออยู่ในตำแหน่งสมดุลแล้ว ก็เริ่มวัดค่าได้โดยการหมุน micrometer screw[5] ลง(อย่างช้าๆ)ทวนเข็มนาฬิกา เพื่อดึงตัวอย่างลง ในขณะที่เดียวกันก็หมุน pointer[2] ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ โดยรักษาสภาพของ balance beam[9] ให้อยู่ในตำแหน่งสมดุล
- 8 เมื่อ ring หมุนออกจากสารตัวอย่างอ่านค่าแรงดึงผิวตามสเกล[1]
- 9 เมื่อเสร็จการทดลองล้าง ring ด้วยน้ำกลั่น สบัตให้แห้ง(หรือผ่านเปลวไฟ) เก็บเข้ากล่องไม้ ส่วน vessel ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น(หรือ acetone) ซักให้แห้ง(หรือผ่านเปลวไฟ)
- 10 การเก็บเครื่องจะต้องปรับ zero adjustment[8] ให้ balance beam[9] ยกขึ้น เพื่อป้องกันการแกว่งของ balance beam ปรับที่ว่างสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง[13]

ข้อควรระวัง

- 1 ห้ามกดปุ่มที่อยู่ด้านหลังของ zero adjustment[8] เด็ดขาด เพราะจะทำให้ wire หลุดได้
- 2 ห้ามหมุน zero adjustment[8] เกิน 1 รอบเด็ดขาด
- 3 การใช้ ring ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังอย่าให้บิดเบี้ยว เพราะถ้า ring เสียรูปจะทำให้การวัดค่าผิดไปได้
- 4 การใช้ vessel ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเช่นกัน

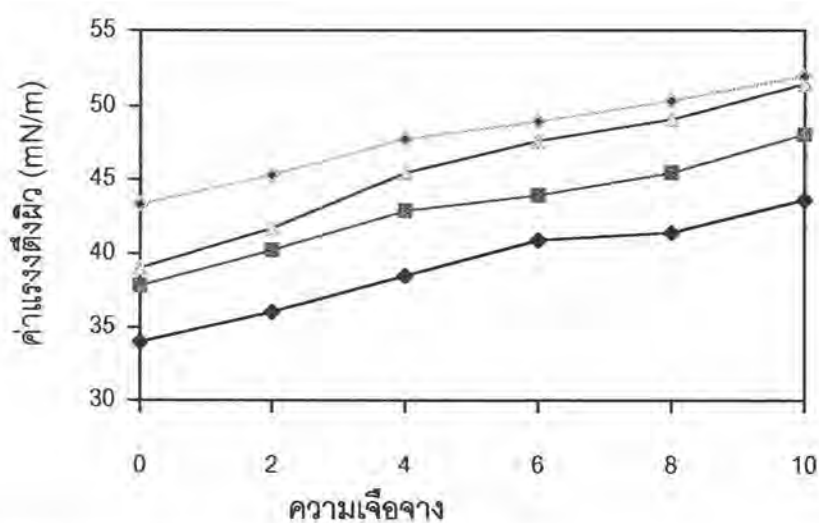
ข้อแนะนำ

1. ขณะวัดค่าแรงตึงผิวตามข้อ 7 ถ้าทำการหมุน micrometer screw[5] และ pointer[2] อย่างช้าๆ จะทำให้เกิดความผิดพลาดน้อย
2. ring, vessel มีคุณสมบัติทนไฟ สามารถผ่านเปลวไฟได้ ในกรณีที่เป็น
3. ขณะแขวน ring ลงบน balance beam[9] อาจต้องใช้มือช่วยเล็กน้อย

ภาคผนวก ง

การหาระดับความเค็จางที่เหมาะสมสำหรับการวัดค่าแรงตึงผิว

การวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเค็จางด้วยน้ำกลั่น ที่ระดับความเค็จางต่างๆ



- | | |
|---------------------------|----------------------------|
| ● ระดับความเค็จาง 10 เท่า | ■ ระดับความเค็จาง 25 เท่า |
| ▲ ระดับความเค็จาง 50 เท่า | ◆ ระดับความเค็จาง 100 เท่า |

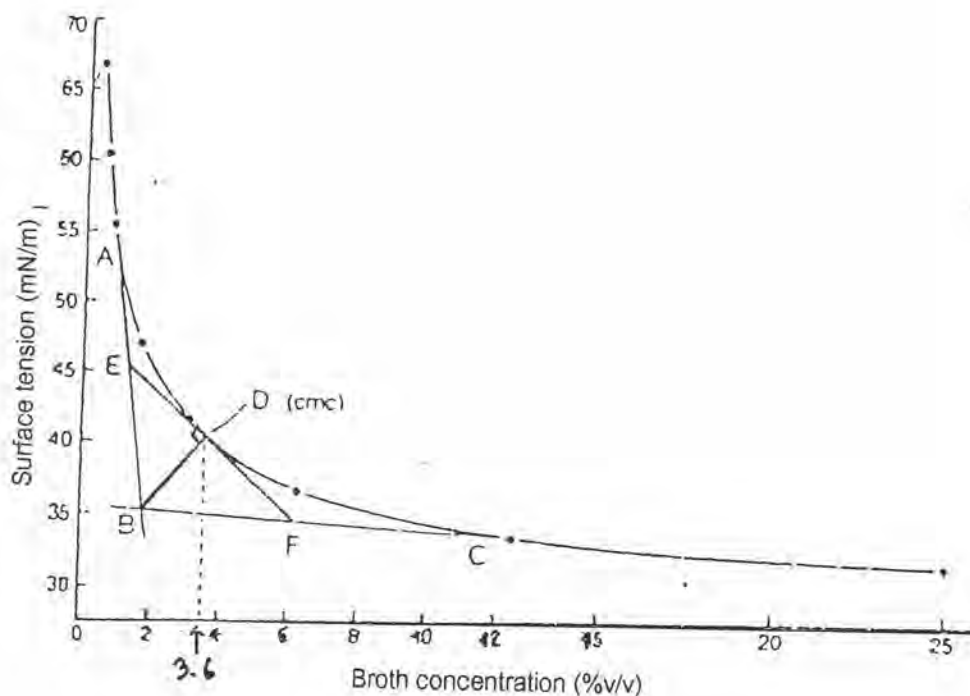
รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับระดับความเค็จางของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหาร กำหนดสูตร ตามภาคผนวก ก หมายเลข 1.6

ภาคผนวก จ

การหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration : CMC)

1.ตามวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987)

เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการหาค่า CMC ของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ(cell free culture) โดยนำส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร วัดค่าแรงตึงผิวแต่ละความเข้มข้น นำค่าแรงตึงผิวที่ได้มาวาดกราฟ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การหาค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ โดยวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987)

จากกราฟเป็นตัวอย่าง การหาค่าจุด CMC ซึ่งเป็นจุดเปลี่ยนโค้ง โดยลากเส้นตรง A ให้ผ่านจุดบนเส้นกราฟมากที่สุด จนมาตัดกับเส้นตรง C ที่จุด B จากนั้นลากเส้นตรง EF ให้ผ่านส่วนโค้งของเส้นกราฟ และตัดกับเส้นตรง A ที่จุด E และเส้นตรง C ที่จุด F ลากเส้นตรง BD ให้ตั้งฉาก 90° กับเส้นตรง EF ตรงจุด D ซึ่งเป็นจุดที่บอกค่า CMC ของสาร โดยลากเส้นประจากจุด D มาตัดแกน X ซึ่งแสดงค่า ความเข้มข้นของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (%v/v) ได้ค่าเท่ากับ 3.6 %v/v

$$\text{ซึ่งค่า CMC} = 3.6 \text{ \%v/v}$$

$$\text{และค่า } \text{CMC}^{-1} = 1/\text{CMC} = 100/3.6 = 28$$

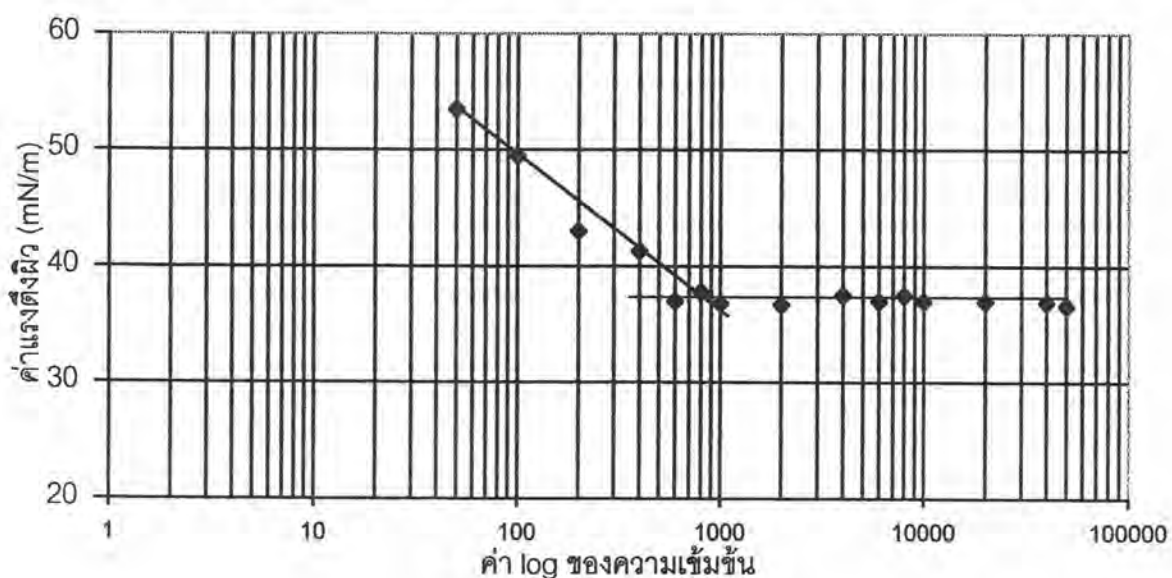
สำหรับ $\gamma(\text{CMC}) = \text{ค่าแรงตึงผิวที่คงที่ หรือค่าแรงตึงผิวที่ต่ำที่สุด}$

หาค่าโดยลากเส้นตรง C ไปตัดแกน Y

จากกราฟตัวอย่างมีค่าแรงตึงผิวประมาณ 36 mN/m

2.ตามวิธีของ Duvnjak , Cooper, and Kosaric (1982)

เป็นวิธีหาค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวที่มีปริมาณน้อย เช่นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยเตรียมสารลดแรงตึงผิว ที่มีความเข้มข้นต่างๆกันมีหน่วยเป็น mg/l จากนั้นนำไปวัดค่าแรงตึงผิว นำค่าที่ได้ไปวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่า log ของความเข้มข้นของสารละลายลดแรงตึงผิว ตัวอย่างกราฟแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การหาค่าจุดวิกฤตของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวตามวิธีของ

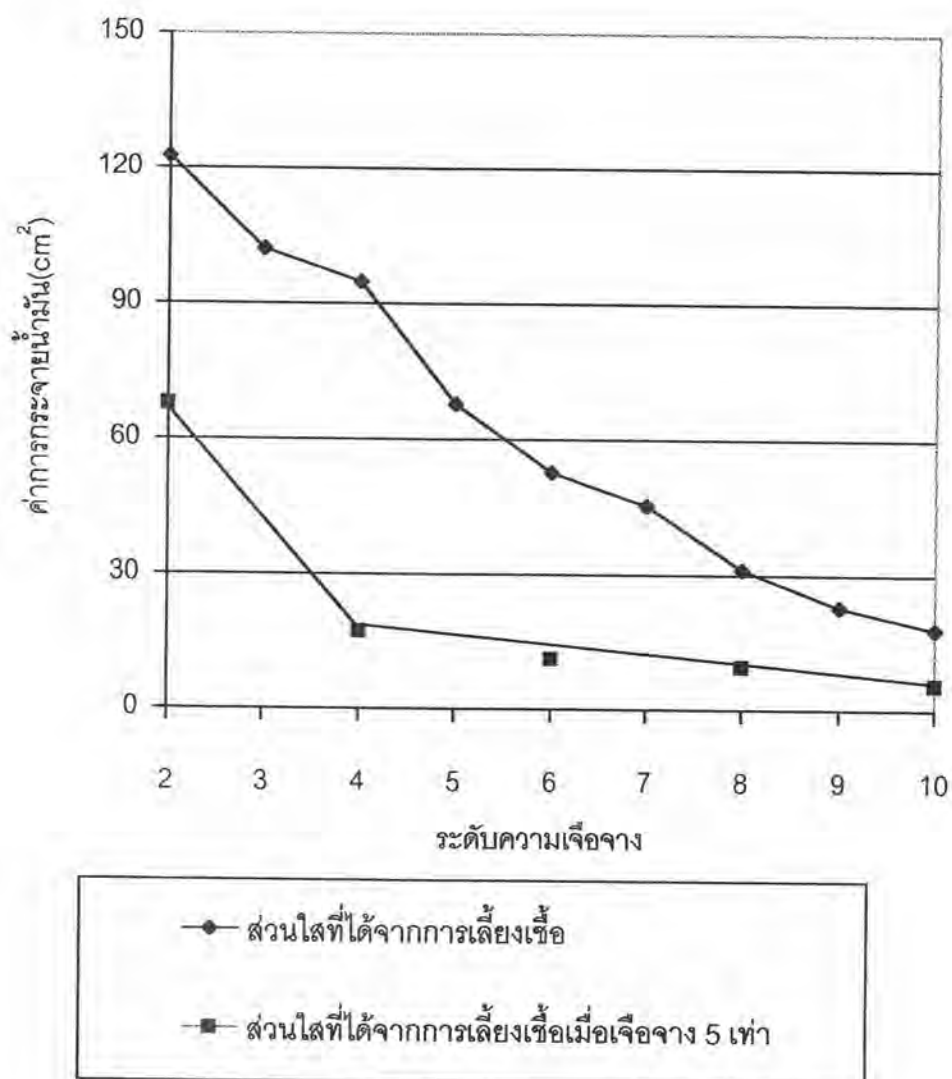
Duvnjak , Cooper, and Kosaric (1982)

จากกราฟตัวอย่างการหาค่า CMC จุด CMC คือ จุดความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด ที่ทำให้ค่าแรงตึงผิวมีค่าต่ำสุดและเริ่มคงที่

จากกราฟค่า CMC = 810 mg/l

ภาคผนวก จ

ในการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมัน ถ้าสารมีความเข้มข้นมาก จึงเจือจางสารแล้วทำการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมัน โดยความสัมพันธ์ระหว่างค่าการกระจายตัวของน้ำมันและระดับความเจือจางแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการกระจายตัวของน้ำมันกับระดับความเจือจาง

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอารีย์ กังฉิน เกิดเมื่อวันที่ 19 กันยายน พ.ศ.2517 ที่บ้านเลขที่ 115 หมู่ 2 ตำบลหนองแม่ไก่ อำเภอโพธิ์ทอง จังหวัดอ่างทอง สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้นำงานวิจัยเรื่องนี้ ไปแสดงผลงานในการประชุมวิชาการ

- The 10th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and The 1998 Annual Meeting of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology on Biotechnology for a Self – Sufficient Economy, 25-27 November 1998 ที่โรงแรมโรลทวิน กรุงเทพมหานคร