



**CRUDE OIL BIODEGRADATION BY PSEUDOMONAS J-45
THROUGH BIOSURFACTANT FORMATION**

SIRAWARIS SRIANANT

อธิปัทนการ
หรือ
ศิริวาริสศรีานนท์ อ.สิริวาริต

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL SANITATION)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

TH
S 619 c
2000
c.2

**2000
ISBN-974-664-057-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

3836013 PHES/M : MAJOR : ENVIRONMENTAL SANITATION ;
M.Sc. (ENVIRONMENTAL SANITATION)

KEY WORDS : BIODEGRADATION / PSEUDOMONAS / BIOSURFACTANT

SIRAWARIS SRIANANT: CRUDE OIL BIODEGRADATION BY
PSEUDOMONAS J-45 THROUGH BIOSURFACTANT FORMATION. THESIS
ADVISORS : UDOM KOMPAYAK, M.P.H., SHALASAI HUANGPRASERT, M.P.H.,
PISIT VATANASOMBOON, M.Sc., JIRAPORN SUKUMAVASRI, Ph.D. 157 P. ISBN
974-664-057-7

The objective of this research was to investigate a suitable condition for the biodegradation of crude oil by biosurfactant of *Pseudomonas* J-45 and to study properties of the produced biosurfactant by isolation, purification and identification of biosurfactant.

Pseudomonas J-45 is a bacterium isolated from oil contaminated sites in Thailand. It shows the ability to grow and degrade crude oil under various conditions, i.e., at temperature 25 to 37°C, aeration rates 0.25 to 1.0 v.v.m. and when using of seawater as mineral source. The fermentation of 8 liters of bacterium broth containing 1 % crude oil in 10 liter fermenter showed that the optimum conditions to obtain the highest value of the surface tension reduction were 100 r.p.m. agitation and 1 v.v.m. aeration rate at 30°C. After cultivation, bacterial cells were separated by refrigerated centrifugation at 8,000 r.p.m. at 4°C for 20 min. Cells were dried by lyophilization. The biosurfactant (BS) content both in dry cells and in culture broth was detected. The BS content was found in both phases. It showed that the amount of BS in the broth is 10 times that of the dry cells. Therefore, the BS production for further study was aimed at the BS in culture broth only. The identification for the type of BS in cell and culture broth was attempted. The lipids in cell and broth were separated into 3 groups, neutrallipid, glycolipid and phospholipid by using the chromatographic technique. The BS activity in lipid was investigated using Emulsification Capacity (EC) test. The results revealed that only glycolipid had EC activity while the other two groups of lipid did not. After that, the types of saccharides bound with lipids were investigated using thin layer chromatography. It showed that the saccharide found in BS is rhamnose. The comparison with the standard saccharides on chromatographic pattern showed that this biosurfactant of *Pseudomonas* J-45 is rhamnolipid type. The biosurfactant was stable over a wide range of pH from 6.0 to 12.0 with optimum activity at pH 8.0 with NaCl concentrations not higher than 5 % and temperature at 55 to 80°C for 3 hours. The critical micelle concentration (CMC) and surface tension value at this point of partially purified biosurfactant were 148 mg/l and 34.5 mN/m, respectively. Preliminary analytical results indicated that biosurfactant was as effective as other commercial synthetic surfactants.

3836013 PHES/M : สาขาวิชา : สาขาวิชาสิ่งแวดล้อม : วท.ม. (สาขาวิชาสิ่งแวดล้อม)

ศิริวิรัช ศรีอนันต์ : การย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันดิบโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* J-45 ด้วยการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (CRUDE OIL BIODEGRADATION BY PSEUDOMONAS J-45 THROUGH BIOSURFACTANT FORMATION). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อุดมคมพยัคฆ์, M.P.H., ชลาชัย ห่วงประเสริฐ, M.P.H., พิธิษฐ์ วัฒนสมบุรณ์, M.Sc., จิราภรณ์ สุขุมาวาสี, Ph.D. 157 หน้า. ISBN 974-664-057-7

จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* J-45 รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยการแยก การทำให้บริสุทธิ์

Pseudomonas J-45 เป็นแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในประเทศไทย พบว่าแบคทีเรียนี้สามารถเจริญและย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีในสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่นที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25-37 องศาเซลเซียส อัตราเติมอากาศ 0.25-1.0 v.v.m. และ โดยใช้น้ำทะเลเป็นแหล่งแร่ธาตุ จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันดิบ (1% ในอาหารเหลว 8 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร) ได้ดีที่สุด คือการกวนที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และการเติมอากาศ 1.0 v.v.m. และที่สภาวะนี้แรงตึงผิวของอาหารเหลวจะมีค่าต่ำสุด หลังจากการเพาะเลี้ยง เซลล์แบคทีเรียจะถูกแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที และทำให้เซลล์แห้งโดย Lyophilization ต่อจากนั้นจึง นำทั้งเซลล์ และน้ำใสไปแยกหาปริมาณสารลดแรงตึงผิว พบว่ามีอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำใสมากกว่าในส่วนที่เป็นเซลล์ประมาณ 10 เท่า ผลจากการศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิวโดยใช้โครมาโตกราฟฟีเทคนิคและการสร้างอิมัลชัน เพื่อพิสูจน์ว่าสารนี้อยู่ในกลุ่มของ นิวตรอนลิปิด กลัยโคลิปิด หรือ ฟอสโฟลิปิด พบว่าสารลดแรงตึงผิวนี้อยู่ในกลุ่มของกลัยโคลิปิด และจากการเปรียบเทียบกับน้ำคาลมาตรฐานพบว่า มี น้ำคาลแรมโนส เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้เป็น แรมโนลิปิด และสารลดแรงตึงผิวสามารถคงตัวได้ดีในช่วง pH กว้างตั้งแต่ pH 6.0 ถึง 12.0 โดยมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ pH 8.0 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิตั้งแต่ 55-80°ซ ได้ 3 ชั่วโมง และมีค่า ซีเอ็มซี 148 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าแรงตึงผิว 34.5 มิลลินิวตันต่อเมตร ณ.จุดนี้ จากผลการทดลองที่ได้รับทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ในห้องทดลองและสามารถใช้ทดแทนได้ดีกว่าเนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ