

การคัดกรองและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพและ  
ลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นางสาวหทัยรัตน์ ต.วัฒนผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**SCREENING AND IDENTIFICATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA  
AND CHARACTERIZATION OF THE BIOSURFACTANT**

**Miss Hathairath T. Wattanaphon**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology**

**Faculty of Science**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2006**

**Copyright of Chulalongkorn University**

**492135**



หทัยรัตน์ ต.วัฒนผล: การคัดกรองและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ. (SCREENING AND IDENTIFICATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA AND THE CHARACTERIZATION OF THE BIOSURFACTANT) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. อลิสา วังโน, 198 หน้า.

การคัดกรองแบคทีเรียในดินจากพื้นที่ปนเปื้อนของประเทศไทยที่เก็บจากแหล่งต่างๆ 19 ตัวอย่างได้ 130 แบคทีเรียพบว่าแบคทีเรีย A102, A103 และ B202 โดยแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่อง จ.บุรีรัมย์ P2 และ P3 แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเชื้อเพลิง จ.กรุงเทพ สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยแบคทีเรีย P2 และ P3 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด เมื่อจำแนกเชื้อพบว่าอยู่ในสกุล *Enterobacter* และ *Burkholderia cepacia* ดังนั้น นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และสกัดสารลดแรงตึงผิวที่ได้ให้บริสุทธิ์บางส่วน เพื่อตรวจสอบชนิดสารลดแรงตึงผิว ด้วย FTIR และ NMR พบมีหมู่ฟังก์ชัน -OH, ester และสายคาร์บอนไฮโดรเจนสายยาวเป็นส่วนประกอบเหมือนกัน ผลการวิเคราะห์โดย MS และ ตรวจสอบส่วนประกอบของน้ำตาลด้วย TLC พบว่า สารนี้มีค่ามวลต่อประจุใกล้เคียงกับ 550 m/z เท่ากัน ซึ่งอยู่ระหว่างค่ามวลโมเลกุลของไกลโคลิปิดที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และมีค่า  $R_f$  เท่ากับ  $0.23 \pm 0.036$  และ  $0.23 \pm 0.045$  ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *Enterobacter* sp. และ *Burkholderia cepacia* พบว่า ค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (CMC) เท่ากับ 3.3 และ 1,995 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ค่าแรงตึงผิวต่ำสุด  $26 \pm 0.52$  และ  $25.0 \pm 0.52$  mN.m<sup>-1</sup> ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า สามารถก่อกอิมัลชันกับน้ำมันดีเซลโดยมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยค่าเท่ากับ  $88.88 \pm 0.77\%$  และ  $88.71 \pm 0.58\%$  ตามลำดับ เป็นเวลา 5 เดือน มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ผลของ pH ต่อการก่อกอิมัลชัน พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิด เสถียรที่ pH 7 จากการศึกษาระยะคาร์บอนหรือและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สำหรับเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือที่กลูโคสความเข้มข้นที่ 44.4 มิลลิโมลาร์และไซเตียมไนเตรตความเข้มข้นที่ 75.0 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้เมื่อเติมน้ำมันเพื่อตรวจสอบการผลิต พบว่า 2% v/v<sup>1</sup> น้ำมันมะกอกและน้ำมันดอกทานตะวัน ช่วยปรับปรุงการผลิตสำหรับเชื้อ *Burkholderia cepacia* แต่ น้ำมันทุกชนิดที่นำมาตรวจสอบ พบว่าไม่มีผลต่อเชื้อ *Enterobacter* sp. ทั้งนี้ เมื่อตรวจสอบผลของอุณหภูมิ, ความเข้มข้นเกลือต่อการผลิต พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่ยังคงผลิตสารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในสารละลายไซเตียมคลอไรด์เข้มข้น 171 มิลลิโมลาร์และ pH 9.5

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....*หทัยรัตน์ ต.วัฒนผล*  
 ปีการศึกษา 2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*On*

## 4772550423 : PROGRAM IN BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: GLYCOLIPID/ BIOSURFACTANT/ EMULSIFICATION/ SURFACE TENSION/ CONTAMINATED SOIL

HATHAIRATH T.WATTANAPHON: SCREENING AND IDENTIFICATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING BACTERIA AND THE CHARACTERIZATION OF THE BIOSURFACTANT. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. ALISA VANGNAI, Ph.D., 198pp.

Screening and isolation of 19 samples collected from Thailand contaminated soil yield 130 bacteria isolates. Among them isolates A102, A103 and B202 isolated from engine oil contaminated soil at Buriram province and P2 and P3 isolated from fuel oil in Bangkok province which were subsequently classified in the genus *Enterobacter* and *Burkholderia* are the best biosurfactant producer. Thus, two isolates grew in mineral salt medium containing glucose as a carbon source since partially purified biosurfactants were extracted from these isolates. The chemical structures elucidated by FTIR and NMR analysis of partially purified products upon cultivation in broth were composed of O-H stretch, ester bond and hydrocarbon chain. Results from MS indicated that the compound possesses mass estimated to be 550 m/z for both isolates. Analysis of the glycone fraction by TLC revealed one major component with  $R_f$  value  $0.23 \pm 0.036$  and  $0.23 \pm 0.045$ , respectively. These were found near that of glucose standard. The biosurfactant of *Enterobacter* sp. and *Burkholderia cepacia* could lower surface tension down to  $26.0 \pm 0.52$  and  $25.0 \pm 0.52$  mN.m<sup>-1</sup> with CMC values of 3.3 and 1,995 mg.l<sup>-1</sup>. They showed a maximum emulsion index ( $E_{24}$ ) of  $88.88 \pm 0.77\%$  and  $88.71 \pm 0.58\%$ , respectively for diesel oil with emulsion stability for 5 months at 37°C. The products were stable at 75°C for 5 hours. Moreover, the best biosurfactant stability of *Enterobacter* sp. and *Burkholderia cepacia* occurred at pH 7. Optimum condition for cultivation of *Enterobacter* sp. and *Burkholderia cepacia* to give high yield of biosurfactant was obtained by the use of 44.4 mM glucose as carbon source and 75.0 mM NaNO<sub>3</sub> as nitrogen source. Additionally, 2% v.v<sup>-1</sup> olive oil and sunflower oil increased the production of biosurfactant for *Burkholderia cepacia* but not for *Enterobacter* sp. Furthermore, the effects of temperature and concentration of salt were studied in these isolates. The results showed that optimum production of biosurfactant occurred at 37°C and salt was inhibitory to biosurfactant production.

Field of Study: Biotechnology.....Student's signature.....*Hathairath T. Wattanaphon*.....  
Academic Year: 2006.....Advisor's Signature.....*Alisa Vangnai*.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to Assist Prof. Dr. Alisa Vangnai my advisor for her valuable advice, useful comment, great encouragement and helpfulness throughout this research work. I do wish to express my grateful thanks to Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for constructive suggestion throughout this work. Sincere thanks and appreciation are also addressed to Assoc. Prof. Dr. Aran Incharoensakdi, Chairman of the committee and all committees for their encouragements and constructive suggestion throughout this work.

I also extend my sincere gratitude to Graduate School, Chulalongkorn University for providing me the graduate scholarship during my graduate study.

This research cannot be finished without the support from Department of Biotechnology and Program of Biotechnology, faculty of Science, Chulalongkorn University. I would like to specially thank the laboratory staffs, offices and my friends of Biotechnology Department, Biochemistry Department and Chemistry Department. I would like to express thanks to Worrawat Promden who was the most helpful in providing useful information.

Finally, I would like to express a sincere thanks to Mr. Amphon, Mrs. Tipparath, Miss Boonyarath and Panjachai T.Wattanaphon who are my parents and my family for their love and encouragement.

## CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (IN THAI).....	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xv
LIST OF FIGURES.....	xvi

### CHAPTER I

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Statement of problem .....	1
1.2 Objectives .....	3
1.3 Hypothesis.....	4
1.4 Scope of the Study.....	4
1.5 Expected results.....	6
1.6 Thesis organization.....	6

### CHAPTER II

#### THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE

<b>REVIEWS.....</b>	<b>7</b>
2.1 Surfactant (surface-active agent).....	7
2.2 Synthetic surfactant.....	8
2.2.1 Chemical surfactant.....	9
2.2.2 Natural surfactant.....	9





2.7.5.1 Effect of glycolipids on contaminant	
biodegradation.....	34
2.7.5.1.1 Petroleum hydrocarbons.....	34
2.7.5.1.2 Polycyclic aromatic hydrocarbons....	35
2.7.5.1.3 Chlorinated hydrocarbons.....	35
2.7.5.2 Biosurfactant production in halophilic	
environments.....	36
<b>CHAPTER III</b>	
<b>METHODOLOGY.....</b>	<b>38</b>
3.1 Laboratory equipments, chemicals	
3.1.1 Laboratory equipments (screening and identification)....	38
3.1.2 Laboratory equipments (characterization).....	39
3.1.3 Laboratory chemical.....	40
3.2 Culture medium and solution for determine of biosurfactant	
concentration	
3.2.1 Mineral salt medium.....	43
3.2.2 Luria Bertani medium.....	44
3.2.3 Modified Hektoen Enteric agar.....	44
3.2.4 Orcinol solution.....	44
3.3 Screening, isolation and identification of biosurfactant-producing	
bacteria	
3.3.1 Screening and isolation of biosurfactant-producing	
bacteria.....	45







	<b>Page</b>
4.3.3 Fourier-transformed infrared spectroscopy.....	93
4.3.4 Mass spectrometry.....	95
4.4 Effect of carbon or/and nitrogen source on biosurfactant production.....	97
4.5 Determination of the effect of temperature, NaCl and pH on the production of the biosurfactant.....	113
 <b>CHAPTER V</b>	
<b>DISCUSSIONS.....</b>	<b>119</b>
5.1 Screening, isolation, and identification of biosurfactant-producing bacteria.....	119
5.2 Physiochemical properties and activity of biosurfactant.....	127
5.2.1 Critical micelle concentration.....	127
5.2.2 Activity of biosurfactant at various temperatures of 30–75°C and pH.....	130
5.3 Identification of the biosurfactant type.....	131
5.4 Role of additional carbon or/and nitrogen source for biosurfactant production.....	132
5.5 Determination of the effect of NaCl, temperature and pH on the activity of the biosurfactant.....	136
 <b>CHAPTER VI</b>	
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>139</b>
Conclusions.....	139

**CHAPTER VII**

<b>SUGGESTION AND FUTURE WORKS.....</b>	<b>142</b>
Suggestions and Future works.....	142
<b>REFERENCES.....</b>	<b>144</b>
<b>APPENDICES.....</b>	<b>166</b>
Appendix A Raw data screening.....	166
Appendix B Sequence results.....	167
Appendix C D-glucose standard curve.....	171
Appendix D Identification of the biosurfactant type.....	172
Appendix E Protein calibration curve.....	174
Appendix F Raw data of physicochemical properties and activity of biosurfactant.....	175
Appendix G Raw data of biosurfactant-producing bacteria by two newly bacteria isolates.....	181
<b>BIOGRAPHY.....</b>	<b>198</b>

## LIST OF TABLES

<b>Table</b>	<b>Page</b>
2.1 Type and microbial origin of biosurfactants.....	14
2.2 Compared properties between biosurfactants and synthetic surfactants.....	21
2.3 Types of biosurfactants produced by microorganisms.....	25
2.4 Biosurfactants used and affected.....	31
4.1 Screening of biosurfactant-producing bacteria from various sources using the drop-collapse method and emulsification index ( $E_{24}$ ).....	62
4.2 Configuration of biosurfactant production from five isolates by different methods.....	69
4.3 Characteristic of cells of the bacterial isolates on Luria Bertani agar.....	70
4.4 Biochemical tests for biosurfactant-producing bacteria.....	74
4.5 Identification of biosurfactant-producing bacteria using 16S rDNA gene sequence comparison.....	76
4.6 Effect of change in temperature on activity of biosurfactant.....	81
4.7 Retardation factor ( $R_f$ ) of sugar composition in biosurfactant detected by thin- layer chromatography.....	90
4.8 $^1\text{H-NMR}$ chemical shift data for glycolipid components.....	91
5.1 Microbial sources and properties of major classes of biosurfactants.....	121
5.2 Major types of biosurfactants produced by microorganism.....	124
5.3 Examples of critical micelle concentration of biosurfactants compared to chemical surfactants.....	128

## LIST OF FIGURE

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
2.1 Structure of surfactant which composes of head (hydrophilic) and tail (lipophilic) part.....	7
2.2 Classification of surfactants (surface-active agent).....	8
2.3 Surface tension, interfacial tension and solubilization as a function of surfactant concentration (CMC represents critical micelle concentration).....	12
2.4 A glycolipid produced by a <i>Pseudomonas</i> strain.....	16
2.5 Structures of several glycolipid biosurfactants (A) Rhamnolipid produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; (B) Trehalose lipid produced by <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> ; (C) Sophorolipid (in lactone form) produced by the yeast <i>Torulopsis bombicola</i> .....	16
2.6 The structure of emulsan-like polymer.....	17
2.7 Primary structure of surfactin.....	18
2.8 Cyclic Lipopeptide produced by a <i>Bacillus subtilis</i> .....	18
2.9 Chemical structure of lecithin.....	18
2.10 Chemical structures of ustilagic acids that produced from <i>Ustilago maydis</i> .....	19
3.1 The experimental flow chart of partially purification of biosurfactant.....	52
4.1 Growth of five bacteria isolates in mineral salt medium in the presence of 2%wv <sup>-1</sup> glucose as carbon source.....	65
4.2 Characteristic of diesel oil after dropping culture broths from certain bacterial isolates.....	67
4.3 Emulsification activities after mixing of culture broths positively with diesel oil in water also standing for 24 hours.....	69
4.4 Gram's staining and morphology of isolate A102.....	71



<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.5 Gram's staining and morphology of isolate A103.....	71
4.6 Gram's staining and morphology of isolate B202.....	72
4.7 Gram's staining and morphology of isolate P2.....	72
4.8 Gram's staining and morphology of isolate P3.....	73
4.9 Partially purified of biosurfactant produced from five isolates.....	77
4.10 The surface tension reductions ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) of partial purified biosurfactant from five isolates after cultivated in medium.....	78
4.11 Critical micelle concentrations of glycolipid produced by <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3.....	80
4.12 Stability of the emulsification index at 30°C of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3.....	82
4.13 Stability of the emulsification index at 37°C of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3.....	83
4.14 Stability of the emulsification index at 45°C of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3.....	84
4.15 Effect of pH on activity of biosurfactant in <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3.....	85
4.16 Stability of the emulsification index at various pH.....	86
4.17 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium (MSM) containing 2% $\text{wv}^{-1}$ glucose as carbon sources: the control as MSM, Luria Bertani broth and nutrient broth.....	88
4.18 Glycolipid production of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 when cultivated in mineral salt medium (MSM) supplemented with 2% $\text{wv}^{-1}$ glucose, Luria Bertani broth and nutrient broth.....	88

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.19 Thin layer chromatography analysis of the partially purified biosurfactant.....	90
4.20 <sup>1</sup> H-NMR peak of <i>Enterobacter</i> sp. P2 in CDCl <sub>3</sub> .....	92
4.21 <sup>1</sup> H-NMR peak of <i>Burkholderia cepacia</i> P3 in CDCl <sub>3</sub> .....	92
4.22 Fourier-transform infrared absorption spectra of glycolipid biosurfactant obtained from <i>Enterobacter</i> sp. P2.....	94
4.23 Fourier-transform infrared absorption spectra of glycolipid biosurfactant obtained from <i>Burkholderia cepacia</i> P3.....	94
4.24 Mass spectrometry spectrograms of partially purified biosurfactant from <i>Enterobacter</i> sp. P2 cultured broth.....	96
4.25 Mass spectrometry spectrograms of partially purified biosurfactant from <i>Burkholderia cepacia</i> P3 cultured broth.....	96
4.26 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium with 2% wv <sup>-1</sup> carbon source: glucose, maltose and sucrose.....	99
4.27 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium with 8% wv <sup>-1</sup> carbon source: supplemented with glucose, maltose, sucrose and control.....	100
4.28 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium with 15% wv <sup>-1</sup> carbon source: supplemented with glucose, maltose, sucrose and control.....	101

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.29 Effect of the types and the concentrations of carbon sources on glycolipid production ( $\text{g.l}^{-1}$ ) of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 in MSM containing different carbon sources; (A) 2% $\text{wv}^{-1}$ carbon sources; (B) 8% $\text{wv}^{-1}$ carbon sources and (C) 15% $\text{wv}^{-1}$ carbon sources.....	102
4.30 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium with 2% $\text{wv}^{-1}$ glucose as carbon source supplemented with additional $\text{NaNO}_3$ as nitrogen source: 15 mM $\text{NaNO}_3$ , 75 mM $\text{NaNO}_3$ , 150 mM $\text{NaNO}_3$ , 150 mM $\text{NaNO}_3$ and without adding the $\text{NaNO}_3$ as control.....	104
4.31 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium with 2% $\text{wv}^{-1}$ glucose as carbon source supplemented with additional $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source: 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 150 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 150 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and without adding the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as control.....	105
4.32 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium with 2% $\text{wv}^{-1}$ glucose as carbon source supplemented with $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ as nitrogen source: 15 mM $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ , 75 mM $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ , 150 mM $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ , 150 mM $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ and without adding the $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ as control.....	106
4.33 Effect of the type and the concentration of nitrogen source on glycolipid production ( $\text{g.l}^{-1}$ ) of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 in mineral salt medium containing glucose; (A) $\text{NaNO}_3$ ; (B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and (C) $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ .....	107

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
4.34 Biosurfactant production of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 in the combination of carbon or nitrogen source.....	109
4.35 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in medium with 2% wv <sup>-1</sup> glucose as carbon source supplemented with 2% vv <sup>-1</sup> various type of oil as an additional carbon source: the control as mineral salt medium, diesel oil, sunflower oil, olive oil and soybean oil.....	111
4.36 Effect of the type of supplement carbon sources on glycolipid produced (g.l <sup>-1</sup> ) of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 in medium supplemented with 2% wv <sup>-1</sup> glucose with containing 2% vv <sup>-1</sup> various types oil and control representing no additional oil.....	112
4.37 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium supplemented with 2% wv <sup>-1</sup> glucose as carbon source at 30°C, 37°C and 45°C cannot detected.....	114
4.38 Glycolipid productions obtained from growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 on 2% wv <sup>-1</sup> glucose as carbon source for 72 hours at 30°C and 37°C, respectively.....	115
4.39 Growth of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3 grown in mineral salt medium containing 11.1 mM glucose as carbon source which varied concentrations of salts: without NaCl as the control, 17.1 mM NaCl, 85.5 mM NaCl, 171.0 mM NaCl and 342.0 mM NaCl.....	117
4.40 Effect of NaCl on production of <i>Enterobacter</i> sp. P2 and <i>B. cepacia</i> P3.....	118