สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน
ISOLATION AND SCREENING OF OIL-DEGRADATION MICROORGANISMS

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ :
เรื่อง การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม
RESEARCH AND DEVELOPMENT OF EFFECTIVE MICROORGANISMS FOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551
จำนวน 204,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวพีรกานต์ บรรเจิดกิจ
ผู้ร่วมโครงการ นางสาวสมคิด ดีจริง
นายรัฐพร จันทร์เดช

การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน
ISOLATION AND SCREENING OF OIL-DEGRADATION MICROORGANISMS

พีรกานต์ บรรเจิดกิจ สมคิด ดีจริง รัฐพร จันทร์เดช
PEERAKARN BANJERDKIJ[1], SOMKID DEEJING[1], RUTTAPORN CHUNDET[1]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

วิธีการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม คือ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพ ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณน้ำพุร้อนจำนวน 30 ไอโซเลต เป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 22 ไอโซเลต และจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน 8 ไอโซเลต และพบจำนวนจุลินทรีย์จากป่าบ้านโป่ง จำนวน 39 ไอโซเลต (SA1-SA39) จากห้วยโจ้ จำนวน 40 ไอโซเลต (PW1-PW40) และจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วจำนวน 45 ไอโซเลต (KS1 – KS45) นำมาทดสอบการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยวิธีทางกายภาพ สังเกตระดับการย่อยน้ำมันด้วยตา พบว่าสามารถย่อยน้ำมันระดับ++ 34 ไอโซเลต จากนั้นทดสอบการย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยวิธี Partition gravimetric 19 ไอโซเลต สามารถย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วได้มากกว่า 70 % และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยการไตเตรทได้ค่ากิจกรรม ได้ค่า 4.17-6.67 U/ml และด้วยวิธี Colorimetric ได้ค่า 0.48-1.01 U/ml. จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16s rDNA sequencing พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus thuringiensis* , *Lysinibacillus boronitolerans* และ *Acinetobacter* sp.ซึ่งผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต มีค่าดังนี้ ความเป็นกรด-ด่าง 8.5 - 9.5 อุณหภูมิ 37 - 40°C ความเร็วรอบของการให้อากาศ 150 - 200 rpm, และ% NaCl 0.5 ถึง 2.0% ตามลำดับ

คำสำคัญ : ดินปนเปื้อนน้ำมัน, การย่อยสลายทางชีวภาพ, น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

ISOLATION AND SCREENING OF OIL-DEGRADATION MICROORGANISMS

PEERAKARN BANJERDKIJ[1], SOMKID DEEJING[1], RUTTAPORN CHUNDET[1]

[1]Biological Department Faculty of Science Maejo University

Abstract

Methods were used to removal of contaminated oil such as physical, chemical and biological methods. Biodegradation has been admired to clean-up oil polluted environment. The aim of this study was isolated and selected the dominated bacteria from natural resources and soil-oil contaminated that can be degrading used lubricating oil. The 30 isolate from hot-spring water, 39 isolate from natural soil, 40 isolate from natural water and 45 isolate found from contaminated soil and showed the best 34 dominated isolates were degradation bacteria. The 19 dominated isolates were possibility oil degradation more than 70% by using partition gravimetric method. Afterwards,The lipase activity showed that 4.17 to 6.67 U/ml by using titration technique and 0.48 to 1.01 U/ml by using colorimetric method. All dominated isolates were sequencing method for 16s rDNA sequencing, result showed that majority of dominated bacteria were *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus boronitolerans* and Acinetobactor sp.. Optimum growth conditions were pH 8.5 to 9.5, temperature 37 to 40 °C, orbital shaker 150 to 200 rpm and 0.5 to 2.0 % NaCl, respectively.

Key words: natural resources, soil-oil contaminated, biodegradation, lubricating oil used

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2551 จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

นางสาวพีรกานต์ บรรเจิดกิจ
นางสาวสมคิด ดีจริง
นายรัฐพร จันทร์เดช
คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
Abstract	(ข)
กิตติกรรมประกาศ	(ค)
สารบัญ	(ง)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
การตรวจเอกสาร	3
สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย	23
อุปกรณ์การวิจัย	23
วิธีการวิจัย	24
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	30
สรุปผลการวิจัย	56
เอกสารอ้างอิง	59

คำนำ

ในปัจจุบันปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญมากของประเทศ ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์เป็นอย่างมาก โดยพบว่ามีการปนเปื้อนของสารเคมี สารพิษ โลหะหนักชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม หรือกิจกรรมต่าง ๆในชีวิตประจำวัน ทำให้ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการต่าง ๆ ที่เป็นพิษกระจายออกสู่สิ่งแวดล้อม และหนึ่งในนั้นก็คือ "น้ำมัน"

จากการตรวจสอบหาสาเหตุในการปนเปื้อนของน้ำมันในสิ่งแวดล้อม พบว่าน้ำมันสามารถที่จะปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทาง ซึ่งสาเหตุใหญ่ของปัญหามาจากมนุษย์ ตัวอย่างเช่น คราบน้ำมันที่เกิดจากการชะล้างเครื่องยนต์ตามอู่ซ่อมรถ ปั๊มน้ำมัน และอุบัติเหตุในการขนส่งน้ำมันต่าง ๆ ทำให้ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ คราบน้ำมันดังกล่าวยากต่อการกำจัดโดยธรรมชาติ (จีรศักดิ์, 2537)

ปัจจุบัน มีหลายวิธีการที่ใช้ในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม คือ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี วิธีทางชีววิทยา และวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การใช้ทุ่นกักบริเวณ (Boom), การใช้เครื่องมือดักและดูดขึ้นมากำจัด ซึ่งเหมาะสมที่จะนำมาใช้เก็บกวาดน้ำมันออกจากสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำหรือผิวพื้นดินที่มีอาณาบริเวณกว้างใหญ่พอให้เครื่องจักรขนาดใหญ่ทำงานได้อย่างสะดวก แต่ไม่เหมาะสมกับชายฝั่งที่เป็นป่าชายเลน แนวปะการัง หรือชั้นดินที่ลึกกว่า 50 cm

วิธีการทางเคมี ได้แก่ การใช้สารเคมีจำพวก detergent หรือ dispersant ที่ทำให้น้ำมันกระจายตัวออกไปเป็นอนุภาคเล็กๆ จากนั้นจุลินทรีย์ในธรรมชาติจะทำการย่อยสลายต่อไป การใช้สารเคมีเป็นวิธีการที่มีความเสี่ยง เนื่องจากสารเคมีที่ใช้อาจเป็นตัวก่อให้เกิดมลภาวะแก่สิ่งแวดล้อมเอง

วิธีทางชีววิทยา หรือการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมัน ที่เกิดขึ้นกับคราบน้ำมันที่หลงเหลือจากวิธีการทางกายภาพหรือทางเคมี และเป็นวิธีการที่ยอมรับมากที่สุด เพราะเป็นการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันต่างๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติอยู่แล้ว
มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเติมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติ หรือเติมจุลินทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรมที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดี

ในปัจจุบันการกำจัดคราบน้ำมันและไขมันที่ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมในประเทศไทยยังมีข้อจำกัดอยู่อีกมาก ทั้งนี้ เพราะน้ำมันและไขมันเป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ทำให้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติใช้เวลาในการย่อยสลายนาน รวมทั้งคราบน้ำมันและไขมันที่ลอยอยู่ในน้ำ ทำให้ออกซิเจนจากอากาศไม่สามารถละลายลงในน้ำได้ ส่งผลให้การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์พวกที่ใช้อากาศไม่สามารถทำงานได้ การพยายามทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเด่นในการใช้น้ำมันและไขมันเพื่อเป็นแหล่งอาหารจึงเป็นเรื่องสำคัญ

อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยการวิจัยเพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยเน้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเด่นในการย่อยสลายน้ำมัน ทั้งในรูปแบบของการศึกษา ค้นคว้าและเก็บรักษาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ประเภทนี้อย่างเป็นระบบนั้นพบว่ามีน้อย ในโครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาการ

แยกและคัดเลือกจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันจากแหล่งมีการปนเปื้อนน้ำมันและแหล่งทรัพยากรธรรมชาติต่าง ๆ ซึ่งเกี่ยวเนื่องโครงการวิจัยอื่น ๆ ที่อยู่ในแผนงานวิจัยเดียวกัน ที่ได้เสนอการเก็บรักษาสายพันธุ์อย่างมีระบบของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีแยกและคัดเลือกได้เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อมต่อไป และโครงการวิจัยนี้สามารถตอบสนองประเด็นยุทธศาสตร์ของแผนการบริหารราชการแผ่นดิน พ.ศ. 2548-2551 หัวข้อยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เป็นการสนองตอบต่อนโยบายการพัฒนาชาติอย่างยั่งยืน

การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาหาแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและจากแหล่งดินและน้ำธรรมชาติ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว พร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.เพื่อทดสอบจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในระบบจำลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาสภาวะการขยายปริมาณจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ก่อนขยายสู่เชิงการใช้งานจริง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมอย่างมีประสิทธิภาพ
2. ได้รวบรวมจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายน้ำมัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนน้ำมันในรูปแบบที่แตกต่างกัน
3. ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเพื่อการพัฒนาเชิงพาณิชย์ต่อไป
4. ได้สนับสนุนการสร้างระบบการเก็บเชื้อพันธุ์ของจุลินทรีย์เพื่อสิ่งแวดล้อมอย่างเป็นรูปธรรม
5. เป็นการสร้างแนวทางการใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติอย่างรู้คุณค่า เพื่อการแก้ ปัญหาทางสิ่งแวดล้อมภายใต้หลักการพัฒนาอย่างยั่งยืน

การตรวจเอกสาร

จากเกิดปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันในสิ่งแวดล้อมแหล่งต่าง ๆ จึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันมาใช้ในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นโดย เน้นศึกษาในรูปของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในน้ำมันและมีความซับซ้อนของโครงสร้าง สูง มีการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยในหัวข้อที่เกี่ยวข้องในทุก ๆ ด้านโดยเริ่มตั้งแต่การศึกษาถึงองค์ประกอบและโครงสร้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการย่อยสลายจนถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ เพื่อปรับปรุงสภาวะแวดล้อมของจุลินทรีย์ให้สามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้สูงขึ้น รวมทั้งการศึกษาเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) มีชื่อตามระบบว่ากลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัสคือ E.C.3.1.1.3 ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของน้ำมันหรือไขมันได้กรดไขมันและกลีเซอรอล และสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) จากกรดไขมันและกลีเซอรอลซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับ หรือแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่างๆ (transesterification) โดยทั่วไปไลเปสพบในคนและ สัตว์ซึ่งเกี่ยวกับกระบวนการย่อยอาหาร สำหรับปัจจุบันมีการสกัดไลเปสจากจุลินทรีย์และผลิตจำหน่ายและพบลักษณะปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ไลเปสนี้ใน 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ ทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ (non-specific lipase) และทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะที่พันธะเอสเทอร์ตำแหน่ง 1,3(1,3-specific lipase) (ปราณี, 2543)

1. สารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon compound) (เพิ่มศักดิ์, 2550)

สารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลประกอบด้วยธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้นที่เรียกว่า สารประกอบไฮโดรคาร์บอน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่โมเลกุลประกอบด้วยพันธะเดี่ยวระหว่างคาร์บอน-คาร์บอนเพียงอย่างเดียว เรียกว่า ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว ส่วนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่โมเลกุลมีพันธะคู่ หรือพันธะสามระหว่างคาร์บอน-คาร์บอนรวมอยู่ด้วย เรียกว่า ไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว (unsaturated hydrocarbon)

โมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อะตอมของคาร์บอนต่อกันเป็นสายยาวหรือต่อกันเป็นโซ่ตรง (straight chain) หรือต่อกันเป็นสายยาวที่มีกิ่งสาขาแยกออกจากโซ่ตรง(branch chain) โดยไม่มีวงของคาร์บอนในโมเลกุลนั้นเลยเรียกว่า อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) หรือแบบโซ่เปิด โมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อะตอมของคาร์บอนต่อกันเป็นวง และอาจจะมีกิ่งแยกออกจากวงของคาร์บอน เรียกโมเลกุลประเภทนี้ว่าไฮโดรคาร์บอนแบบโซ่ปิด หรือ อะลิไซคลิก

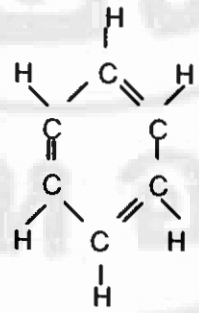
ไฮโดรคาร์บอน (alicyclic hydrocarbon) และโมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีวงแหวนของเบนซีนเป็นโครงสร้างหลักเรียกว่า อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon)

น้ำมันเป็นสารประกอบไฮโครคาร์บอน (hydrocarbon) ที่มีความซับซ้อนและมีองค์ประกอบเป็นสารต่างๆกว่า 100 ชนิด ซึ่งสามารถแยกได้โดย Silica gel chromatography ได้เป็นสารประกอบประเภทอิ่มตัวได้แก่ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นกิ่งก้าน(aliphatic) และ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นวง(aromatic) หรือสารประกอบประเภท asphatic ซึ่งได้มีการศึกษาต่อมาถึงการย่อยสลายของสารประกอบดังกล่าว (Brown *et al.*, 1969)

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสารประกอบอิ่มตัวได้แก่ n-alkanes , branch alkanes และ cycloalkanes (naphthenes) n-alkanes ถูกย่อยสลายได้ง่ายที่สุดจากการทำปฏิกิริยาบริเวณปลายที่เป็น primary alcohol , aldehyde และ monocarboxylic acid ในการย่อยสลายของ carboxylic acid ในกระบวนการ β – oxidation จะได้ผลผลิต 2 ชนิด คือ shoter fatty acid และ acetyl coenzyme A ซึ่ง fatty acid ที่เกิดขึ้นนี้พบว่าเป็นตัวที่ทำให้เกิดเป็นพิษตกค้างหลังจากที่เกิดการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Atras and Bartha, 1973)

2. **เบนซีน (Benzene) และอนุพันธ์ของเบนซีน** (มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550)

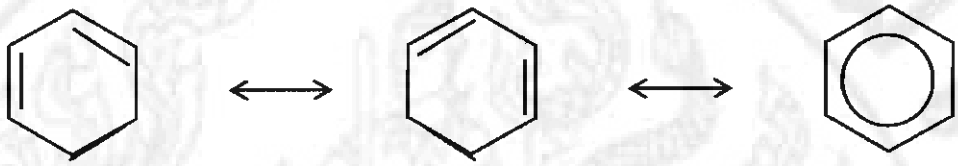
ในปี ค.ศ. 1825 Michael Faraday ได้แยกสารตัวอย่างออกจากก๊าซที่ได้จากการจุดไฟให้แสงสว่าง ต่อมาเรียกว่า เบนซีน เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้จากการกลั่นกรดเบนโซอิกกับแคลเซียมออกไซด์ นับเป็นตัวอย่างของสารอะโรมาติกตัวแรก ต่อมาในปี ค.ศ 1834 ได้ค้นพบสูตรโมเลกุลของ เบนซีนเป็น C_6H_6 จากสูตรนี้แสดงให้เห็นว่า เบนซีนเป็นสารประกอบไม่อิ่มตัว แต่ในขณะนั้นไม่มีผู้ใดเสนอสูตรโครงสร้างที่แท้จริงของเบนซีนว่าเป็นอย่างไร จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1865 Kekule' ได้พยายามค้นคว้าและเสนอสูตรโครงสร้างของเบนซีน โดยตั้งสมมติฐานว่า เบนซีนต้องประกอบด้วยวงรูปหกเหลี่ยมที่แบนราบมีคาร์บอน 6 อะตอมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวและคาร์บอนแต่ละอะตอมต่างก็สร้างพันธะกับไฮโดรเจน 1 อะตอม ดังรูป



ภาพ 1 แสดงการค้นคว้าและเสนอสูตรโครงสร้างของเบนซีน

ที่มา: มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550

จากการศึกษาโครงสร้างของเบนซีนพบว่า ความยาวพันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมทุกพันธะมีความยาวเท่ากันคือ 1.39 แองสตรอม (A°) ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมพันธะคู่ (1.34 A°) และพันธะสาม (1.54 A°) นั่นหมายความว่าพันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลของเบนซีนไม่ได้เป็นพันธะเดี่ยวหรือพันธะคู่อย่างใดอย่างหนึ่ง แต่ประกอบด้วยพันธะคู่ที่มีการเคลื่อนที่ไปรอบวงจริง และจากการวัดมุมระหว่างพันธะของคาร์บอนแต่ละอะตอมเป็น 120 A° นักวิทยาศาสตร์เรียกปรากฏการณ์ทำนองนี้ว่า เรโซแนนซ์ (resonamce) หมายถึงปรากฏการณ์ที่ไม่สามารถแสดงสูตรโครสร้างที่แท้จริงของสารได้ ดังนั้นจึงเขียนสูตรโครงสร้างอย่างย่อของเบนซีนได้ดังนี้



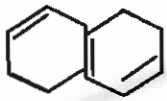
ภาพ 2 แสดงการเขียนสูตรโครงสร้างอย่างย่อของเบนซีน

ที่มา: มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550

อนุพันธ์ของเบนซีน เกิดจากไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุลของเบนซีนถูกแทนที่ด้วยธาตุใดธาตุหนึ่ง หรือหมู่ธาตุใดหมู่ธาตุหนึ่ง สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เป็นอนุพันธ์ของเบนซีนจึงมีอยู่มากมายและการเรียกชื่อ IUPAC ของอนุพันธ์เหล่านี้จะอ่านโดยใช้เบนซีนเป็นชื่อหลัก ดังต่อไปนี้

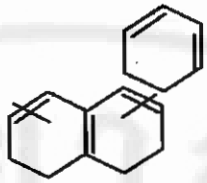
ถ้าเบนซีนมีหมู่แทนที่เพียงหมู่เดียวให้อ่านหมู่แทนที่ แล้วตามด้วยชื่อหลักเบนซีน สารประกอบเหล่านี้โดยมากมีชื่อสามัญ และบางครั้งชื่อสามัญมักนิยมเรียกมากกว่าชื่อ IUPAC เช่น ถ้าหมู่ที่ต่อกับเบนซีนเป็นหมู่ที่ซับซ้อนมาก ๆ อาจจะเรียกชื่อเป็นสารประกอบของแอลเคน หรือแอลคีน หรืออื่น ๆ แล้วเรียกเบนซีนเป็นหมู่แทนที่เป็นหมู่ฟีนิล (phenyl group)

การระบุตำแหน่งทั้งสองที่หมู่เอทิลแทนที่อยู่อาจระบุเป็นตัวเลขก็ได้ หรือที่สะดวกและนิยมมากกว่าคือใช้คำนำหน้าว่า *ortho* – สำหรับตำแหน่ง 1, 2 *meta* – สำหรับตำแหน่ง 1, 3 และ *para* – สำหรับตำแหน่ง 1, 4 โดยมักใช้เป็นตัวย่อ o – *m* – และ *p* – แทน *ortho* – *meta* – และ *para* – ตามลำดับ แต่ถ้ามีหมู่แทนที่มากกว่า 2 หมู่ขึ้นไปจะระบุตำแหน่งที่แทนที่ด้วยตัวเลขอย่างปกติ เช่น ถ้ามีวงอะโรมาติกมาเชื่อมต่อกัน โดยมีด้านใดด้านหนึ่งร่วมกัน เรียกว่าพอลินิวเคลียร์อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polynuclear aromatic hydrocarbon) เช่น



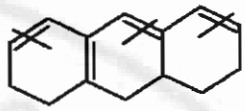
Naphthalene

จุดหลอมเหลว 80°C



phenanthrene

(จุดหลอมเหลว 100°C)



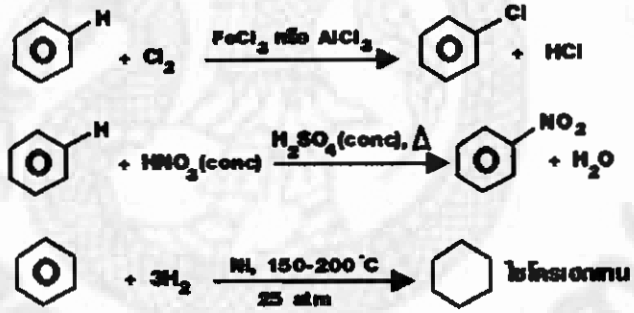
anthracene

(จุดหลอมเหลว 218°C)

ภาพ 3 แสดงการเชื่อมต่อกันของวงอะโรมาติก

ที่มา: มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550

สมบัติของเบนซีน เป็นของเหลวไม่นำไฟฟ้า ติดไฟ ให้เปลวไฟสว่าง มีเขม่ามาก เกิดปฏิกิริยาดายพลังงาน ไม่ละลายน้ำ เป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว ไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะ เกิดปฏิกิริยาแทนที่ ดังนี้



ภาพ 4 แสดงการเกิดปฏิกิริยาแทนที่ของเบนซีน

ที่มา: มหิดลวิทยานุสรณ์, 2550

3. ประโยชน์ของเบนซีนและอนุพันธ์

เบนซีนเป็นตัวทำละลายและเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบต่าง ๆ แต่การสูดดมเบนซีนในปริมาณมาก ๆ ทำให้เกิดอาการคลื่นเหียนและอาจถึงตาย เนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว นอกจากนี้ การที่ต้องสัมผัสกับเบนซีนต่อเนื่องกันนาน ๆ จะทำให้ไขอ่อนในโพรงกระดูกซึ่งทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดถูกทำลาย ดังนั้น ห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับเบนซีนจึงต้องมีระบบถ่ายเทอากาศอย่างดี และถ้าไม่จำเป็นควรใช้โทลูอีนเป็นตัวทำละลายแทน

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนประกอบด้วยสารอินทรีย์กลุ่มใหญ่และหลากหลายชนิด โดยคำจำกัดความแล้วหมายถึง สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น แต่ในความหมายที่ใช้โดยทั่วไปหมายรวมถึงสารอินทรีย์พวก heteroatoms ที่ได้จากปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์ของมันด้วย

จากการที่มีอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับปิโตรเลียม จึงจำเป็นต้องมีการติดตามตรวจสอบการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ ซึ่งโดยทั่วไปทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณของสารไฮโดรคาร์บอนโดยตรง หรือโดยตรวจหาหรือนับจำนวนของ hydrocarbon-degrading bacteria ในดินที่มีการปนปื้อนของปิโตรเลียม เช่น การตรวจพบแบคทีเรียที่ย่อยสลายก๊าซไฮโดรคาร์บอนได้เป็นจำนวนมากในดิน บ่งชี้ว่ามีการซึมขึ้นมาของก๊าซธรรมชาติ

การประเมินหาค่ากิจกรรมการย่อยสลาย (biodegrading activity) ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ทางตรงที่สุด ได้แก่ การวิเคราะห์ "reactant" ซึ่งได้แก่สารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนนั้น หรือวิเคราะห์หาผลผลิตสุดท้ายที่เกิด เช่น CO_2 ส่วนการตรวจสอบทางอ้อมสามารถกระทำได้โดยการตรวจนับจำนวนของจุลินทรีย์ (microbial enumeration) หรือตรวจวัด specific activity ของประชากรจุลินทรีย์ในแหล่งดินนั้น ซึ่งเป็นหลักฐานแสดงถึง biodegradation ที่เกิดขึ้นทางอ้อม

ในการวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน โดยทั่วไปต้องทำการสกัดเอาสารนั้นออกจากโครงสร้างของดิน ก่อนนำมาวิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิคทาง gas chromatography, liquid chromatography หรือ spectrophotometer ส่วนการวิเคราะห์หาผลิตผลสุดท้ายที่เกิดขึ้นเช่น CO_2 มักนิยมตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีที่คาร์บอน ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารไฮโดรคาร์บอนนั้น และตรวจวัดโดยอาศัยเครื่อง liquid scintillation counter

4.น้ำมันเครื่อง (Motor oil)

คือ น้ำมันที่ใช้สำหรับหล่อลื่นในเครื่องยนต์เกือบทุกชนิด เช่น รถยนต์ มอเตอร์ไซค์ รถบรรทุก เพื่อลดการเสียดสีและความเสียดทานระหว่างลูกสูบกับผนังเครื่องยนต์ ผลิตจากน้ำมันดิบ น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วอาจปนเปื้อนด้วยองค์ประกอบทางเคมี เช่น แมกนีเซียม ทองแดง สังกะสี และโลหะหนักชนิดอื่นๆ (โครงการเพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับสารเคมีและสิ่งแวดล้อมสำหรับเยาวชน, 2552)

องค์ประกอบของน้ำมันเครื่อง (PTT, 2008)

ลักษณะทางกายภาพ (Physical State): ของเหลว (Liquid) ลักษณะสีและกลิ่น (Appearance Color and Odor): น้ำตาล (Brown), กลิ่นน้ำมัน (Oily Odor) การละลายได้ในน้ำ (Solubility in Water): ไม่ละลายน้ำ (Insoluble) ค่าความหนืดที่ 100 $^{\circ}$C (Kinematics Viscosity @ 100 $^{\circ}$C, mm^2/s): 14.5 – 16.0 ประกอบด้วย Lubricating Oils (Petroleum), Hydrotreated neutral oil based > 30 % WT และ

Distiilates (Petroleum), Hydrotreat heavy paraffinic > 30 % WT และมี Additive ประมาณ 70% oils (petroleum), C 20-50 hydrotreated neutral oil-base

5. การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

จากการศึกษาของกรรณิกา, (2541) พบว่าในสภาพธรรมชาติเชื้อราที่ย่อยน้ำมันได้ในดินมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน 6-82% ของเชื้อราในดินทั้งหมด และแบคทีเรียที่ย่อยน้ำมันได้ในดินมี 0.13-50% ของแบคทีเรียในดินทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hollaway, *et. al.*,(1980) พบว่ามีแบคทีเรีย 0.003-100% ของแบคทีเรียในทะเลที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ ดังนั้นจะเห็นว่าแบคทีเรียและราแต่ละชนิดในสภาพธรรมชาติที่แตกต่างกันจะมีความ สามารถในการย่อยสลายของน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ นั้นแตกต่างกันไป (รัฐพร, 2541) นอกจากราและแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมัน ยังพบจุลินทรีย์ประเภทอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

ประเภทของจุลินทรีย์	สายพันธุ์	อ้างอิง
แบคทีเรีย (Bacteria)	*Mycobacterium, Pseudomonas, Nocadia, Streptomyces, Desulfovibrio, Corynebacterium* และกลุ่มแบคทีเรียพวก cocci	Buchanan and Gibbons, 1974
	Pseudomonas, Acinetobacter sp.	ประหยัด, 2543
	Bacillus thermoleovorans	Tomohisa,*et al.*,2001
	Pseudomonas putida GPo1 *alk*B, *Acinitobacter* spp. *alk*M, *Rhodococcus* spp. *alkB1*, *Rhodococcus* spp. *alkB2*, *Pseudomonas putida xylE*, *Pseudomonas putida ndoB* ,	Margesin, *et al.* ,2003
รา (Fungi)	*Aspergillus, Penicillim*และ *Verticillium Phanerochaete, Pleurotus* และ *Coriolus*	Davie and Hughes, 1968
อื่น ๆ (Others)	สาหร่าย *Protheaczopfi*	Frederric Chaillan ,*et. al.*,2004

ประเภทของจุลินทรีย์	สายพันธุ์	อ้างอิง
	กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ จีนัส *Gordonia, Brevibacterium, Aeromicrobium, Dietzia, Burkhold* และ *Mycobacterium*	Frederric Chaillan ,*et. al.*,2004
	mycobacterium fortuitum Strain NF4 *mycobacterium ratisbonense* Strain SD4	Mahmoud and Alexander, 2000
	mycobacterium sp. Strain PYR-1 *nidA*	Margesin, *et al.* ,2003
	ฟังก์ไจได้แก่ *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Amorphoteca, Neosartorya, Paecilomyces, Talaromyces* และ *Graphiu*	Frederric Chaillan ,*et. al.*,2004
	เชื้อยีสต์ได้แก่ *Candida, Yarrowia* และ *Pichia*	Frederric Chaillan ,*et. al.*,2004

ในสภาพธรรมชาตินำ้มันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียและราบางชนิด ที่อาศัยอยู่ทั้งในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำและสภาพแวดล้อมบก ซึ่งพบว่ามีเพียงแบคทีเรียและราบางชนิดเท่านั้นที่ย่อยสลายน้ำมันได้ จากการศึกษาพบว่า เชื้อราในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันมีอยู่เพียง 6-82% ของเชื้อราในดินทั้งหมด และพบว่ามีแบคทีเรียในดิน 0.13 - 50 % ของแบคทีเรียในดินทั้งหมดที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ (กรรณิกา, 2541) ส่วนในการศึกษาของ Hollaway, *et. al.*,(1980) พบว่ามีแบคทีเรีย 0.003-100% ของแบคทีเรียในทะเล ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ ซึ่งแบคทีเรียและราแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการย่อยสลายของน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ นั้นแตกต่างกันไป

1. สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ *Mycobacterium, Pseudomonas, Nocadia, Streptomyces, Desulfovibrio, Corynebacterium* และกลุ่มแบคทีเรียพวก cocci (Buchanan and Gibbons, 1974)

2. ราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

ในการทำ bioremediation ของดินที่ปนเปื้อนน้ำมันพบว่า เชื้อรามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคราบน้ำมันได้ดี เนื่องจากราสามารถเจริญได้ดีบริเวณที่มี pHต่ำและสารอาหารน้อย ๆ ในปีค.ศ. 1968 Davie and Westlake ได้ทำการแยกเชื้อ *Aspergillus, Penicillim* และ *Verticillium* ที่สามารถ

เจริญในน้ำมันได้ และ ได้แยกเชื้อราจุดขาว (white rot fungi) *Phanerochaete*, *Pleurotus* และ *Coriolus* ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายคราบน้ำมันได้รวดเร็วมาก

3. **จุลินทรีย์อื่น ๆ ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน**

นอกจากแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้แล้ว สิ่งมีชีวิตอื่น เช่น สาหร่าย *Protheaczopfi* และยีสต์ ก็สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เช่นกัน มีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ใช้อากาศที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนจากดินที่มีการปนเปื้อนปิโตรเลียม และ กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียจากอินโดนีเซีย พบว่ามี 33 ชนิด คือ แบคทีเรีย 8 ชนิด ฟังก์ไจ 21 ชนิด และยีสต์ 4 ชนิด และนำมาศึกษาโดยเทคนิคทางโมเลกุลและ ฟีโนไทป์ สายพันธุ์ของแบคทีเรียจีนัส *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkhold* และ *Mycobacterium* ซึ่งมี 4 สายพันธุ์ถูกพบขึ้นใหม่และยังไม่มีการรายงาน ส่วนฟังก์ไจได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* และ *Graphium* และเชื้อยีสต์ได้แก่ *Candida*, *Yarrowia* และ *Pichia* และพบว่าไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวสามรถย่อยสลายได้มากที่สุด ในขณะที่ อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนย่อยสลายได้น้อยกว่า (Frederric, *et. al.*,2004)

แบคทีเรียรีดิวซ์ไนเตรท (*Pseudomonas* sp.BS2201, BS2203 และ *Brevibacillus* sp.BS2202) ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนได้ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (ทดลอง 10 วัน ในอาหารเหลว) เชื้อสามารถย่อยสลาย total extractable material (TEM)ได้ 20 - 25 % รวมไปถึง alkanes ทั้งหมด 90 - 95 % ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (ทดลอง 50 วัน) เชื้อย่อยสลาย TEM ได้ 15 - 18 % ย่อย alkanes บางตัวได้ 20 - 25 % และ ย่อยโพลีไซคลิก
อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนได้ 15 - 18% นอกจากนั้นเชื้อสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวได้เช่นกัน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนที่ไม่มีตัวรับอิเล็กตรอนของไนเตรท (Grishenkov, *et. al.*, 2000)

Mana.,*et. al.*, 2001 ได้ศึกษาความไวในการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีในของเสียในระดับห้องทดลอง ได้เพาะเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากสถานที่ปนเปื้อน พบว่าการย่อยสลายจะเกิดขึ้นภายใน 45 วันปริมาณของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดจะลดลงถึง70%ของปริมาณไฮโดรคาร์บอนเริ่มต้น ไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและ อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจะถูกย่อยสลายได้มากที่สุด คือ 70% และ 60% ตามลำดับ

น้ำมันจัดว่าเป็นทรัพยากรธรรมชาติประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีบทบาทอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และการพัฒนาประเทศ อุตสาหกรรมประเภทต่าง ซึ่งส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนน้ำมันในสิ่งแวดล้อมต่างๆ มากยิ่งขึ้น แต่ในสิ่งแวดล้อมเหล่านั้นก็ยังมีการย่อยสลายน้ำมันโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในแหล่งนั้น เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้คัดเลือกมาจากดินที่มีการปนเปื้อนของ

น้ำมัน พบว่ามี 33 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ (Gordonia, Brevibacterium, Aeromicrobium, Burkholderia and Mycobacterium Dietzia) รา 21 สายพันธุ์ (Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Amorphoteca, Neosartorya, Paecilomyces, Talaromyces และ Graphium) และยีสต์ 4 สายพันธุ์ (Candida, Yarrowia and Pichia.) ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโรคาร์บอนอิ่มตัวได้ดีที่สุด คือ n-alkane, isoalkane และ isoprenoid ส่วนสารประกอบอะโรมาติกไฮโรคาร์บอนจะถูกย่อยสลายได้น้อยกว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เนื่องจากมีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า (Frederic, 2004)

การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีน้ำมันปนเปื้อน พบว่ามีแบคทีเรีย 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายสารปะรกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ และน้ำมันเครื่อง แบคทีเรียกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ (*Bacillus* and *Pseudomonas* spp.) สามารถย่อยสลาย medium- and long-chain alkanes ในดินที่มีน้ำมันดีเซลปนเปื้อนได้ดีกว่ากลุ่มที่1 (Mahiran, 2004)

Seudomonas sp. BS2201, BS2203 และ *Breibacillus* sp. BS2202 ซึ่งเป็น Nitrate-reducing bacterial ที่คัดแยกจากดินที่มีน้ำมันปิโตรเลียมปนเปื้อนสามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนปิโตรเลียมได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งสภาวะที่มีออกซิเจนสามารถย่อยสลาย alkane (C10–C35) ได้ 90-95% ในเวลา 10 วัน ส่วนในสภาวะไม่มีออกซิเจน สามารถย่อยสลาย alkane ได้ 20-25% นอกจากนี้ยังสามารย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbons ได้ 15-18% (V.G. Grishchenkov, 2000)

Harayama *et al.* (2004) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยทำการคัดเลือกแบคทีเรียจากการปนเปื้อนน้ำมันที่แพร่กระจายในแหล่งธรรมชาติ ซึ่งพบแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *alcanivorax* และ*cycloclasticus* ซึ่ง*alcanivorax* มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น แอลเคนได้ดี ส่วน *cycloclasticus* มีคุณสมบัติสามารถทำให้กลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนแตกสลายตัวได้

Harayama *et al.* (1999) พบว่า น้ำมันดิบประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนหลัก 4 ชนิด คือ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว (saturated hydrocarbon) สารประกอบไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว (nonsaturated hydrocarbon) ไซคลิกอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน สารประกอบไฮโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ยาก เมื่อมีการปนเปื้อนในน้ำจะมีการเปลี่ยนแปรสภาพของน้ำมันโดยอาศัย การระเหย การแตกตัวโดยกระแสคลื่น ซึ่งจะทำให้น้ำมันที่มีการปนเปื้อนเกิดการแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งแบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ต่อไป

Mahmoud and Alexander (2000) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์จากปอบำบัดน้ำเสียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ คือ *mycobacterium fortuitum* Strain NF4 *mycobacterium*

ratisbonense Strain SD4 และใช้วิธีการ high-pressure liquid chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้สามารถย่อย acyclic isoprenoids และ alkanes ได้ดี

Ghazali *et al.* (2004) การสลายตัวด้วยกระบวนการทางชีวภาพของไฮโดรคาร์บอนของดินที่ปนเปื้อน โดยใช้กลุ่มของแบคทีเรียที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน มีการทดลองนำตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอนมาเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมันดิบ หรือไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนตลอดการทดลอง โดยสายพันธุ์จุลินทรีย์จะพิจารณาจากแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีในน้ำมันดิบ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดหรือทั้งสอง ความสามารถที่สลายไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้น วิเคราะห์โดยการใช้ตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล น้ำมันดิบ น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว พบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการสลายอัลเคนสายขนาดกลาง และสายยาวในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล หลังจากที่บ่มนานเกิน 30 วัน ปรากฏว่าไม่พบอัลเคน แบคทีเรียกลุ่มนี้ประกอบด้วย *Bacillus* และ *Pseudomonas* spp.เป็นส่วนมาก

6. ปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

6.1 ลักษณะทางกายภาพของ oil pollutants

diphenylmethan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของน้ำมันจะอยู่ในสภาพของของเหลวที่อุณหภูมิ 30°C และสามารถถูกย่อยสลายโดยเชื้อ *pseudomonas* sp.แต่ที่ 20°C จะอยู่ในสภาพของของแข็งซึ่งเชื้อไม่สามารถย่อยสลายได้ เช่นเดียวกับ nepthalene จะไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ถ้าอยู่ในสภาพของของแข็งเช่นกัน (Gatellier,*et al.*,1973)

6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

อุณหภูมิมีผลต่อการย่อยสลายส่วนประกอบต่าง ๆ ของน้ำมันจากการศึกษาของ Antai, (2003) รายงานว่าที่อุณหภูมิต่ำจะขะลอการระเหยของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่ง เป็นส่วนที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันลดลง และพบว่าที่อุณหภูมิ 20 °C น้ำมันที่มีความเข้มข้นต่ำจะถูกย่อยสลายได้ดีกว่าน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูงและส่วนประกอบที่เป็นพิษจะระเหยได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่อุณหภูมิ 10 °C ส่วนประกอบที่เป็นพิษที่สามารถระเหยได้จะมีอัตราการระเหยต่ำลงมาก ซึ่งสารพิษนี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันลดต่ำลง นอกจากนี้การย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถเกิดขึ้นได้ในอุณหภูมิต่ำประมาณ 0°C และอุณหภูมิสูงประมาณ 70 °C แต่มีอัตราการย่อยสลายที่แตกต่างกันไป

6.3 ผลของสารอาหารต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

อัตราส่วนของการแพร่กระจายของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในรูป carbon/nitrogen (C/N) และ carbon/phosphorus (C/P) มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยทั่วไป และการปน เปื้อน

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนส่งผลกระทบต่อปริมาณ C ที่เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้ความสามารถในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในบริเวณที่ถูกปนเปื้อนต่ำลง (Choi, *et al.*, 2002) ในการกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้น จำเป็นต้องเติมฟอสฟอรัสลงไปในทะเลด้วย อย่างไรก็ตามปริมาณฟอสฟอรัสที่มากเกินไปจะเป็นตัวยับยั้งการย่อยสลายสารประกอบไฮโดร- คาร์บอนของจุลินทรีย์ด้วย (Ghazali, 2004) โดยทั่วไปอัตรา C/N = 60-100:1 เป็นอัตราที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Bartha, 1979)

6.4 ผลของออกซิเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

ปริมาณออกซิเจนจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะในปฏิกิริยาออกซิเดชันของจุลินทรีย์ที่ต้องอาศัยเอนไซม์ออกซิจิเนส และมีบทบาทมากกับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ (aerobes) การปนเปื้อนน้ำมันในแหล่งน้ำ พบว่าปริมาณออกซิเจนจากอากาศสามารถที่จะสลายได้ โดยตรงทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการย่อยสลายน้ำมัน ในขณะที่การปนเปื้อนในดิน พบว่าปริมาณออกซิเจนในดินจะขึ้นอยู่กับปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ออกซิเจนจากอากาศ ชนิดของดิน และปริมาณน้ำในดิน ทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ ในดินนั้นค่อนข้างช้า เนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนที่จำกัด แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสลายน้ำมันสามารถเกิดขึ้นได้ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนโดยจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิตได้เช่นกัน (Bailey ,*et al.*, 1973)

6.5 ผลของ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันจะเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง โดยเฉพาะในดินบางชนิด ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าจะมีค่าความเป็นกรดด่างรุนแรงมากทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ช้า เนื่องจากสภาพที่เป็นกรดด่างรุนแรงนี้ จะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ แต่ถ้าทำการปรับ pH ของดินที่มีความเป็นกรด(pH 4.5) ให้มีค่า pH เป็นกลาง (pH7.4) แล้วอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนพวกน้ำมันเชื้อเพลิง(gasoline) จะเพิ่มเป็น 2 เท่าและอัตราการย่อยสลายจะลดลงเมื่อค่า pH ของดินสูงขึ้น (pH8.5) (Ghazali, 2004)

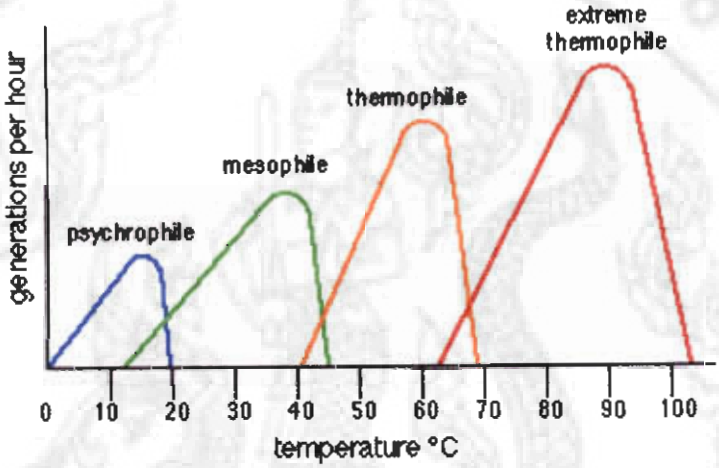
6.6 ผลของความเค็มต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ระดับความเค็มต่างๆ (ตั้งแต่ 3.3 -28.4%) พบว่าอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะลดลงเมื่อระดับความเค็มของน้ำสูงขึ้น เนื่องจากความเค็มมีผลต่อความสามารถในการแลกเปลี่ยนน้ำของผนังเซลล์ทำให้จุลินทรีย์ตาย และยังพบที่ความเค็มของน้ำทะเลไม่เกิน 20% จะมีจุลินทรีย์ในปริมาณสูงและสามารถย่อยสลายน้ำมันได้พอสมควร (Ward and Brock, 1978)

7. ปัจจัยที่ผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

7.1 อุณหภูมิ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันไป เช่น Psychrophilic microbe, Mesophilic microbe, Thermophlic microbe และ extreme thermophiles microbe จุลินทรีย์ที่อาศัยในบริเวณแอนตาร์กติก สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20-30°C และอุณหภูมิสูงที่สุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโต คือ อุณหภูมิน้อยกว่า 37 °C ซึ่งที่อุณหภูมินี้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนได้ดี (Susan, 2003)



ภาพ 5 ช่วงอุณหภูมิต่างๆที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต

Yoshiki *et. al.*, 2007 พบว่า แรงตึงผิว DW2-1 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในน้ำเสียระดับปานกลางที่สังเคราะห์ขึ้น (>1×1010 [CFU]/ml) ระหว่างอุณหภูมิที่ 20°C และ 38°C และอัตราการย่อยสลายของน้ำมันสลัดอยู่ที่ 90% หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs ไลเปสและกระบวนการแรงตึงผิวแบบชีวภาพ (BSF) ของแรงตึงผิว DW2-1 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs อยู่ที่ 1720 U/l และ 480 U/ml ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไปเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน DW2-1 จะเป็นตัวหลักที่ให้เกิดการย่อยสลายถึง 90% ของน้ำมันสลัด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทั่วไปแล้วอาจสรุปได้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ สามารถใช้เป็นดรรชนีในการบ่งบอกว่าสิ่งแวดล้อมบริเวณต่างๆ มีการปนเปื้อนจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือไม่ ซึ่งพบว่าในบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้เพียง 0.1% จากจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมด แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะพบว่ามีจุลินทรีย์กลุ่มนี้เท่านั้นที่เจริญเติบโตได้หรือคิดเป็น 99.67 % ของจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมด

Tomohisa,*et al.* (2001) ได้ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ใต้พื้นดิน บริเวณถังเก็บน้ำมันปิโตรเลียมใน Minami-aga (Niigigata) และ Yabase (Akita) พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ คือ *Bacillus thermoleovorans* ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 50 - 80°C แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 70 °C ซึ่งสามารถย่อย *n*-aikanes สายยาว ได้ดีกว่า C12 และ C15

อุณหภูมิเป็นปัจจัย ที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตเร็วหรือช้า อุณหภูมิของน้ำที่ผิวดินแตกต่างกันมาก ที่ขั้วโลกอุณหภูมิ 0 °C จนถึงบริเวณศูนย์สูตรมีอุณหภูมิ 30 °C น้ำทะเลมากว่า 90 % มีอุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C จึงเหมาะกับการเจริญของไซโครไฟล์เท่านั้น ในน้ำพุร้อนบางแห่งมีอุณหภูมิ 75-85 °C ก็พบจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นเทอร์โมไฟล์ นอกจากนี้อุณหภูมิน้ำยังเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลทำให้ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปด้วย (นงลักษณ์, 2544)

7.2 อากาศ

การย่อยสลายน้ำมันในแหล่งน้ำต่างๆ โดยจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะในปฏิกิริยาออกซิเดชันของจุลินทรีย์ ที่ต้องอาศัยเอนไซม์ออกซิจิเนส และสำหรับสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งน้ำนี้ออกซิเจนจากอากาศสามารถที่จะสลายได้โดยตรง ทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อจุลินทรีย์ สำหรับใช้ในการย่อยสลายน้ำมัน สภาพแวดล้อมบนบกนั้น พบว่า ปริมาณออกซิเจนในดินจะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ออกซิเจนจากอากาศได้ ชนิดของดิน และปริมาณน้ำในดิน ทำให้สภาพบนบก ออกซิเจนจะเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับอัตราเร็วในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ (บัญญัติ, 2532)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการออกซิเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น Aerobic type เจริญได้เฉพาะบริเวณที่มีออกซิเจนเท่านั้น Microaerophile type เจริญได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ถ้ามีออกซิเจนมากจะเจริญช้าๆ Anaerobic type เจริญได้ดีในที่ไม่มีออกซิเจน และ Facultative anaerobic type เจริญได้ทั้งสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแปลงระบบเมตาบอลิซึมของตนเองได้ Farinazleen (2004) ได้คัดเลือก *Bacillus* และ *Pseudomonas* spp. จากดินที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อน พบว่าสามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 150 rpm

งานวิจัยของ Grishchenkov *et al*, 2000 พบว่า *Pseudomonas sp.* BS2201, BS2203 และ *Breibacillus sp.* BS2202 ถูกแยกออกมาจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม เพื่อจุดประสงค์ในการศึกษา ความสามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมด้วยไฮโดรคาร์บอน ภายใต้ปัจจัยแวดล้อมทั้งแบบการใช้ออกซิเจนและแบบไม่ใช้ออกซิเจน ในการดำรงชีวิต ภายใต้สภาวะการใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต (การทดลองทางวิทยาศาสตร์ในอาหารเหลว ใช้เวลา 10 วัน) ความตึงมีค่าลดลง 20–25% ของวัตถุสกัดโดยรวม (TEM) รวมถึง มากกว่า 90–95% ของการวิเคราะห์ alkanes (n-C10–C35) ภายใต้สภาวะการไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต (การทดลองทางวิทยาศาสตร์ ใช้เวลา 50 วัน) สารอินทรีย์เหล่านี้ย่อยสลายได้ 15–18% ของ TEM, 20–25% ของ alkanes และ 15–18% ของวงโคจร

ไฮโดรคาร์บอน ความตึงยังช่วยย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัว ภายใต้เงื่อนไขที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจนดำรงชีวิต

งานวิจัยของ Frédéric *et.al.*, 2004 พบว่าการคัดเลือกการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไฮโดรคาร์บอนแบบใช้ออกซิเจน การย่อยสลายของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กถูกคัดแยกออกจากดินที่ปนเปื้อนด้วยมลพิษจากน้ำมันปิโตรเลียม และแบคทีเรียสีน้ำเงินที่ขาดออกซิเจนจากอินโดนีเซีย แสดงผลได้ชัดเจนจาก 33 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน แบคทีเรีย 8 ชนิด เชื้อรา 4 ชนิด และยีสต์ 4 ชนิด ถูกจำแนกถึงลำดับขั้นที่เฉพาะเจาะจงด้วยโมเลกุลและเทคนิคต่างๆ ที่ปรากฏให้เห็นลักษณะอันเด่นชัด ความตึงของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เช่น *Gordonia, Brevibacterium, Aeromicrobium, Dietzia, Burkholderia* และ *Mycobacterium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ใหม่นี้ยังไม่มีการอธิบาย เชื้อราจะขึ้นอยู่กับ *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Amorphoteca, Neosartorya, Paecilomyces, Talaromyces* and *Graphium* และยีสต์ได้แก่ *Candida, Yarrowia* และ *Pichia.*

เมื่อทำการวิเคราะห์โคลนในทะเลและน้ำทะเล พบว่า มีแบคทีเรียและยีสต์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากกว่า 10% และยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดอยู่ในจีนัส *Candida* ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีสามารถจแนกได้ ดังนี้ *Candida parapsilosis, C. albicans, C. guilliermondii, Yarrowia lipolytica, C. tropicalis and C. intermedia. Y. lipolytica* ซึ่งยีสต์นี้สามารถย่อยสลายส่วน aliphatic ของน้ำมันดิบ Bombay High ได้ 78% แต่ไม่สามารถย่อยสลายส่วน aromatic หรือ ashphaltene นอกจากนี้ แต่ละไอโซเลตยังต้องการอากาศ ไนโตรเจน และฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ (S.S. Zinjarde, 2002)

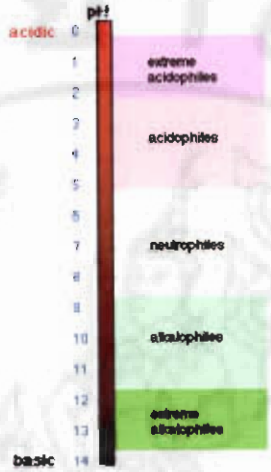
Schaefer *et al.* (2006) จุลินทรีย์ทั่วไปมีความสามารถในการเปลี่ยนอัลเคนเป็น carboxylic acid ได้ และสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ จากการทดลองมีการนำไส้เดือนเข้ามาช่วยย่อยสลายน้ำมัน พบว่าการใช้ไส้เดือนสามารถใช้ระยะเวลาสั้น และใช้ต้นทุนในการดำเนินงานต่ำ กลไกในการย่อยสลายน้ำมันนั้นมี 3 กลไกคือ

1. กระบวนการให้ออกซิเจนแก่ดินโดยการขุดโพรงที่อยู่ของไส้เดือน
2. การเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์
3. การเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน

S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของการต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (DO: 1–6 mg/l; Eh:12–300 mV)

7.3 **ความเป็นกรด-ด่าง** (pH)

จากงานวิจัยของ Hao et al., 2004 พบว่า thermophile bacteria สายพันธุ์ TH-2 ที่มีชีวิตอยู่ในบริเวณ Shengli ที่มีน้ำมัน ในภาคตะวันออกของประเทศจีน สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 85 ^{o}C และเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง



ภาพ 6 ช่วง pH ต่างๆที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต

เมื่อปรับ pH น้ำเสียด้วย Tris–HCl ให้เป็น pH 7.8 พบว่าสามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและมีประสิทธิภาพในสลายได้ดีที่สุด คือ ย่อยสลาย *n*-alkanes ได้ 97% และ ประสิทธิภาพการย่อย 86% ย่อยสลาย total aliphatic hydrocarbons ได้ 40% และ ประสิทธิภาพการย่อย 30% และ ย่อยสลาย total aromatic hydrocarbons ได้ 25% และ ประสิทธิภาพการย่อย 17% ในเวลา 10 วัน (M.L. Nievas, 2005)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายน้ำมันดิบ BH สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 130 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินที่มีน้ำมันปนเปื้อน เช่น Micrococcus sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5- 66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 and *Pseudomonas* sp. DS10-129 ซึ่งแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตจะเจริญเติบโตและย่อยสลายน้ำมันดิบได้น้อยกว่าแบคทีเรียที่รวมเป็นกลุ่ม(mix culture) โดยที่ความเข้มข้นของน้ำมันดิบ 1% mix bacteria จะย่อยสลายน้ำมันดิบBH ได้สูงสุด 78% ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C pH 7.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการย่อยสลายน้ำมันดิบBH ส่วน *Pseudomonas* sp. DS10-129 จะย่อยสลายน้ำมันดิบได้66%, *Bacillus* sp. DS6-86 ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 59%, *Micrococcus* sp. GS2-22 ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 49%, *Corynebacterium* sp. GS5- 66 ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 43%, *Flavobacterium* sp. DS5-73 ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 41% (Rahman K.S.M,2002)

Rahman *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายทางชีวภาพในน้ำมันดิน ที่มีการปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติ โดยทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมัน 130 ไอโซเลต พบว่า การผสมกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมัน สามารถลดระดับของน้ำมันดิบได้ถึง 78 % ในขณะที่ *Pseudomonas* sp.หรือ DS10-129 สามารถลดระดับน้ำมันดิบได้ 66 % *Bacillus* sp. หรือ DS6-86 สามารถลดระดับน้ำมันได้ 59 % *Micrococcus* sp.หรือ Gs2-22 สามารถลดระดับน้ำมันได้ 49 % *Corynebacterium* sp.หรือGS5-66 สามารถลดระดับน้ำมันได้ 43 % *Flavobacterium* sp. หรือ DS5-73 สามารถลดระดับน้ำมันได้ 41 % อัตราการการย่อยสลายโดยแบคทีเรียกลุ่มผสมลดลงจาก 78 % ถึง 52 % ที่ความเข้มข้นของน้ำมันดิบเพิ่มขึ้นจาก 10 % ถึง 13 % อุณหภูมิ 30 °C และความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายทางชีวภาพ

S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8)

7.4 **ความเค็ม**

จากการศึกษาของ Supama, 2004 พบว่าเชื้อES1ที่แยกจากบริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อน สามารถทนต่อความเค็มได้สูงสุด 3.5%NaCl และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่มี 0.5%NaCl ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้สูงสุด 61% เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน และความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมัน turbine (TuO) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมหลักคือ cycloalkanes และ isoalkanes ซึ่งได้รับมาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแหล่งน้ำมัน ที่นำกลับมาปรับปรุงให้ดีขึ้น เมื่อกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชื่อ Atsuta A ถูกเพาะเลี้ยงในสารละลายเกลือเจือจางที่ 0.5% (w/v) TuO จะเกิดการย่อยสลาย 90% (Hitoshi *et al.*, 2008)

S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของการต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (DO: 1–6 mg/l; Eh:12–300 mV) และเงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8) ด้วย NaCl ความเข้มข้นที่ 3–15% (ECs of 45–200 mS/cm)

8. เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) มีชื่อตามระบบว่า กลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylgylcerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัสคือ E.C.3.1.1.3

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของน้ำมันหรือไขมัน ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล และสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยา

เอสเทอริฟิเคชัน (esterification) จากกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับ หรือแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่างๆ (transesterification) ไลเปสแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate) ได้แก่

1. ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (group specific)

ไลเปสมีระดับของความจำเพาะต่อกรดไขมัน เช่น ไลเปสจากCandida antarctica จะมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายโซ่สั้นมากกว่าสายโซ่ยาว

2. ความจำเพาะต่อตำแหน่ง (position specific)

ไลเปสโดยทั่วไปมักมีความจำเพาะต่อตำแหน่งโดยเฉพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1,3 specific lipase) ของไตรกลีเซอไรด์

3.ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่ง (non-position specific)

หมายถึง ไลเปสที่เข้าทำปฏิกิริยากับไขมันได้อย่างไม่เจาะจง จะเป็นตำแหน่งที่ 1, 2 หรือ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ก็ได้ ปัจจุบันมีการนำไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมการดัดแปลงไขมันและน้ำมัน รวมไปถึงการสังเคราะห์ไขมันชนิดใหม่ขึ้น เช่น โครงสร้างของไตรกลีเซอร์ไรด์ (structured triglyceride) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของไขมันทั้งทางกายภาพและโภชนาการ ในร่างกายมนุษย์มีเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากตับอ่อน เป็นไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้น ผลสุดท้ายของการย่อยไขมันในร่างกาย ได้แก่ กรดไขมัน 2-มอโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล เป็นส่วนใหญ่ โดยปกติแล้วกรดไขมันที่มีคาร์บอนมากกว่า 12 ตัว ที่ถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์บุผนังลำไส้นั้น จะถูกนำไปสร้างเป็นไตรกลีเซอไรด์ขึ้นใหม่ แล้วถูกลำเลียงผ่านท่อน้ำเหลือง (lymphatic vessel) เพื่อส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนและไขมันที่เรียกว่า ไคโลไมครอน (chylomicron) ในทางตรงข้าม กรดไขมันที่มีคาร์บอนน้อยกว่า 12 ตัว จะถูกดูดซึมและลำเลียงผ่านทางเส้นเลือด (portal vein) นำเข้าสู่ตับได้โดยตรงในรูปอิสระเช่นเดียวกับ 2 มอโนกลีเซอไรด์ จึงนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว (มยุรี , 2548)

มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลชีพในทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีข้อดีหลายประการเช่น เอนไซม์มีความคงตัวใน organic solvents, เอนไซม์ไม่ต้องการ cofactors, เอนไซม์มีความจำเพาะต่อ substrate น้อย (broad substrate specificity) และที่สำคัญ ไลเปสมีความจำเพาะเจาะจงในเรื่อง enantioselectivity มีการรายงานว่า มีเอนไซม์

ไลเปสที่ใช้ประโยชน์ทางการค้าในปัจจุบัน มีต้นกำเนิดมาจาก 34 แหล่งของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งในนั้นมี 18 แหล่งแยกได้จากพวก fungi เช่น *Candida rugosa,Candida ntarctica, Thermomyces lanuginosus, Rhizomucor miehei* เป็นต้น และ 7 แหล่งจากแบคทีเรีย เช่น *Burkholderia cepacia, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas mendocina, Chromobacterium viscosum* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ไลเปสได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์

(organic synthesis), ใช้เติมในผงซักฟอกเพื่อช่วยประสิทธิภาพการซักล้าง, เพิ่มรสชาติในอาหาร, ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ, และในอนาคตอาจมีการนำมาใช้เพื่อการบำบัดของเสีย เนื่องจากประโยชน์อันหลากหลายของเอนไซม์ไลเปสจากจุลชีพ (กัลยา, 2544)

9. แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

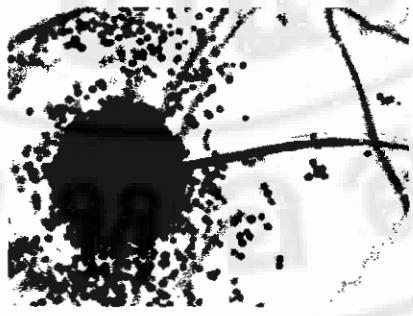
เราสามารถแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากแหล่งต่าง ๆ มากมาย ซึ่งดินเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จำนวนมาก ที่ได้จาก *Penicillium citrinum, Pseudomonas sp.* และ *Aspergillus terreus* นอกจากนี้ ยังสามารถพบจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในเนยแข็ง ผลปาล์ม และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (มยุรี, 2548)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีสมบัติในการทำงานแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และกลุ่มของไขมันที่พบในแหล่งที่คัดเลือกจุลินทรีย์ ซึ่งในที่นี้จะแบ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสไว้ 3 จำพวกใหญ่ ๆ คือ

1.เชื้อรา

เชื้อราถือว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ดี และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร เช่น *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีและเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

Hatzinikolaou และคณะ (1996) พบว่า *Aspergillus niger* BTL สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่นเดียวกับ *Aspergillus niger* A116 นอกจากนี้ยังมีเชื้อราอีกหลายชนิด (species) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่น *Rhizopus arrhizus* NRRL2286, *R. oryzae* , *R. oligosporus* , *R. delemar* CDBB H313 , *Penicillum citrinum* , *P. roqueforti* S-86, *P. chrysogenum P. cyclopium* , *P. caseicolum* , *P. camembertii* , *P. simplicissimum*, *Fusarium solani FS1*, *Hendersonula toruloidea* typeA ATCC 64930, *Mucor hiemalis f.hiemalis* al. , และ *Calvatia gigantea*



ภาพ 7 แสดงการเลี้ยงแบบ slide culture ของ *Aspergillus niger* ซึ่งแสดงให้เห็นโคนิเดียมสีดำยื่นออกไปรอบๆ ที่มา http://www.bsru.ac.th/~sci/dept/biot/rubrong.doc, 2550

2.ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่ง ที่มีผู้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจนถึงระดับการค้า เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ศึกษาไม่ก่อให้เกิดโรค และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ พบว่ายีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ *Candida rugosa* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Yarrowia lipolytica* 681 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่า *Yarrowia lipolytica* 179 ACP, *Candida rugosa* ATCC 14830 และ *Candida utilis* CDBBC245 ซึ่งจะขึ้นอยู่กับกระบวนการหมัก และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ pH และสารเหนี่ยวนำ (inducer) เป็นต้น (มยุรี ,2548)

10. งานวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส

Aleksieva *et al.* (2002) พบว่า การบำบัดทางชีววิทยาเป็นการกำจัดน้ำมันดิบจากการปนเปื้อนให้แตกตัวเป็นอิมัลชั่น โดยการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา ซึ่งสามารถเจริญได้โดยใช้น้ำมันดิบที่ปนเปื้อนเป็นแหล่งคาร์บอน

Saisuburamaniyan *et al.* (2004) กล่าวว่าวิธี colorimetric เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในดิน กรดไขมันอิสระจะควบคุมด้วย cupric acetate pyridine reagent และวัดที่ความยาวคลื่น 715 nM การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ว่องไวและใช้ในการคัดเลือกผลิตภัณฑ์จากไลเปสจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน

Ghanem *et al.* (2000) รายงานว่ากลุ่มของ *Bacillus alcalophilus* สามารถผลิตไลเปสและจากการศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยอุณหภูมิสูงที่สุด คือ 6 °C ความเป็นกรด-ด่าง 10.6 ซึ่งอยู่ในช่วงเบส

Tano-Debrah *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของไขมัน และน้ำมันในน้ำเสีย ซึ่งได้รับการจัดการและควบคุมโดยเอนไซม์ต่างๆ และจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ในกระบวนบำบัดของน้ำเสีย ที่มีความเข้มข้นของไขมันและน้ำมันสูง สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย
15 ไอโซเลต จากตัวอย่างน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน

Aleksieva *et al.* (2002) แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอยู่ในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก และจากการสำรวจแบคทีเรียกลุ่มนี้ สามารถผลิตปริมาณไลเปสได้จาก17 สายพันธุ์ ที่ผลิตไลเปสสูง จะเจริญในอาหารแข็ง tributyrin ส่วนใหญ่เป็น *Bacillus* sp. จากการสำรวจ พบว่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในค่ากิจกรรมไลเปสเริ่มแรก คือความเป็นกรด-ด่าง 6 ในอาหารเหลวสามารถมีผลิตภัณฑ์อื่นอีกมากมาย ที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนtributyrin เช่น triolein trimyristin trilaurintricaprin tricaprylin tributyrin Tween 80 น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก กลูโคส และหางนม อาหารที่มี 20 % ของหางนมรวมกับ 2 % triolein มีค่ากิจกรรมไลเปสสูงขึ้นโดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus*

sp. ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 และอุณหภูมิ 30 °C นาน 64 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ *Bacillus* sp. สามารถผลิตไลเปสนอกเซลล์15 U/ml และภายในเซลล์168 U/ml

Fadil *et al.* (2003) พบว่า น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอกมีไขมัน และน้ำตาลสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารที่มีประโยชน์ของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตไลเปส

D'Annibale *et al.* (2006) ศึกษาการแยกราที่สามารถผลิตไลเปสในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอกโดยวัดค่ากิจกรรมไลเปสนอกเซลล์

Lanciotti R *et al.* (2005) ใช้ *Yarrowia lipolytica* เป็นสายพันธุ์ ที่ได้จากการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอกได้ ถึงแม้จะมีการศึกษาว่ากลุ่มจุลินทรีย์ใช้น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตไลเปส แต่ยังไม่มีการค้นพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ใดในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันมะกอก ที่สามารถใช้กิจกรรม lypolytic ในตอนนี้เราได้เริ่มทดลอง *Bacillus* sp. แบคทีเรียจากน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอกที่ให้ค่ากิจกรรมไลเปสสูง

Lanciotti *et al.* (2005) จากรายงานในห้องปฏิบัติการพบว่า *Bacillus* sp. ที่มีอยู่มากมายในสิ่งแวดล้อม สามารถผลิตไลเปสได้ ในการศึกษานี้ได้ทำการสำรวจสารอาหารที่กระตุ้นในการผลิตไลเปส

Kim *et al.* (2000) พบว่า กลุ่มไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus pumilus* จากดิน มียีนส์ของไลเปสที่เหมือนกับ *E.coli* และมีคุณสมบัติของลำดับโปรตีน และคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกัน

Ghanem *et al.* (2000) รายงานว่ากลุ่มของ *Bacillus alcalophilus* สามารถผลิตไลเปสและจากการศึกษาพบว่า ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมไลเปสโดยอุณหภูมิสูงที่สุด คือ 6 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 10.6

Castro-Ochoa *et al.* (2005) แยก *Bacillus thermoleovorans* จากบ่อน้ำพุร้อนและได้ทำการศึกษาสภาวะของ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ การระล้าง ที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

Chen *et al.* (2004) แยก *Bacillus* sp. จากสายการผลิตนมผง และศึกษากิจกรรมไลเปส รวมไปถึงความแตกต่างของสารตั้งต้นที่อาจมีผลต่อค่ากิจกรรมไลเปส

ณกัญภัทรและทรัพย์ทวี (1998) ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล นอกจากนี้ ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อย หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้ถูกสกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และ แบคทีเรีย) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญ เนื่องจากผลิตง่าย การเก็บเกี่ยวและการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ ด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทนต่อค่าความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และ ยา

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

ระยะเวลา 1 ปี (ตุลาคม 2550-กันยายน 2551)

สถานที่ทำการทดลอง หรือ เก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการ

- ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ภาคสนาม

- เก็บตัวอย่างดินและน้ำ บริเวณต่าง ๆ ในเขต จ.เชียงใหม่ อย่างน้อย 15 แหล่งเก็บตัวอย่าง

อุปกรณ์การทำวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือ

1.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

1.2 เครื่องเขย่าอุณหภูมิห้อง

1.3 เครื่องชั่งอย่างละเอียด

1.4 เครื่องหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

1.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

1.6 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.7 ตู้เย็น

1.8 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar)

1.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2. สารเคมี

2.1. ชุดย้อมสีแกรม

2.2. กรดไฮโดรคลอริก(hydrochloric acid)

2.3. เฮกเซน (hexane)

2.4. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮโดร (sodium sulphate anhydrous)

2.5. น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์สำหรับรถยนต์ที่ใช้แล้ว

2.6. อะซีโตน (acetone)

2.7. แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride)

2.8. เอทานอล (ethanol)

2.9. กรดโอเลอิก (oleic acid)

2.10.ฟีนอลฟทาลีน (phenolphthalein)

2.11.โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)

2.12. โปแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassiumm dihydrogen phosphaphate)

3. อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.1. Nutrient agar (NA)

3.2. Nutrient broth (NB)

4. อุปกรณ์อื่นๆ

4.1. กระบอกตวง

4.2. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

4.3. จานเพาะเชื้อ

4.4. บีกเกอร์

4.5. ปิเปต

4.6 .หลอดทดลอง

4.7. ห่วงถ่ายเชื้อ

4.8. ไมโครปิเปต

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดินและน้ำ

1.1 เก็บตัวอย่างดินและน้ำ จากแหล่งปนเปื้อนน้ำมันและแหล่งธรรมชาติในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และพื้นที่ตัวอย่างบางพื้นที่ เช่น บริเวณชายฝั่งทะเลและคลังน้ำมัน เป็นต้น ใส่ในภาชนะที่แห้งและปิดสนิท โดยเก็บตัวอย่างดินและน้ำมาไม่น้อยกว่า 500 g และ 500 ml ตามลำดับ

1.2 วัดค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ พร้อมบันทึกข้อมูลทางกายภาพบริเวณแหล่งเก็บตัวอย่าง

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ

2.1 แยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารที่มีสารอาหารสูง

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ โดยชั่งตัวอย่างดิน 5 g และตัวอย่างน้ำ 5 ml ใส่ลงในอาหาร Luria – Bertani Medium (LB broth) 100 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบไม่น้อยกว่า 160 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาเกลี่ย

(Spread plate) ลงบนอาหาร LB agar ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อเชื้อขึ้นบนอาหารแล้วทำการลาก (streak) โดยใช้อาหารเดิมจนได้โคโลนีเดี่ยว ๆ และเก็บไว้บนอาหารวุ้นเอียง (stock)

2.2 **แยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเฉพาะ**

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำ โดยชั่งดิน 10 g ล้างด้วย 0.1% sodium pyrophosphate ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย 30 g glass beads ปริมาตร 90 ml นำไปไว้บนเครื่องเขย่านาน 1 hr เจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} ใส่ตัวอย่างที่ได้เจือจางไว้ 1 ml ลงใน Bushnell Haas Medium 10 ml เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.22 μm) 50 μl ลงในทุกหลอด และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 °C เป็นเวลานาน 3-6 สัปดาห์

3. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมัน**

3.1 **การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันด้วยวิธีการทางกายภาพเบื้องต้น**

1. เลือกเชื้อโคโลนีบนแต่ละจานเพาะเชื้อที่ต่างกันของโคโลนี มาลากเป็นเส้นบนอาหาร NA จนทำให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ และทำการย้อมแกรม Gram's staining (McCourt, 1988) เพื่อดูการติดสี ลักษณะรูปร่าง และการเรียงตัวเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 จะนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อบนอาหาร NA ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 hrs โดยมีขวดไม่ใส่เชื้อเป็นชุดควบคุม

3. วัดปริมาณเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้แต่ละขวดมีค่าเท่ากับ 0.5

4. หยดน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละขวดที่ทำการวัดปริมาณเชื้อแล้ว ขวดละ 2 ml นำไปเขย่าต่ออีก 72 hrs ที่อุณหภูมิ 37 °C สังเกตปริมาณของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ, สีและความข่นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยสังเกตทุก ๆ 24 hrs และทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงกับชุดควบคุม (รัฐพร, 2541) โดยมีการกำหนดระดับความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดังนี้

ระดับ 0 - ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ระดับ + - ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันแตกตัวออกเป็นเม็ดน้ำมันขนาดใหญ่และมีบางส่วนยังไม่แตกตัว

ระดับ ++ - ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเปลี่ยนแปลงไป

คือ น้ำมันทั้งหมดแตกตัวออกเป็นเม็ดน้ำมันขนาดเล็ก

3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันด้วยวิธีการทางเคมีวิเคราะห์

1.ทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียโดยวิธี Partition gravimetric (APHA, 1998)

1. นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว NB โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

2. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาตรเชื้อจากค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้แต่ละขวดมีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 หยดน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละขวดที่ทำการวัดปริมาณเชื้อแล้ว ขวดละ 2.0 ml นำไปเขย่าต่ออีก 72 hrs สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. ทดสอบการย่อยน้ำมันเครื่องที่ผิวหน้าอาหารด้วยวิธี Partition gravimetric นำอาหารปริมาณ 100 ml ปรับให้ pH เท่ากับ 1-2 หลังจากนั้นเติม Hexane ซึ่งเป็นตัวสกัด 10 ml เขย่า 3–5 min ทิ้งแยกชั้น เก็บส่วนที่เป็นน้ำมันไว้ นำส่วนล่างมาสกัดน้ำมันอีกครั้งโดยเติม Hexane 10 ml เขย่า 3-5 min

4. เก็บส่วนที่เป็นน้ำมันที่สกัดได้จาก 3. กรองด้วย Sodium sulphate anhydrous 1.0 g บนกระดาษกรอง # 40 จากนั้นระเหย Hexane โดยอบที่ 105 °C นาน 30 min หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นไม่น้อยกว่า 30 min ชั่งน้ำหนัก นำน้ำหนักที่ได้มาคำนวณหาค่าปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำมัน (mg/l)} = \frac{(B - A)X10^6}{\text{ปริมาณอาหาร (ml)}}$$

A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องที่มีน้ำมัน

2. ทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรีย โดยวิธีชีวเคมี

1. การเตรียมเอนไซม์

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร NB ที่เติมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.1 % by volume และ $CaCl_2$ 0.01 % (ภาคผนวก ก) ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวอยู่ 25 ml โดยมีค่า OD_{600} ของเชื้อเริ่มต้นที่ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 hrs ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 10 min เก็บส่วนบนมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยการไตเตรท (Holme, 1993)

2.1 ผสมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.2 ml และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 mM ปริมาตร 0.3 ml และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 Mol pH 7 ปริมาตร 4 ml เข้าด้วยกัน ใน

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml จำนวน 2 ใบ โดยขวดที่ 1 ให้เป็นสารละลายมาตรฐาน(blank) ขวดที่ 2 เติมสารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.1 ปริมาตร 0.5 ml

2.2 นำสารละลายทั้ง 2 ขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 hrs หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายผสมของอะซิโตนและเอทานอล (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 20 ml

2.3 เติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml เติมสารละลายฟีนอล์ทาลีน 3-4 หยด ลงในสารละลายขวดที่ 1 และขวดที่ 2 กำหนดให้ขวดที่ 1 เป็น blank

2.4 นำมาทำการไตเตรท หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.05 Molar ไตเตรทจนกระทั่ง pH ของสารละลายเท่ากับ 11 ซึ่งสีของฟีนอล์ฟทาลีน จะปรากฏเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายปฏิกิริยาและสารละลายมาตรฐาน (Blank) จากนั้น นำไปคำนวณ Activity ของไลเปส ซึ่งกำหนดให้ 1 ยูนิตไลเปส คือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ 1 Mmol ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส ในเวลา 1 min ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

การคำนวณค่ากิจกรรมไลเปส (Lipase Activity) โดยการไตเตรต

A คือ ความเข้มข้นของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรทแต่ละครั้ง

B คือ ปริมาตร NaOH ที่ไตเตรทสารละลายปฏิกิริยา- ปริมาตร NaOH ที่ไตเตรทสารละลายมาตรฐาน

C คือ ปริมาณสารละลายไลเปส ที่ใช้ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (0.5 ml)

ปริมาตรโมลของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท $= \frac{A \times B}{1000}$ Mol

ดังนั้น กรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น $= \frac{AXBX10^6}{1000}$ mMol

เมื่อใช้สารละลายไลเปส C ml ทำปฏิกิริยา ไฮโดรไลต์น้ำมันเครื่องเป็นเวลา 60 min

กิจกรรมไลเปส $= \frac{AXBX10^6}{1000XCX60}$ U/ml

3. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วย Colorimetric method (Holme, 1993)

3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดโอลีอิค

ใส่สารละลายกรดโอลีอีคเข้มข้น10 mMol (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.3, 0.6, 1.0, 1.3, 1.6, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ml ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรรวมในแต่ละหลอดให้เท่ากับ 5.0 ml ด้วยไอโซออกเทน จากนั้นเติม copper reagent 10.0 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น นำสารละลายชั้นบนของ ไอโซออคเทน ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 nM โดยใช้ไอโซออกเทนเป็น blank นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างการดูดกลืนแสง กับปริมาณกรดโอลีอิคเป็น mMol

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

ผสมน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว 0.2 ml และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 mMol ปริมาตร 0.3 ml และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 Mol pH 7 ปริมาตร 4 ml เข้าด้วยกัน ในขวดรูปชมพู่ 2 ใบ ขนาด 250 ml โดยขวดที่ 1 ให้เป็นสารละลายมาตรฐาน ขวดที่ 2 เติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml นำสารละลายทั้ง 2 ขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 hrs จากนั้นเติมสารละลายเอมไซม์ 0.5 ml ในขวดที่ 1 ที่ใช้เป็น Blank และปรับ pH ของสารละลายทั้ง 2 ขวด ให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 Molar HCl ทดสอบด้วยกระดาษ pH เติมไอโซออคเทน 5 ml ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 5 min แยกสารละลายชั้นบนของไอโซออคเทนด้วยวิธีปิเปต ออกมาทำการวิเคราะห์ โดยเติม copper reagent 1.0 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งไว้ให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นบนไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 nM นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิค อ่านปริมาตรของกรดโอลีอิคในหน่วยไมโครโมล และนำไปคำนวณ Activity โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตไลเปส คือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ 1 mM ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส ในเวลา 1 min ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

การคำนวณค่ากิจกรรมไลเปสโดย Colorimetric method

$$\text{กิจกรรมไลเปส} = \frac{B}{AX60} \text{ U/ml}$$

A คือ เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง (0.5 ml)

B คือ กรดโอเลอิคที่เทียบได้จากกราฟมาตรฐาน

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่คัดเลือกได้ (ภัณฑิรา, 2548)

นำเชื้อจากการ Pw3/2, Pw27/1 (ปิยะพรรณ, 2550) และ SA 11/4, SA 6/3 (อัญชุลี, 2550) และเชื้อที่ผ่านการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากข้อ 1 ถึง 3 มาทำการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโดยมีสภาวะที่ศึกษาดังนี้

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า) และ ความเค็ม (%NaCl)

1. ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

1.1 ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

1.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อจากค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับ pH เป็น 8.5, 9.0, 9.5 และ pH เดิม(7.30) นำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 hrs นำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

1.3 นำส่วนที่ 2 เชื้อไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่นระหว่างการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

2.1 ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

2.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณ OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับ pH ให้เป็น pH ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ นำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37, 40, 45 °C เป็นเวลา 48 hrs นำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

2.3 นำส่วนที่ 2 นำเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่นระหว่างการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

3. การให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

3.1 ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

3.2 เขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณ OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับให้เป็น pH ที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 100, 150, 200 rpm เป็นเวลา 48 hrs นำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

3.3 ส่วนที่ 2 นำเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่นระหว่างการศึกษาการให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า) ที่เหมาะสม

4. %NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

4.1 ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

4.2 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อ

จากค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปรับให้เป็น pH ที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม และความเร็วรอบที่เหมาะสม หลังจากนั้นเติม NaCl 0.5, 1.0, 2.0 % เป็นเวลา 48 hrs นำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

4.3 นำส่วนที่ 2 นำเชื้อไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่นระหว่างการศึกษา %NaCl ที่เหมาะสม

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างดินและน้ำ

ระยะที่ 1 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและดิน แบ่งออกเป็น 2 แหล่งใหญ่ คือ 1. พื้นที่ธรรมชาติ ในงานวิจัยนี้เลือกบ่อน้ำพุร้อน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ จำนวนทั้งหมด 5 จุด และ 2. พื้นที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว คือบริเวณปั๊มน้ำมัน หรืออู่น้ำมัน จำนวนทั้งหมด 2 จุด

ระยะที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำเพิ่มเติม คือ บริเวณป่าบ้านโป่ง และห้วยโจ้ จำนวนทั้งหมด 10 จุด และเก็บตัวอย่างดินในบริเวณพื้นที่เพิ่มเติม 1 จุด เนื่องจากผลการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในระยะที่ 1 พื้นที่บริเวณปนเปื้อนพบจุลินทรีย์เจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพต่ำกว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่พบจากแหล่งธรรมชาติ

ตอนที่ 1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากแหล่งเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียประกอบด้วย 2 แหล่ง หลักคือ 1. แหล่งดินและน้ำธรรมชาติ และ 2. แหล่งดินที่ปนเปื้อนบริเวณปั๊มน้ำมัน โดยมีผลการแยกเชื้อแบคทีเรีย ดังนี้

1. การคัดแยกเชื้อจากแหล่งดินธรรมชาติป่าบ้านโป่ง

1.1 การคัดแยกเชื้อจากดิน

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งดินธรรมชาติป่าบ้านโป่ง โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร nutrient agar (NA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 68 ชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ วรวุฒิ (2528) กล่าวว่า ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่พบจำนวนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในหนึ่งกรัมของดินที่อุดมสมบูรณ์มีแบคทีเรียมากถึงหนึ่งแสนถึงพันล้านโคโลนีต่อกรัมดิน โดยการเทเพลตและทำให้เชื้อกระจาย (spread plate) โดยการใช้แท่งแก้วงอรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่ม และทำการคัดแยกเชื้อทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ

1.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแกรม

เมื่อคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 39 ชนิด คือ SA 1 - SA 39 ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูรูปร่าง ลักษณะการเรียงตัวและติดสีย้อม ดังตารางที่ 2 ผลการย้อมแกรมนั้นพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 35 ชนิดและแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด มีรูปร่างท่อน 20 ชนิดและรูปร่างกลม 19 ชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huy *et al.* (2007) มีการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันปิโตรเลียมจากดิน พบว่า สายพันธุ์ DW2-1 ที่นำมาจำแนกการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีพบว่า มีรูปร่างท่อน และอยู่ในแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ ศุภยางค์ (2547) จุดประสงค์ของการย้อมสีเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียติดสีซึ่งทำให้เห็นได้ง่ายในการศึกษารูปร่าง (shape) ขนาด (size) การเรียงตัวของเซลล์ (cell arrangement) และโครงสร้างต่างๆของเซลล์

ตารางที่ 2 แสดงผลการย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งดินธรรมชาติบ้านโป่ง

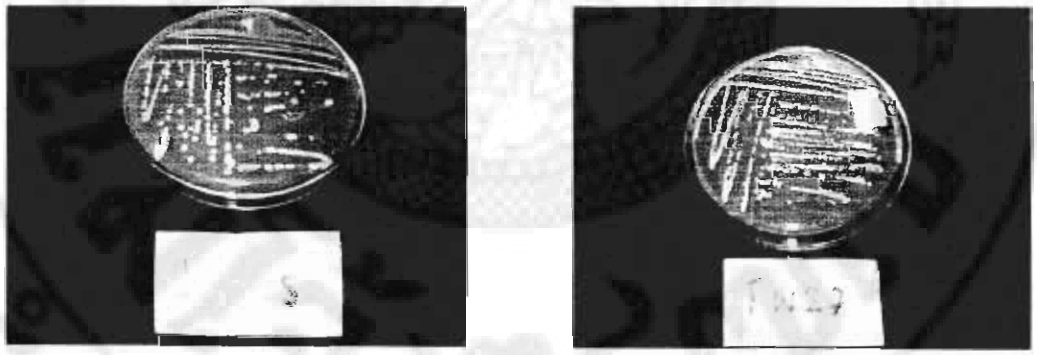
เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์
SA 1	บวก	ท่อน	SA 21	บวก	ท่อน
SA 2	ลบ	กลม	SA 22	ลบ	กลม
SA 3	ลบ	กลม	SA 23	ลบ	ท่อน
SA 4	ลบ	กลม	SA 24	ลบ	ท่อน
SA 5	ลบ	กลม	SA 25	ลบ	ท่อน
SA 6	บวก	ท่อน	SA 26	ลบ	กลม
SA7	ลบ	ท่อน	SA 27	ลบ	ท่อน
SA 8	ลบ	กลม	SA 28	ลบ	กลม
SA 9	ลบ	ท่อน	SA 29	ลบ	กลม
SA 10	ลบ	กลม	SA 30	ลบ	ท่อน
SA 11	ลบ	กลม	SA 31	ลบ	กลม
SA 12	ลบ	กลม	SA 32	ลบ	ท่อน
SA 13	ลบ	ท่อน	SA 33	ลบ	กลม
SA 14	ลบ	กลม	SA 34	ลบ	ท่อน
SA 15	บวก	ท่อน	SA 35	ลบ	ท่อน
SA 16	ลบ	ท่อน	SA 36	ลบ	ท่อน
SA 17	ลบ	กลม	SA 37	ลบ	กลม

เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์
SA 18	ลบ	กลม	SA 38	ลบ	กลม
SA 19	ลบ	กลม	SA 39	ลบ	ท่อน
SA 20	ลบ	ท่อน			

2. การคัดแยกเชื้อจากแหล่งดินธรรมชาติห้วยโจ้

2.1 การคัดแยกเชื้อจากดิน

จากการศึกษาการแยกและคัดเลือกบริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ที่นำมาศึกษาได้ 40 ชนิดคือ Pw1-Pw40 โดยวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ serial dilution และ spread plate agar เพื่อทำให้เชื้อกระจาย โดยการใช้แท่งแก้วงอรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่ม และทำการคัดแยกเชื้อ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ ซึ่ง ดวงพร (2545) ได้กล่าวว่าตามธรรมชาติจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่รวมกัน ถึงแม้ว่าจะแยกจากแหล่งที่มันอยู่ เชื้อที่ได้ปกติเป็นเชื้อผสม ดังนั้นการทำให้เชื้อบริสุทธิ์จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อนำมาเทียบหาชนิดที่นิยมใช้ คือ วิธีการ streak plate agar และ liquid dilution method



ก) การ streak plate agar เชื้อแบคทีเรียPw38 ข) การ streak plate agar เชื้อแบคทีเรียPw27

ภาพ 8 ตัวอย่างการ streak plate agar ของเชื้อแบคทีเรียPw38 และ Pw27

จากภาพ 8 เป็นเชื้อแบคทีเรีย Pw38 และ Pw27 ซึ่งได้จากการ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ ซึ่ง นงลักษณ์ (2544) ได้กล่าวว่า การ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ สามารถนำมาศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย โดยศึกษาจาก รูปร่าง (form) ขอบหรือริม(margin) พื้นผิว (surface texture) ความสูง (elevation) ความหนืด (consistency) ความขุ่น(optical features) การสร้างสีหรือรงควัตถุ (pigmentation) ของแบคทีเรีย

2.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแกรม

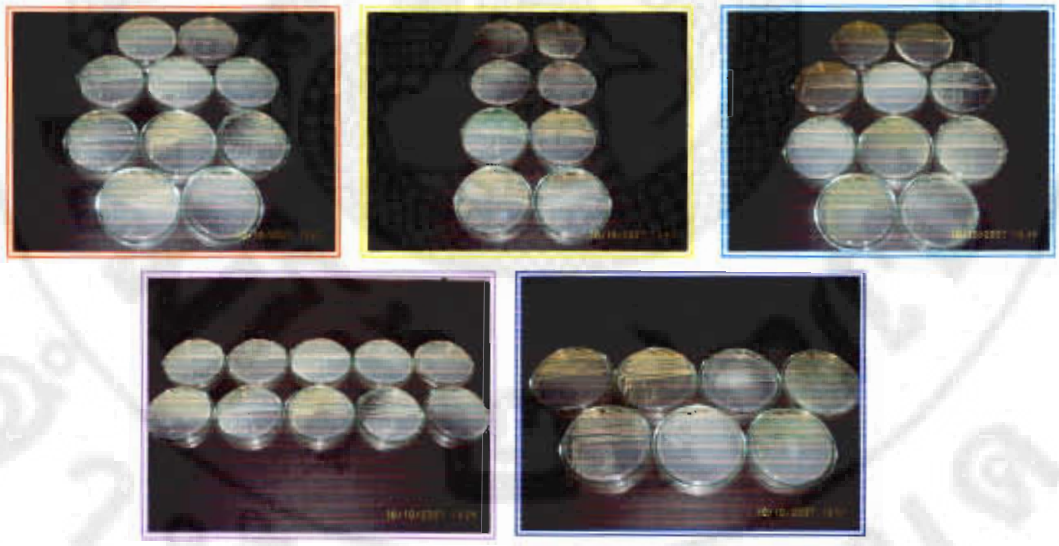
เมื่อ streak plate agar จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำมาย้อมสีแบบแกรม ซึ่งการย้อมสีวิธีนี้มีความสำคัญ และใช้กันแพร่หลาย นงลักษณ์ (2544) ได้กล่าวว่า การย้อมสีแบบแกรมเป็นการศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จึงทำให้สามารถแยกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิดคือ แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) ซึ่ง gram-positive bacteria จะติดสีม่วงของ คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) และ gram-negative bacteria จะติดสีแดงจากซาฟรานิน (safranin) เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะ โครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ใน gram-negative bacteria จะมีสารพวกไขมันที่ผนังเซลล์มากกว่า gram-positive bacteria และยังมีชั้นของผนังเซลล์บางกว่าด้วย ในกระบวนการการย้อมสีเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์จะไปละลายไขมันทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้นจึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสี crystal violet และไอโอดีนคอมเพล็กซ์ (iodine complex) หลุดออกมา เมื่อย้อมสี safranin จึงติดสีแดงของ safranin แต่ใน gram-positive bacteria ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยวเพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วงเมื่อย้อมทับด้วย safranin จึงไม่ติดสีแดง จากการทดสอบย้อมสีแกรมในแบคทีเรียที่คัดเลือกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 40 ชนิด พบว่ามีลักษณะการติดสีย้อมที่แตกต่างกันดังใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการย้อมแกรมของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติห้วยโจ้

เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์
Pw1	แดง	ท่อน	Pw21	แดง	กลม
Pw2	แดง	กลม	Pw22	แดง	กลม
Pw3	แดง	กลม	Pw23	แดง	กลม
Pw 4	แดง	กลม	Pw 24	แดง	กลม
Pw5	แดง	กลม	Pw25	แดง	กลม
Pw6	แดง	กลม	Pw26	แดง	กลม
Pw7	แดง	กลม	Pw27	แดง	กลม
Pw 8	แดง	กลม	Pw28	แดง	กลม
Pw9	แดง	กลม	Pw29	แดง	กลม
Pw10	แดง	กลม	Pw30	แดง	กลม
Pw11	แดง	กลม	Pw31	แดง	กลม

เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	เชื้อ	ลักษณะการย้อมติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์
Pw12	แดง	กลม	Pw32	แดง	กลม
Pw13	ม่วง	ท่อน	Pw33	แดง	กลม
Pw14	แดง	กลม	Pw34	แดง	กลม
Pw15	แดง	กลม	Pw35	แดง	กลม
Pw16	แดง	กลม	Pw36	แดง	กลม
Pw17	แดง	กลม	Pw37	แดง	กลม
Pw 18	แดง	กลม	Pw38	แดง	กลม
Pw19	แดง	กลม	Pw39	แดง	กลม
Pw20	แดง	กลม	Pw40	แดง	กลม

จากการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน สามารถแยกเชื้อได้ 45 ไอโซเลต คือ KS1 – KS45 โดยวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน ด้วย Dilution techniques (McCourt, 1988) ได้ผลการทดลองดังภาพ

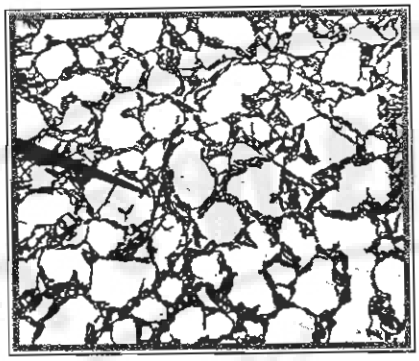


ภาพ 9 ตัวอย่างการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินของเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45

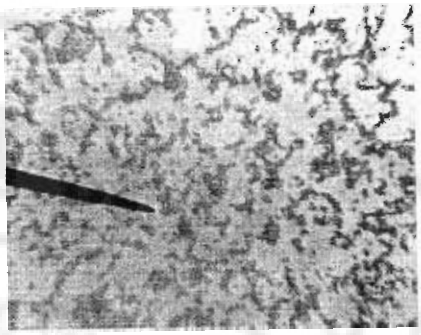
จากภาพ 9 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์ จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นนำมาทดสอบการย้อมสีแบบแกรมด้วยเทคนิค Gram's staining (McCourt, 1988) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45 มีผลการติดสีที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทดสอบการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) ในเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45

ไอโซเลต	ย้อมติดสีแกรม	ลักษณะ	เชื้อแบคทีเรีย	ย้อมติดสีแกรม	ลักษณะ
KS1	+	ท่อน	KS24	-	กลม
KS2	+	ท่อน	KS25	-	ท่อน
KS3	-	ท่อน	KS26	-	ท่อน
KS4	-	ท่อน	KS27	-	ท่อน
KS5	-	กลม	KS28	-	ท่อน
KS6	-	ท่อน	KS29	-	ท่อน
KS7	-	ท่อน	KS30	-	ท่อน
KS8	-	กลม	KS31	-	ท่อน
KS9	-	ท่อน	KS32	-	ท่อน
KS10	-	ท่อน	KS33	-	ท่อน
KS11	-	ท่อน	KS34	-	ท่อน
KS12	-	ท่อน	KS35	-	ท่อน
KS13	-	ท่อน	KS36	-	ท่อน
KS14	-	ท่อน	KS37	-	ท่อน
KS15	-	ท่อน	KS38	-	ท่อน
KS16	-	ท่อน	KS39	-	กลม
KS17	-	ท่อน	KS40	-	ท่อน
KS18	-	ท่อน	KS41	+	ท่อน
KS19	-	ท่อน	KS42	-	ท่อน
KS20	-	ท่อน	KS43	-	ท่อน
KS21	-	ท่อน	KS44	+	ท่อน
KS22	-	ท่อน	KS45	-	ท่อน
KS23	-	ท่อน			



ก. KS44 แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน



ข. KS5 แบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลม

ภาพ 10 ตัวอย่างการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) โดยถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (compound microscope) กำลังขยาย 1000 เท่า

จากผลการทดสอบการย้อมแกรมในเชื้อแบคทีเรีย KS1 – KS45 พบว่า เป็นแบคทีเรีย แกรมบวกติดสีม่วง (crystal violet) รูปร่างท่อน 4 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง(safranin) รูปร่างกลม 4 ชนิด และรูปร่างท่อน 37 ชนิด (ตารางที่ 4) ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง (safranin) ซึ่งสอดคล้องกับ นฤมล (2547) ที่คัดแยกเชื้อจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Huy *et al.* (1999) ที่มีการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันปิโตรเลียมจากดินพบว่า สายพันธุ์ DW2-1 ที่นำมาจำแนกการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีพบว่า มีรูปร่างท่อน และติดสีแกรมลบ

การย้อมสีแบบแกรมเป็นการศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จึงทำให้สามารถแยกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงจากซาฟ่านิน (safranin) เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะ โครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีสารพวกไขมันที่ผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และยังมีชั้นของผนังเซลล์บางกว่าด้วย ในกระบวนการย้อมสีเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์จะไปละลายไขมัน ทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้นจึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) และไอโอดีนคอมเพล็กซ์ (iodine complex) หลุดออกมา เมื่อย้อมสี ซาฟ่านิน (safranin) จึงติดสีแดงของ safranin แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยวเพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วงเมื่อย้อมทับด้วย safranin จึงไม่ติดสีแดง (นงลักษณ์, 2544)

2. **การแยกเชื้อจุลินทรีย์**

ระยะที่ 1 นำตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณน้ำพุร้อน มาเลี้ยงในอาหาร LB broth สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ได้ 30 ชนิด เป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 22 ชนิด และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน 8 ชนิด การเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน นำมาเลี้ยงในอาหาร LB broth สามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ 11 ชนิด

ระยะที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์ที่พบเพิ่มเติมจากป่าบ้านโป่ง จำนวน 38 ไอโซเลต (SA1-SA38) จำนวนจุลินทรีย์ที่พบเพิ่มเติมจากห้วยโจ้ จำนวน 40 ไอโซเลต (PW1-PW40) และพบจำนวนจุลินทรีย์ในแหล่งที่ปนเปื้อนน้ำมัน จำนวน 13 ไอโซเลต

ตอนที่ 2 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่แยกได้

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตอน 1 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว เพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อบนอาหาร NA ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 hrs โดยมีขวดไม่ใส่เชื้อเป็นชุดควบคุม(control) วัดปริมาณเชื้อจากค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 nm(OD_{600}) โดยให้แต่ละขวดมีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 หยดน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ลงในแต่ละขวด ขวดละ 2ml นำไปเขย่าต่ออีก 72 hrs ที่อุณหภูมิ 37^{0}C สังเกตปริมาณของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ สีและความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตทุก ๆ 24 hrs และทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงกับชุดควบคุม (รัฐพร, 2541)

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วด้วยวิธีการทางกายภาพ โดยการสังเกตปริมาณน้ำมันที่ลอยอยู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ กำหนดระดับลักษณะของน้ำมันที่เปลี่ยนแปลงไปแบ่งเป็น 3 ระดับคือ 0, + และ ++ กล่าวคือ

ระดับ 0 : ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ
ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A)

ระดับ + : ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ
เปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันแตกตัวออกเป็นเม็ดน้ำมันขนาดใหญ่เล็กสลับกัน (B)

ระดับ ++ : ลักษณะรูปแบบของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ
เปลี่ยนแปลงไป คือ น้ำมันทั้งหมดแตกตัวเป็นเม็ดน้ำมันขนาดเล็ก (C)

(A) ชุดควบคุม (B) ระดับ + (C) ระดับ ++

ภาพ 11 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปแบบของน้ำมัน

จากจุลินทรีย์ในระยะที่ 1 จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนสันกำแพง พบว่าเป็นแกรมบวก 21 ชนิด คือ W-1, W-2, W-3, W-4, W-5, W-8, W-9, W-10, W-11, W-13, W-14, W-17, W-18, W-20, S-23, S-24, S-25, S-26, S-27, S-28, S-30 แกรมลบ 9 ชนิด คือ W-6, W-7, W-12, W-15,W-16,W-19,W-21, W-22, S-29

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าเป็นแกรมบวก 4 ชนิดคือ SO_2, SO_3, SO_6, SO_9 แกรมลบ 7 ชนิดคือ SO_1, SO_4, SO_5, SO_7, SO_8, SO_{10}, SO_{11}

จากจุลินทรีย์ในระยะที่ 2 ได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการย่อยน้ำมัน ทั้งนี้ผลการย่อยสลายวัดด้วยระดับความสามารถที่กำหนดไว้ พบว่า

ภาพ 12 แสดงผลการย่อยสลายน้ำมันเครื่องใช้แล้ว

A คือ แบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันได้ระดับ 0 มีลักษณะของผิวหน้านั้นจะมีเป็นคราบน้ำมันจับตัวกันเป็นกลุ่มและเป็นฝ้าบริเวณผิวหน้า มีทั้งหมด 11 ไอโซเลต คือ SA1, SA9, SA17, SA22, SA24, SA25, SA26, SA27, SA28, SA29, SA39

B คือ แบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันได้ระดับ + มีลักษณะผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีลักษณะเป็นฝ้า เม็ดน้ำมันแตกตัวเป็นกันเป็นก้อนขนาดใหญ่และจับตัวกันที่บริเวณผิวหน้าของอาหารมีทั้งหมด 46 ไอโซเลต คือ SA3, SA4, SA5, SA10, SA14, SA18, SA19, SA23, SA30, SA32, SA33, SA34, SA35, SA36, SA37 และ PW2, PW3, PW4, PW6, PW7, PW8, PW9, PW11, PW12, PW13 , PW14, PW15, PW16, PW18, PW19, PW20, PW21, PW23, PW34, PW25, PW26, PW28, PW29, PW30, PW31, PW33, PW34, PW37, PW39, PW40

C คือ แบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันได้ระดับ ++ มีลักษณะของน้ำมันแตกตัวเป็นเม็ด ขนาดเล็กและจับตัวกันที่ข้าง ๆ ขวด มีทั้งหมด 21 ไอโซเลต ได้แก่ SA2, SA6, SA7, SA8, SA11, SA12, SA13, SA20, SA21, SA38, SA16 และ PW1, PW5, PW10, PW17, PW22, PW27, PW32, PW35, PW36, PW38

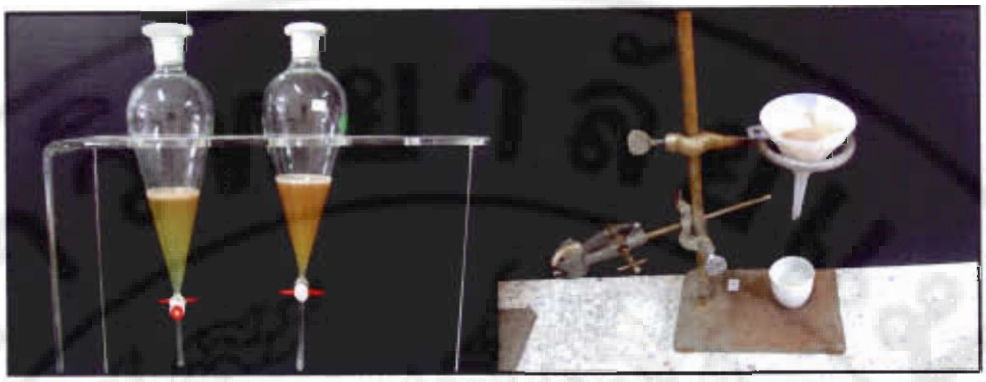
จากผลการเปรียบเทียบรูปแบบลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในตารางที่ 5 พบว่ามี 13 ไอโซเลต คือ KS21, KS23, KS25, KS27, KS28, KS29, KS30, KS34, KS35, KS37, KS38, KS41และ KS44 มีลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในระดับ ++ (ภาพ 11, C) และ จำนวน 32 ไอโซเลต คือ KS1- KS20, KS22, KS24, KS26, KS29, KS31- KS33, KS36, KS39, KS40, KS42, KS43 มีลักษณะของน้ำมันบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในระดับ + (ภาพ 11, B)

จากการที่น้ำมันบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแรงตึงผิว คือ แรงดึงและแรงยึดเหนี่ยวโมเลกุลบนพื้นผิวของของเหลวหรือผิวของของแข็ง ซึ่งปกติแล้วน้ำมันและน้ำจะแยกชั้นกัน โดยน้ำมันจะลอยอยู่ส่วนบนของน้ำ น้ำมันจะมีแรงตึงผิวและพันธะในตัวเองและพันธะกับวัตถุอื่นที่แข็งแรงกว่าน้ำ ทำให้น้ำมันยึดเกาะติดกับวัตถุอื่นได้ดีกว่าน้ำ ลักษณะของน้ำมันมีการแตกตัวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bento *et al.* (2004) กล่าวว่าสาร biosurfactant ที่แบคทีเรียผลิตออกมาสามารถย่อยสลายน้ำมันได้บางส่วน แสดงว่าแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีการผลิตสาร biosurfactant จึงทำให้สามารถทำให้น้ำมันแตกตัวได้ดี ไม่รวมกันเป็นแพปกคลุมผิวหน้าอาหาร ซึ่งวิธีการศึกษาเช่นนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ รัฐพร(2541), นฤมล (2547), ไพจิตรา(2547), ปิยะพรรณ (2550) และ อัญชุลี(2550) ที่ได้ทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำมันเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 5 การทดสอบความสามารถการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	ผลการย่อยสลายน้ำมัน	ไอโซเลต	ผลการย่อยสลายน้ำมัน
Control	0	KS23	++
KS1	+	KS24	+
KS2	+	KS25	++
KS3	+	KS26	+
KS4	+	KS27	++
KS5	+	KS28	++
KS6	+	KS29	++
KS7	+	KS30	++
KS8	+	KS31	+
KS9	+	KS32	+
KS10	+	KS33	+
KS11	+	KS34	++
KS12	+	KS35	++
KS13	+	KS36	+
KS14	+	KS37	++
KS15	+	KS38	++
KS16	+	KS39	+
KS17	+	KS40	+
KS18	+	KS41	++
KS19	+	KS42	+
KS20	+	KS43	+
KS21	++	KS44	++
KS22	+	KS45	+

จากเชื้อที่สามารถย่อยน้ำมันได้ในระดับ ++ นั้นได้นำมาทดสอบโดยวิธี Partition gravimetric method และคำนวณค่าปริมาณไขมันได้ดังแสดงในตารางที่ 6



ก ข

ภาพที่ 13 การทดสอบปริมาณน้ำมันที่เหลือด้วยวิธี partition gravimetric method

ก) แสดงการแยกชั้นระหว่างน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข) การกรองน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วกรองผ่าน Na_2So_3 ใส่ลงในถ้วยคูชิเบิล

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซนต์การย่อยน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยน้ำมันได้ในระดับ 2

ไอโซเลต	เปอร์เซนต์การย่อยน้ำมัน
control	0%
SA 16	83.33%
SA 6	83.33%
SA 7	81.15%
SA 11	71.42%
SA 8	70.86%
SA 38	70.86%
SA 20	52.89%
SA 13	49.28%
SA 12	44.96%
SA 21	42.75%

ไอโซเลต	เปอร์เซนต์การย่อยน้ำมัน
SA 2	26.61%
Pw1	92.15%
Pw5	88.40%
Pw10	94.54%
Pw17	46.08%
Pw22	97.61%
Pw27	86%
Pw32	87.71%
Pw35	64.51%
Pw36	66.55%
Pw38	64.51%
KS21	77.27 %
KS23	90.90 %
KS25	0 %
KS27	95.45 %
KS28	72.72 %
KS29	45.45 %
KS30	95.45 %
KS34	31.82 %
KS35	31.82 %
KS37	95.45 %
KS38	81.82 %
KS41	36.36 %
KS44	68.18 %

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลต ด้วยวิธี Partition gravimetric (ตารางที่ 6 และภาพ 14) พบว่า แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วมากกว่า 50 % (ภาพ 14, C) จำนวน 8 ไอโซเลต คือ KS21, KS23, KS27, KS28, KS30, KS37, KS38 และ KS44

(A) (B) (C)

ชุดควบคุม เปอร์เซ็นต์การย่อยน้อยกว่า 50% เปอร์เซ็นต์การย่อยมากกว่า 50%

ภาพ 14 ลักษณะปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่หลังจากนำไปอบที่ 105 °C นาน 30 min

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ ภัณฑิรา (2548) พบว่าเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุด คือ S27 ย่อยสลายน้ำมันได้ 79.39% ซึ่งได้จากบริเวณน้ำพุร้อน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ เช่นเดียวกับการศึกษาของ อัญชุลี (2550) พบว่า SA 11/4 จากแหล่งดินธรรมชาติ สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วด้วยวิธี partition gravimetric method ได้สูงสุด 80.75% และ ปิยะพรรณ (2550) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 9 ชนิด จากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันได้มากกว่า 50 % คือ Pw22 Pw10 Pw1 Pw5 Pw32 Pw27 Pw36 Pw35 และPw38 สามารถย่อยน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว ได้ดังนี้ 97.61 94.54 92.15 88.40 87.71 86.00 66.55 64.51และ 64.51% ตามลำดับ และสอดคล้องกับ Huy *et al.* (1999) พบว่า มีแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากดินที่ปนเปื้อนในเวียดนาม เป็นแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas sp.* และยังพบอีกว่า *Acinetobacter sp.* มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบได้ 95% เช่นเดียวกับมยุรี (2548) พบว่าการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเชื้อ *Pseudomonas sp.* และ *Bacillus sp.* เชื้อแบคทีเรียที่มีผลการย่อยสลายไขมันที่ดีที่สุด คือ เชื้อ *Pseudomonas sp.*ที่ถูกตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ที่มีการเขย่าอยู่ตลอดเวลา มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันดังนี้ 78.09 และ 64.5 % ตามลำดับ

ตอนที่ 3 ทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียด้วยวิธีชีวเคมี

ในงานวิจัยได้วิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันในกลุ่มไฮโดรคาร์บอนด้วยกระบวนการทางชีวเคมี คือ การทดสอบแอคติวิตีของเอ็นไซม์ไลเปส โดยแสดงผลในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ไอโซเลตต่าง ๆ

ไอโซเลต	ค่าแอคติวิตีไลเปส (ยูนิต/ซม^3)
Pw1	1.88
Pw5	1.03
Pw10	2.90
Pw17	1.53
Pw22	2.22
Pw27	2.39
Pw32	2.39
Pw35	0.17
Pw36	2.05
Pw38	1.20
SA 38/2	3.44
SA 6/4	0.72
SA 11/4	4.32
SA 12/1	1.92
SA 7/1	4.00
SA 6/3	2.08
SA 38/4	4.23
SA 2/5	1.76
KS27	2.67
KS30	5.67
KS37	6.67
KS23	0.5
KS38	2.67
KS21	4.17
KS28	0.67
KS44	2.67

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพ 15 แสดงการทดสอบค่ากิจกรรมไลเปสโดยวิธี colorimetric method

(ก) แสดงสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิค

(ข) สารละลายเอนไซม์จากการทดสอบ colorimetric ในน้ำมันมะกอก

(ค) สารละลายเอนไซม์จากการทดสอบ colorimetric ในน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

(ง) แสดงความแตกต่างของสารละลายเอนไซม์ในน้ำมันมะกอกและน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว

จากการทดสอบโดยวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วย Colorimetric method พบว่าเชื้อที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันเครื่องสูงสุด 3 อันดับแรก คือ KS37, KS30, และ KS21 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันเครื่อง เท่ากับ 1.01, 0.53, และ 0.48 U/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาของ อัญชุลี (2550) และปิยะพรรณ (2550) พบว่าเชื้อรหัส SA และ PW จำต้องจำแนกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อทดสอบความคล้ายคลึงได้ชัดเจนขึ้น และนำมาทดสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส พบว่า SA 11/4 เป็นเชื้อที่แยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยวิธีไตเตรท 4.32 U/ml และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี colorimetric 0.74 U/ml และ ปิยะพรรณ (2550) พบว่าเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ด้วยการไตเตรทในน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว พบว่า Pw27/1 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ 3.60 U/ml และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี colorimetric 1.47 U/ml

จากการศึกษาของ Yoshiki *et al.*, 2007 พบว่า แรงตึงผิว DW2-1 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในน้ำเสียระดับปานกลางที่สังเคราะห์ขึ้น (>1×1010 [CFU]/ml) ระหว่างอุณหภูมิที่ 20°C และ 38°C และอัตราการย่อยสลายของน้ำมันสลัดอยู่ที่ 90% หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs ไลเปสและกระบวนการแรงตึงผิวแบบชีวภาพ (BSF) ของแรงตึงผิว DW2-1 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs อยู่ที่ 1720 U/l และ 480 U/ml ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไปเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน DW2-1 จะเป็นตัวหลักที่ให้เกิดการย่อยสลายถึง 90% ของน้ำมันสลัด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นระยะเวลา 7 วัน

จะเห็นได้ว่า วิธีไตเตรทจะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าวิธี colorimetric ดังนั้น วิธี colorimetric จึงเป็นการตรวจสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ละเอียดกว่าการไตเตรต เนื่องจากการไตเตรตนั้น จุดยุติของสารสังเกตได้ยาก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลองนั้นอาจจะไม่เป็นไปตามมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากทั้ง 2 วิธีข้างต้น มีค่าที่แปรผันตามกัน ดังนั้นการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี colorimetric จึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและสะดวกกว่าวิธีไตเตรต สอดคล้องกับการทดลองของ Saisuburamaniyan *et al.* (2004) กล่าวว่าวิธี colorimetric เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในดิน กรดไขมันอิสระจะควบคุมด้วย cupric acetate pyridine reagent และวัดที่ความยาวคลื่น 715 nM การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ว่องไว และใช้ในการคัดเลือกผลิตภัณฑ์จากไลเปสจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และนำเชื้อที่มีค่ากิจกรรมไลเปสสูงสุด 3 อันดับแรก ไปทำการทดลองขั้นต่อไป

Ghanem *et al.* (2000) รายงานว่า กลุ่มของ *Bacillus alcalophilus* สามารถผลิตไลเปสและจากการศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยอุณหภูมิสูงที่สุด คือ 6 ^{0}C ความเป็นกรด-ด่าง 10.6 ซึ่งอยู่ในช่วงเบส

ตอนที่ 4 การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรีย

สกัด DNA เพิ่มปริมาณ 16s rRNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และหาลำดับเบสของ16s rRNA นำข้อมูลลำดับเบสของ 16s rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตมาเปรียบเทียบข้อมูลของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ Gen Bank EMB และ DDBJ โดยใช้โปรแกรมเปรียบเทียบที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ซึ่งได้ว่า SA 38/2 SA 6/4 SA 6/3 SA 11/4 SA 2/5 และ SA 38/4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp. SA 7/1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในสกุล *Ralstonia mannitolilytica* และ SA 12/1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในจำพวก Uncultured bacterium ในขณะที่ Pw5/1 Pw5/2 และPw35/3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในจำพวก Uncultured bacterium ซึ่งเป็นเชื้อที่ยังไม่มีการค้นพบเพราะไม่มีความเหมือนกับ Gen Bank Pw27/1

และ Pw35/2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในสกุล Acinetobacter sp. Pw3/2และ Pw35/1มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในสกุล Enterobacter sp. Pw10/2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในจำพวก Ralstonia mannitolilytica และPw32/1มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในจำพวก Bacillus cereus และพบว่ารหัส KS ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 3 อันดับแรก ได้แก่ เชื้อ KS21 และ KS30 คือเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และ KS37 คือเชื้อแบคทีเรีย *Lysinibacillus boronitolerans* มี % ความเหมือน 100 % เชื้อที่แยกได้อยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* พบว่าสอดคล้องกับงานของ F.L. Toledo, (2005) ที่คัดเลือกเชื้อจากน้ำมัน ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีสารไฮโดรคาร์บอน และเมื่อจำแนกโดย 16s rDNA ส่วนใหญ่คือเชื้อ *Bacillus* เช่นกัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Bento *et al.* (2004) กล่าวว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้นั้น แยกมาจากดินในแคลิฟอเนียร์และดินจากฮ่องกงที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดีเซล เมื่อนำจุลินทรีย์เหล่านั้นมาจำแนกโดยการหาลำดับเบสของยีน 16s rDNA พบว่าเป็น *Bacillus cereus, bacillus sphaericus, B. fusuformis, Acinetobacter junii, Pseudomonas sp.*และ *B. pumilus* การวิเคราะห์กลุ่มการหาลำดับเบสของยีน 16s rDNA ในแบคทีเรียที่แยกได้ปรากฏว่า 70 % คล้ายกับกลุ่มพวกที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน และที่นำไปประยุกต์ในการบำบัดน้ำเสียและฟื้นฟูสภาพดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียม สอดคล้องกับ Ghazali *et al.*, (2004) ที่กล่าวว่า แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วได้ดี และในส่วนของการทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรียที่มีค่าแตกต่างกัน เพราะเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน ความสามรถในการผลิตเอนไซม์ต่างกัน

จากการศึกษาของ Savapom *et al.*, 2006 พบว่าการจับกลุ่มของรูปแบบการสังเคราะห์ ด้วยการใช้เครื่องแสดงผลทางคณิตศาสตร์ทีละขั้นตอน (SDA) แสดงให้เห็นถึงอัตราของกลุ่มที่จำเป็นต้องควบคุมความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง และสามารถลดลงจาก 11 กลุ่มเบื้องต้นสำหรับ 16S rDNA คัดเลือกให้เหลือ 3 กลุ่ม ความต่อเนื่องกันเริ่มกำเนิดขึ้นจาก rDNA (16S rDNA transcripts) ถูกนำกลับใช้ได้ใหม่ในเครือข่ายเดียวกัน ประกอบด้วยการแยกเพาะเชื้อจุลินทรีย์ของ *Bacillus marisflavi, Microbacterium oxydans* และ *Pseudomonas oleovorans* การศึกษาการแยกตัวของดินเหล่านี้ด้วยการใช้น้ำมันหล่อลื่นให้เหมือนกับเป็นแหล่งกำเนิดคาร์บอน สามารถแยกแบคทีเรีย 317 ชนิด มี 3 ชนิดที่แสดงถึงความคล้ายคลึงกันอย่างต่อเนื่อง (N96%) ด้วยแบบ 16S rDNA ซึ่งจำแนกโดยการใช้ SDA ทำให้เกิดความแตกต่างเป็นอย่างมาก ระหว่างกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งถูกตรวจสอบทีละอย่าง และการผสมผสานกันของความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น การศึกษาวิเคราะห์นี้ถูกสาธิตให้เห็นว่าการคัดเลือกโดยใช้การรวมกลุ่มกันของสิ่งที่คล้ายคลึงกับโมเลกุล SDA จะทำให้การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งในสารอาหารเหลวและทรายที่ปนเปื้อนมากกว่าการใช้แบคทีเรียชนิดเดียว

จากการทดลองของ S. Khodijah *et al.*, 2004 พบว่า การใช้ 16S rDNA ค้นพบว่าแบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น ประกอบไปด้วย

แบคทีเรียหลากหลายรูปร่าง เช่น รูปทรงกลม (*Streptococcus* และ *Staphylococcus*) and รูปท่อนยาว (*Streptobacillus*) จากการศึกษาด้วยกระบวนการบำบัดด้วยชีวภาพด้วยการวัดแบบการทดลองทางวิทยาศาสตร์ การทดลองโครโมโซมในห้องปฏิบัติการ(ประกอบด้วย สาหร่ายทะเล ทรายจากชายหาดและน้ำมันเข้มข้น) ภายใต้เงื่อนไขการใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตด้วยการบำบัด 2 วิธี ที่แตกต่างกัน (วางไว้ทั้งในและนอกอาคาร) ถูกสร้างขึ้นในการบำบัดฟื้นฟูน้ำมันที่รั่วไหล เพื่อศึกษาค้นคว้าบทบาทที่สำคัญของแบคทีเรียในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน ไม่มีความแตกต่างอย่างเด่นชัดของกระบวนการของแบคทีเรีย ในการรักษาทั้ง 2 แบบ และการขจัดน้ำมันจำนวนมากด้วยการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียภายนอกอาคารมีผลมากกว่าภายในอาคารเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ค่าของ pH, Eh, EC และออกซิเจนเจือจาง (DO) ในการรักษาทั้ง 2 แบบ แสดงให้เห็นว่า กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้นภายใต้เงื่อนไขของการต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (DO: 1–6 mg/l; Eh:12–300 mV) และเงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8) ด้วย NaCl ความเข้มข้นที่ 3–15% (ECs of 45–200 mS/cm)

จากการใช้เทคนิค 16s rDNA ทำให้ได้สาย DNA ของ 16S rDNA gene ที่มีความแตกต่างในแบคทีเรียแต่ละชนิด สามารถนำมาใช้เพื่อตรวจสอบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใดหรือกลุ่มใดในฐานข้อมูล (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ entrez หรือ http:// rdp.cme. msu.edu /index .jsp) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการทำวิจัยต่อไป (ศรีสุดา, 2552)

ตอนที่ 5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่คัดเลือกได้

นำเชื้อ KS21, KS30, KS37 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงสุด 3 อันดับแรก และอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* ซึ่งคัดแยกจากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และ Pw3/2, Pw27/1 อยู่ในกลุ่มของ *Acinetobacter* sp. (ปิยะพรรณ, 2550) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงสุด 2 อันดับแรก ซึ่งคัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และ SA 11/4, SA 6/3 อยู่ในกลุ่มของ *Acinetobacter* sp. (อัญชุลี, 2550) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วสูงสุด 2 อันดับแรก ซึ่งคัดแยกจากแหล่งดินธรรมชาติ เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) อุณหภูมิ ปริมาณการให้อากาศ และ% NaCl เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยแบคทีเรีย (ภัณฑิรา, 2548)

5.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของแต่ละเชื้อมาวุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อจากค่า Optical Density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้แต่ละขวดมีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 แล้วปรับpH ในอาหาร NB เป็น 8.5, 9.0, 9.5 แต่ละขวดอย่างน้อย 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 150

rpm อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 hrs หลังจากนั้นนำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ขณะเดียวกันนำเชื้อที่วัดค่า OD = 0.5 ไปเกลี่ย (spread plate) บนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ได้ผลดังตาราง 8

ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างแตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลต	ค่า OD_{600}		
		pH 8.5	pH 9.0	pH 9.5
1	KS21	1.139	0.989	1.068
2	KS30	1.126	1.095	1.144
3	KS37	1.391	1.250	1.267
4	Pw3/2	0.988	1.019	1.036
5	Pw27/1	1.099	1.118	1.135
6	SA 11/4	1.214	1.205	1.187
7	SA 6/3	1.498	1.180	1.211

จากตารางที่ 8 เชื้อ KS21, KS30, KS37 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* และ SA 11/4, SA 6/3 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 8.5 และ Pw3/2, Pw27/1 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 9.5 ซึ่งใกล้เคียงกับ Ghanem *et al.* (2000) รายงานว่ากลุ่มของ *Bacillus alcalophilus* สามารถผลิตไลเปส และจากการศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยอุณหภูมิสูงที่สุด คือ 6 °C ความเป็นกรด-ด่าง 10.6 ซึ่งอยู่ในช่วงเบส และสอดคล้องกับ ภัณฑิรา, (2548) ที่ทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 9.0

แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบจำนวนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในหนึ่งกรัมของดินที่อุดมสมบูรณ์ มีแบคทีเรียมากถึงหนึ่งแสนถึงพันล้านโคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียที่พบในดินโดยทั่วไป มีรูปร่าง 3 แบบคือ แบบกลม แบบแท่ง และแบบเกลียว แบคทีเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในดินที่มีอินทรียวัตถุ มีความชื้นพอสมควร และค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.5 – 9.0 กิจกรรมของแบคทีเรียในดินมีมากมาย แต่ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์ คือ การเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน ทำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และทำให้เกิดกระบวนการตรึง

ไนโตรเจนในดินเป็นต้น แบคทีเรียที่พบและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ เช่น *Pseudomanas sp, Rhizobium sp, Bacillus sp, Clostridium sp* เป็นต้น (สมศักดิ์, 2528)

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ pH ของดิน พบว่า *actinomycetes* sp. มี pH เหมาะสมระหว่าง 7.0 -7.5 ถ้าเป็นดินที่เป็นกรดมากๆ จะชะงักการเจริญเติบโตหรือตาย ส่วน *Azotobacter chroococum* เจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกลางหรือค่อนข้างเป็นเบส แต่ไม่เจริญในดินที่ pH ต่ำกว่า 4.0 (บัญญัติ, 2532)

pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แตกต่างกันไป ส่วนมากเจริญได้ที่ pH 6-8 ยีสต์และราส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะเป็นกรด (acidophile) แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะเบส (alkaliphile) และจากงานวิจัยของ Hao et al., 2004 พบว่า thermophile bacteria สายพันธุ์ TH-2 ที่มีชีวิตอยู่ในบริเวณ Shengli ที่มีน้ำมัน ในภาคตะวันออกของประเทศจีน สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 85 °C และเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง

เช่นเดียวกับ การศึกษาของนงลักษณ์ (2544) ; Rahman *et al.*, (2002) ; ปิยะพรรณ (2550) พบว่า ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และ จากการศึกษาของ S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8)

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่เป็นด่าง เชื้อที่คัดแยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติและแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมทั้งกลุ่ม *Bacillus* และ *Acinetobacter* sp. สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนกว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของแต่ละเชื้อจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อ OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 แต่ละขวดอย่างน้อย 2 ซ้ำโดยกำหนดการเลี้ยงเชื้อ KS21, KS30, KS37, SA 11/4, SA 6/3 มี pH 8.5 และ Pw27/1, Pw3/2 มี pH 9.5 นำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37, 40 และ 45°C นาน 48 hrs หลังจากนั้นนำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ขณะเดียวกันก็นำเชื้อที่วัดค่า OD = 0.5 ไปเกลี่ย (spread plate)บนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลต	ค่า OD_{600}		
		อุณหภูมิ 37 °C	อุณหภูมิ 40 °C	อุณหภูมิ 45 °C
1	KS21	1.139	1.126	0.692
2	KS30	1.126	1.138	0.576
3	KS37	1.391	0.556	0.558
4	Pw3/2	1.036	0.920	0.906
5	Pw27/1	1.146	1.135	0.471
6	SA 11/4	1.170	0.927	0.616
7	SA 6/3	1.723	1.069	1.066

จากตารางที่ 9 เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C และเชื้อ KS30, KS21, Pw27/1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C ถึง 40 °C ซึ่งการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถเกิดได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง โดยเกิดจากจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ (Psychrophile) อุณหภูมิปานกลาง (Mesophile) และในอุณหภูมิสูง (Thermophile) พบว่าการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน สามารถเกิดขึ้นได้ในอุณหภูมิต่ำประมาณ 0 °C และอุณหภูมิสูงประมาณ 70 °C ส่วนประกอบของน้ำมันมีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันที่อุณหภูมิต่างๆโดยที่อุณหภูมิต่ำจะขัดขวางการระเหยของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ต่างๆ ทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 20 °C น้ำมันที่มีความเข้มข้นต่ำจะถูกย่อยสลายได้ดีกว่าน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง และส่วนประกอบที่เป็นพิษจะระเหยได้อย่างรวดเร็ว แต่ที่อุณหภูมิ 10 °C ส่วนประกอบที่เป็นพิษที่สามารถระเหยได้จะมีอัตราการระเหยต่ำลงมาก ซึ่งสารพิษนี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้อัตราการย่อยสลายน้ำมันลดต่ำลง (Antai, 2003) ใกล้เคียงกับ Susan, 2003 ที่พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันไป เช่น Psychrophilic microbe, Mesophilic microbe, Thermophlic microbe และ extreme thermophiles microbe จุลินทรีย์ที่อาศัยในบริเวณแอนตาร์กติก สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20-30°C และอุณหภูมิสูงที่สุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโต คือ อุณหภูมิน้อยกว่า 37 °C ซึ่งที่อุณหภูมินี้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนได้ดี เช่นเดียวกับงานวิจัยของ (Hao R. *et al.*, 2004; ภัณฑิรา, 2548) และพบว่า *Bacillus sp.* สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ที่อุณหภูมิ 20 °C – 44 °C (Antai S.P., 1990) เช่นเดียวกับ KS21และKS30 ซึ่งย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำมันปิโตเลียมที่ปนเปื้อนได้ดีที่อุณหภูมินี้ (Gilber and Higgins., 1978)

จากการศึกษาของ Yoshiki *et al.*, 2007 พบว่า แรงตึงผิว DW2-1 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในน้ำเสียระดับปานกลางที่สังเคราะห์ขึ้น (>1×1010 [CFU]/ml) ระหว่างอุณหภูมิที่ 20°C และ 38°C และอัตราการย่อยสลายของน้ำมันสลัดอยู่ที่ 90% หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs ไลเปสและกระบวนการแรงตึงผิวแบบชีวภาพ (BSF) ของแรงตึงผิว DW2-1 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 48 hrs อยู่ที่ 1720 U/l และ 480 U/ml ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไปเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน DW2-1 จะเป็นตัวหลักที่ให้เกิดการย่อยสลายถึง 90% ของน้ำมันสลัด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทั่วไปแล้วอาจสรุปได้ ว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ สามารถใช้เป็นดรรชนีในการบ่งบอกว่าสิ่งแวดล้อมบริเวณต่างๆ มีการปนเปื้อนจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือไม่ ซึ่งพบว่าในบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้เพียง 0.1% จากจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมด แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะพบว่ามีจุลินทรีย์กลุ่มนี้เท่านั้นที่เจริญเติบโตได้หรือคิดเป็น 99.67 % ของจุลินทรีย์ที่พบทั้งหมด

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติ แหล่งน้ำธรรมชาติและแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วทั้งกลุ่ม *Bacillus* และ *Acinetobacter* sp. ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C และบางเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 37 ถึง 40 °C เพราะเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

5.3 การให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของแต่ละเชื้อ มาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อจากค่า OD_{600} เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.5 แต่ละขวดอย่างน้อย 2 ซ้ำ เลี้ยงเชื้อ KS21, KS30, KS37, SA 11/4, SA 6/3 มี pH 8.5 และ Pw27/1, Pw3/2 มี pH 9.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทดสอบการเจริญเติบโตที่ความเร็วรอบ 100,150 และ 180 rpm นาน 48 hrs หลังจากนั้นนำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ขณะเดียวกันก็นำเชื้อที่วัดค่า OD = 0.5 ไปเกลี่ย(spread plate)บนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ความเร็วรอบในการเขย่าแตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลต	ค่า OD_{600}		
		100 rpm	150 rpm	200 rpm
1	KS21	1.110	1.159	1.198
2	KS30	0.931	1.149	1.034
3	KS37	0.558	1.391	1.290
4	Pw3/2	0.772	1.036	0.893
5	Pw27/1	1.063	1.181	1.051
6	SA 11/4	0.860	1.214	1.048
7	SA 6/3	0.936	1.498	0.936

จากตารางที่ 10 เชื้อ KS30, KS37, SA 11/4, SA 6/3, Pw3/2, Pw27/1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเร็วรอบของการให้อากาศ 150 rpm ยกเว้น KS21 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเร็วรอบของการให้อากาศ 200 rpm ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่ต้องการอากาศ และสอดคล้องกับ ภัณฑิรา (2548) ที่ทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดี ที่ความเร็วรอบของการให้อากาศ 150 rpm และเช่นเดียวกับ Grishchenkov (2000) ที่ทำการศึกษา *Seudomonas* sp. BS2201, BS2203 และ *Breibacillus* sp. BS2202 ซึ่งเป็น Nitrate-reducing bacterial ที่คัดแยกจากดินที่มีน้ำมันปิโตรเลียมปนเปื้อน สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนปิโตรเลียมได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งสภาวะที่มีออกซิเจนสามารถย่อยสลาย alkane (C10–C35) ได้ 90-95% ในเวลา 10 วัน ส่วนในสภาวะไม่มีออกซิเจน สามารถย่อยสลาย *alkane* ได้ 20-25% นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbons ได้ 15-18%

จุลินทรีย์ในดินส่วนมากประมาณ 90 - 95 % เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยใช้ออกซิเจนเพื่อการหายใจและออกซิไดร์สารต่างๆ ทำให้การย่อยสลายและการเปลี่ยนแปลงของอินทรีย์วัตถุเป็นไปอย่างรวดเร็ว ในดินที่มีการหมุนเวียนของอากาศได้ดี กิจกรรมของจุลินทรีย์จะเกิดได้อย่างรวดเร็ว การหมุนเวียนของอากาศในดิน นอกจากจะมีผลต่อการย่อยอินทรีย์วัตถุของจุลินทรีย์แล้วยังเกี่ยวข้องกันการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของจุลินทรีย์ในดินอีกด้วย เพราะอากาศเป็นของผสมที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ การย่อยสลายน้ำมันในแหล่งน้ำต่างๆ โดยจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำมัน

โดยเฉพาะในปฏิกิริยาออกซิเดชันของจุลินทรีย์ ที่ต้องอาศัยเอนไซม์ออกซิจิเนส และสำหรับสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งน้ำนี้ ออกซิเจนจากอากาศสามารถที่จะสลายได้โดยตรง ทำให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อจุลินทรีย์สำหรับใช้ในการย่อยสลายน้ำมัน สภาพแวดล้อมบนบกนั้นพบว่า ปริมาณออกซิเจนในดินจะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ออกซิเจนจากอากาศได้ ชนิดของดินและปริมาณน้ำในดิน ทำให้สภาพบนบกนั้น ออกซิเจนจะเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับอัตราเร็วในการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ (บัญญัติ, 2532)

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมและอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการย่อยสลาย alkane ได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการออกซิเจนในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น aerobic type เจริญได้เฉพาะบริเวณที่มีออกซิเจนเท่านั้น microaerophile type เจริญได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ถ้ามีออกซิเจนมากจะเจริญช้าๆ anaerobic type เจริญได้ดีในที่ไม่มีออกซิเจน และ Facultative anaerobic type เจริญได้ทั้งสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแปลงระบบเมตาบอลิซึมของตนเองได้ Farinazleen (2004) ได้คัดเลือก *Bacillus* และ *Pseudomonas* spp. จากดินที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อน พบว่าสามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 150 rpm

อย่างไรก็ตามพบว่าความเร็วรอบที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (ภัณฑิรา, 2548; Mukherji S. *et al.*, 2003)

5.4 % NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีของแต่ละเชื้อมาจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 ml ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 hrs วัดปริมาณเชื้อจากค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 แต่ละขวดอย่างน้อย 2 ซ้ำ เลี้ยงเชื้อ KS21, KS30, KS37, SA 11/4, SA 6/3 ที่ pH 8.5 และ Pw27/1, Pw3/2 ที่ pH 9.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ยกเว้น KS21 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm และเติม NaCl 0.5, 1.0, 2.0 % บ่มเป็นเวลา 48 hrs วัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ขณะเดียวกันก็นำเชื้อที่วัดค่า OD=0.5 ไปเกลี่ย(spread plate) บนอาหารแข็ง NA เพื่อสังเกตลักษณะการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ % NaCl แตกต่างกัน

ลำดับ	ไอโซเลต	ค่า OD_{600}		
		0.5 % NaCl	1.0 % NaCl	2.0% NaCl
1	KS21	1.094	1.133	1.160
2	KS30	1.137	1.125	1.055
3	KS37	0.659	0.697	0.614
4	Pw3/2	0.745	0.785	0.825
5	Pw27/1	1.199	1.082	1.019
6	SA 11/4	1.235	0.898	0.954
7	SA 6/3	0.885	0.894	0.981

จากตารางที่ 11 เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ 0.5 ถึง 2.0 % NaCl ทั้งเชื้อที่มาจากแหล่งน้ำและดินธรรมชาติ และจากแหล่งดินปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเค็มแตกต่างกัน บางชนิดอาจเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเค็มมาก แต่บางชนิดอาจเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเค็มเพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mukherji (2003) ที่ได้คัดแยก ES1จากบริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อน ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มี NaCl 0.5% และสามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลได้สูงสุด 61% เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน

การย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสภาพที่มีความเค็มสูง เมื่อเติมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนลงไปในตัวอย่างจากน้ำทะเลสาบ Great salt and Great salt lake ที่มลรัฐ Utah ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ระดับความเค็มต่างๆ (ตั้งแต่ 3.3 -28.4 %) พบว่าอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะลดลง เมื่อระดับความเค็มของน้ำสูงขึ้น โดยที่อัตราการย่อยสลายจะไม่สัมพันธ์กับปริมาณของออกซิเจนที่มีอยู่ต่ำ และปริมาณของสารอินทรีย์ต่างๆ และยังพบว่าในสภาพที่มีจุลินทรีย์ปริมาณสูงจะสามารถใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนได้พอสมควร โดยความเค็มของน้ำทะเลต้องไม่เกิน 20 % (Ward and Brock, 1978)

จากการศึกษา ของ Hitoshi *et al.*, 2008 พบว่า ความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมัน turbine (TuO) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมหลักคือ cycloalkanes และ isoalkanes ซึ่งได้

รับมาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแหล่งน้ำมันที่นำกลับมาปรับปรุงให้ดีขึ้น เมื่อกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชื่อ Atsuta A ถูกเพาะเลี้ยงในสารละลายเกลือเจือจางที่ 0.5% (w/v) TuO จะเกิดการย่อยสลาย 90%

S. Khodijah *et.al.*, 2004 พบว่า แบคทีเรียจำนวนมากที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนยังคงมีชีวิตอยู่ในบริเวณทะเลประเทศญี่ปุ่น กระบวนการบำบัดรักษาด้วยชีวภาพจะเกิดขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของการต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (DO: 1–6 mg/l; Eh:12–300 mV) และเงื่อนไขของความเป็นกลางจนถึงความเป็นด่าง (pH 6.4–8) ด้วย NaCl ความเข้มข้นที่ 3–15% (ECs of 45–200 mS/cm)

อย่างไรก็ตามพบว่า % NaCl ที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (ภัณฑิรา, 2548; Mukherji S. *et al.*, 2003)

สรุปผลการทดลอง

จากผลการเก็บตัวอย่าง พบตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถจากตัวอย่างดินและน้ำ ในบริเวณน้ำพุร้อนจำนวน 30 ไอโซเลต เป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 22 ไอโซเลต และจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน 8 ไอโซเลต และพบจำนวนจุลินทรีย์จากป่าบ้านโป่ง จำนวน 39 ไอโซเลต (SA1-SA39) จากห้วยโจ้ จำนวน 40 ไอโซเลต (PW1-PW40) และแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว สามารถแยกเชื้อได้ 45 ไอโซเลต (KS1 – KS45) โดยวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดิน ด้วย Dilution techniques (McCourt, 1988) จากนั้น นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์ จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ มาทดสอบการย้อมสีแบบแกรมด้วยเทคนิค Gram's staining (McCourt, 1988) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย SA1-SA39 ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 35 ชนิดและแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด มีรูปร่างท่อน 20 ชนิด และรูปร่างกลม 19 ชนิด และ พบว่า Pw1ติดสีแดงของ safranin มีรูปร่างแบบท่อน Pw13 ติดสีม่วงของ crystal violet มีรูปร่างท่อน ส่วน Pw27 และเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออีก 37 ชนิด ติดสีแดงของ safranin มีรูปร่างกลม ในขณะที่ KS1 – KS45 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกติดสีม่วง(crystal violet) รูปร่างท่อน 4 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง(safranin) รูปร่างกลม 4 ชนิด และรูปร่างท่อน 37 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง(safranin) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huy *et al.* (2007) มีการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำมันปิโตรเลียมจากดิน พบว่า สายพันธุ์ DW2-1 ที่นำมาจำแนกการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีพบว่า มีรูปร่างท่อน และอยู่ในแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ ศุภยางค์ (2547) จุดประสงค์ของการย้อมสีเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียติดสีซึ่งทำให้เห็นได้ง่ายในการศึกษารูปร่าง (shape) ขนาด (size) การเรียงตัวของเซลล์ (cell arrangement) และโครงสร้างต่างๆ ของเซลล์

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำมันได้โดยวิธี Partition gravimetric method และ วิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันในกลุ่ม ไฮโดรคาร์บอนด้วยกระบวนการทางชีวเคมี คือ การทดสอบแอคติวิตีของเอ็นไซม์ไลเปส ในเบื้องต้นพบจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายน้ำมัน จำนวน 7 ไอโซเลต

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต ของ SA11/4, SA6/3 จากแหล่งดินธรรมชาติ และ Pw3/2, Pw27/1 จากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีค่าดังนี้ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 8.5 - 9.5, อุณหภูมิ 37 - 40°C, ความเร็วรอบของการให้อากาศ 150 rpm, และ% NaCl 0.5 ถึง 2.0% ตามลำดับ พบว่าเชื้อทั้งหมดคือ *Acinetobacter* sp.

จากการเปรียบเทียบ % การย่อยน้ำมัน จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนมี % การย่อยน้ำมัน มากกว่าแบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งน้ำและแหล่งดินธรรมชาติ แต่ในการทดสอบการย่อยน้ำมันโดยวิธีการหากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี Colorimetric แบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งน้ำและแหล่งดินธรรมชาติมีค่ามากกว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพเริ่มต้นของการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยแบคทีเรียจากแหล่งดินที่ปนเปื้อน และประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มาจากแหล่งธรรมชาติในการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วในการย่อยระดับโมเลกุลต่อไป ดังข้อมูลตารางที่ 12

ตาราง 12 สรุปคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ปัจจัยต่างๆ

ไอโซเลต	สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย				% การย่อยน้ำมัน	การทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรีย	
	ค่ากรด – ด่าง	อุณหภูมิ (°C)	ความเร็วรอบ	% NaCl		ไตเตรท (U/ml.)	Colorimetric method (U/ml.)
KS21 *Bacillus thuringiensis*	8.5	37 - 40	200	2.0 %	95.45	4.17	0.48
KS30 *Bacillus*	8.5	37 - 40	150	0.5 %	95.45	5.67	0.53

ไอโซเลต	สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย				% การย่อยน้ำมัน	การทดสอบการย่อยน้ำมันของแบคทีเรีย	
	ค่ากรด – ด่าง	อุณหภูมิ (°C)	ความเร็วรอบ	% NaCl		ไตเตรท (U/ml.)	Colorimetric method (U/ml.)
thuringiensis							
KS37 *Lysinibacillus boronitolerans*	8.5	37	150	1.0 %	77.27	6.67	1.01
Pw3/2 *Acinetobacter* sp.	9.5	37	150	2.0 %	-	3.21	1.31
Pw27/1 *Acinetobacter* sp.	9.5	37 - 40	150	0.5 %	-	3.60	1.47
SA 11/4 *Acinetobacter* sp.	8.5	37	150	0.5 %	80.75	3.29	0.72
SA 6/3 *Acinetobacter* sp.	8.5	37	150	2.0 %	51.42	2.66	1.30

เอกสารอ้างอิง

กรรณิกา วิจิตรไพบูลย์สุข. 2541. **การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

กัลยา ประไพนพ. 2544. **การคัดเลือกเอ็นไซม์ไลเปสจากยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดอกไม้**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.geocities.com/yayajang/background.htm (18 พฤศจิกายน 2551)

จีรศักดิ์ หงส์เลิศพิภพ. 2537. **การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วของแบคทีเรียที่เลือก 5 ชนิดที่สภาพปัจจัยต่าง ๆ**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โครงการเพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับสารเคมีและสิ่งแวดล้อมสำหรับเยาวชน. 2552. **น้ำมันเครื่อง**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.chemtrack.org/EnvForKids/chem-24.htm (23 มีนาคม 2552)

ณกัญภัทร จินดา และ ทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. 2549. **เอนไซม์ไลเปส : การผลิต และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://utcc2.utcc.ac.th/www/divisions/academicaffairs/journals/26th/May_Aug/theme7th.htm (18 พฤศจิกายน 2550)

มยุรี แก้วพิจิตร. 2548. **การเปรียบเทียบเชลล์อิสระกับเชลล์ที่ถูกตรึงโดยใช้ *Pseudomonas sp.* และ *Bacillus sp.* เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.bsru.ac.th/~sci/dept/biot/rubrong.doc (25 พฤศจิกายน 2551)

มหิดลวิทยานุสรณ์. 2550. **สารประกอบไฮโดรคาร์บอน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.mwit.ac.th/~supawade/link/CH40124_2.2549/text/HC.t.do (25 พฤศจิกายน 2551)

นลิน วงศ์ชัตติยะ และ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง. 2549. **คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา**. พิมพ์ครั้งที่ 5. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 76 น.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. **จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**. 558-560.

นฤมล ยอดวงค์. 2547. **การคัดแยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน**. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2532. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. โอเดียนสโตร. 173-181

ปิยะพรรณ ส้มยก. 2550. **การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ไพจิตรา กระแจเงิน. 2547. **การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อนที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

พรทิพพา อังคนุรักษ์พันธุ์. 2539. **การทำไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ TLS 63 ให้บริสุทธิ์ และการหาลักษณะเฉพาะ.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เพิ่มศักดิ์ กาญจนบุตร. 2550. **สารประกอบไฮโดรคาร์บอน.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.e-learning.sg.or.th/ac2_5/content1.3.html (12 ธันวาคม 2551)

ภัณฑิรา มาตยาบุญ. 2548. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียต่อการบำบัดน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.**ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

รัฐพร จันทร์เดช. 2541. **การแยกและเตรียมดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท สาขาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศรีสุดา ธรรมวิชุกร. 2552. **เทคนิค PCR-DGGE การวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม โดยใช้** 16S rRNA gene. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.thaiscience.com

วินัย แสงแก้ว. 2551. **บทที่ 4 คุณสมบัติทางกายภาพของดิน** (Soil Physic Properties) [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://krudaeng.wikispaces.com/%E0%B8%9A%E0%B8%97%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%88+4+%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B8%A0%E0%B8%B2%E0%B8%9E%E0%B8%82%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%94%E0%B8%B4%E0%B8%99?f=print (25 มีนาคม 2552)

วีระพงศ์ ดุลิตานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2552. **พื้นฐานเทคนิค** Polymerase Chain reaction.[ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://microbio.*md.kku.ac.th/site _data/mykku_ microbio /17/Basic_PCR_June_08.pdf* (23 มีนาคม 2552)

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2550. **จุลินทรีย์ในดิน.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rspg.org/microbiology/micro_01.htm(3 ธันวาคม 2551)

สมศักดิ์ วังใน. 2528. **จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัญชุลี สะอาดเอี่ยม. 2550. **การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งดินธรรมชาติที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและย่อยสลายน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว**. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

จรรถวุฒิ อิ่มพูลทรัพย์. 2541. **การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 45 น.

Aleksieva,Z., D.Ivanova., T.Godjevargova and B.Atanasor. 2002. process Biochem 37: 1215-9.

Antai S.P., 1990. Biodegradation of Bonny light crude oil by *Bacillus* sp. And *Pseudomonas* sp. Waste management.10:61-64.

Antai, S.P. 2003. Biodegradation of bonny light crude oil by *Bacillus* sp. and *Seudomonas* sp. Microbiol. 37 : 352-366.

APHA, AWWA, WEF (1998) **"Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater"** 20th Edition, American Pubilc Health Assoc., Wash. D.C, USA

Bento,F.M.,F.A.de.O.Camago,B.C.Okeke and W.T.Frankenberger Jr. 2004. Diversity of biosurfactant producing micoorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research** 160:249—255.

Brown,D.W.,Ramos,L.S.,Fieldman,A.J. and Macleod,W.D.1969. The formation and Stability of emulsion of water in crude petroleum and similar stocks,p. 35-39. In P.Hepple sea Scientific aspects of pollution of sea by oil, Institute of Petrolium.London.

Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons (Eds.); 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.** Williams and Wilkins Baltimore, MD, pp. 1–1246

Castro-OchaL.D., C.Rodrigomez-Gomez., G.Valerio-Alfaro and R.O.ROS. 2005. Screening purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by Bacillus Thermoleovorans CCR11. Enzyme microbiology 37: 648-654.

Chen L., T.coolbear and R.M.Daniel. 2004. Characteristics of prateinases and lipase produced by seven *Bacillus spp.*isolated from milk powder production lines. Dairy 14: 495-504.

D'Annibale A., G.Sermanni., F.Federici and M.Petruccioli. 2006. Olive – mill wastewaters apromising substrate for microbial lipase production. **Bioresour technologe** 97: 1828 -1833.

Davies,J.A. and Hughes,D.E. 1968. The biochemistry and microbiology of crude oil degration,p.139-144. In J.D.Carthy and D.E.Arthur (eds.), **The biological effect of oil pollution on literal communities** (supplement of Field Stud., vol.2.). E.W. classey,Ltd.,Hampton, Middesex, England.

De Renzo, DJ, Solvent Safety Handbook, Noyes Publications, **Park Ridge, NJ**,1986.

Dyer, JC, AS Vernick, and HD Feiler, Handbook of Industrial Wastes.145

Diaz MP., KG.Boyd., SJ.Grigson and JG.Burgess. 2000. Biodegration of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacteria consortion MP- M immobilized onto polypropylene fibers. **Biotechnlogy** 79:45-53.

Ertugrul,S., G.Donmez and S.Takac. Isolation of lipase producing Bacillus sp.from olive mill wastewater and improving its. **Enzyme activity** 149: 720-724.

Fadil K.,A. A.Chahlaoui,A, A.Ouahbi, A.Zaid and R.Boria. 2003. Aerbic biodegradation and detoxification of wastewater from the olive oil industry. **Biodeterior Biodegrad** 51:37-41.

Farinazleen Mohamad Ghazali, Raja Noor Zaliha Abdul Rahman,Abu Bakar Salleh and Mahiran Basri. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. Int. **Biodeter. Biodegrad.** 54 : 61-67.

Frédéric Chaillan, Anne Le Flèche, Edith Bury, Y-hui Phantavong, Patrick Grimont, Alain Saliot, and Jean Oudot. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**. 155: 587–595

Ghanem E.M., H.A.Al – Sayed and K.M.Saleh. 2000. An alkalophilic thermostable lipaseProduced by a new isolate of Bacillus alcalophilus. World **Journal Microbiology Biotechnol** 16:459-464.

Grishchenkov V.G., Townsend R.T., McDonald T.J. , Autenrieth R.L.,Bonner J.S.and Boronin A.M. 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. **Process Biochemistry**. 35 : 889–896

Gupta S., Yogesh, S.Javiya, M. Bhambi, C.S. Pundir, K.Sigh and A.Bhattachaya. 2008. Comparative study of performances of lipase immobilized asymmetric polysulfone and polyether sulfone membranes in olive oil hydrolysis. International of Biological Macromolecules 42:145-151.

Hao Ruixia., Lu Anhuai. and Zeng Yishan., 2004. Effect on crude oil by thermophilic bacterium, Journal of Petroleum Science and Engineering. 43 : 247 – 258.

Harayama s., Kok M., and E.L.Neidle. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu.Rrv. Microbiol. 46:565-601.

Holme, D.J and Peck, H.1993. Separation Method, in : Analytical Biochemistry, 2 nd ed., Longman Scientific & Technical, England, pp. 141.

Hollaway,S.L., Fax, G.M. and Sizemore, R.K.1980. The bacterial community composition of an active oil field in the Northwestern Gulf of Maxico. Pollut. Bull. 11:153-156.

Hibernation nodate. 2009. [online] http://www .brookscole. com/chemistry_ d/templates /student_resourc es/0030244269_campbell/HotTopics/Hibernation.html (10 มีนาคม 2552).

Hitoshi Itoa, Reia Hosokawab, Masaaki Morikawaa and Hidetoshi Okuyama. 2008. A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics. International Biodeterioration & Biodegradation 61. 223–232

Jeganathan J., A. Bassi, G. Nakhla.2006. Pre-treatment of high oil and greasepet industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation.J.Hazard.Mater. 137:121-128. 49.

Kim H.K., H.J.Choi, M.H.kim, C.B.sohn and T.K.0h.2000 .Expression and characterization Ca^{2+} independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. Biochim Biophys 1583:205- 212.

LanciottiR., A.Gianotti, D.Baldi, R.Angrisani, G.Sozzi, D.mastrocala and M.E.Guerzoni. 2005. Use of Yarrowia lipolytica strains for the treatment of olive mill wastewater. Bioresour Technology 96:317-322.

Lindsay D., V.S.Brozel, J.F.mostert and A.Von Holy. 2000.physiology of dairyassociated *Bacillus spp.*over awide pH range. Food microbiology 54:49-62.

Mahmoud, M.B. and Alexander, S. 2000. Microbial Degradation of the Mutiply Branched Alkane 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosane(Squalane) by Mycrobacterium fortuitum and Mycrobacterium ratisbonense. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 : 4462-4467.

McCourt, R.M. 1988. Laboratory Manual to Accompany. **Biology Random House.**, Inc USA. P 167.

Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American** April 56-65

Nadarajah N. and O.P.Award0. 2002.De-emulsification of pertroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. **Process biochem** 37:35-41.

Rahman K.S.M. , Thahira-Rahman J. and Banat I.M., 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**. 85:257–261.

Rosenberg E., and E.Z. Ron. 1997. Bioemulsans:microbial polymeric emulsifiers. **Curr.Opin. Biotechnol** 8: 313–316.

PTT. 2008. **MATERIAL SAFETY DATA SHEET. [online]** http://pttweb2.pttplc.com/weblub/Files/Lube/attach/139_MTRDS.pdf (25 March 2009)

Saisuburamaniyan N.,L. Krithika, K.P. Dileena,S. Sivasubramanian, and R. Puvanakrishnan. 2004. Lipase assay in soils by copper soap colorimetry. **Analytical Biochemistry [online]** 330 (2004) 70–73.

Savapom Supaphol, Supamard Panichsakpatana, Savitr Trakulnaleamsai, Nipon Tungkananuruk, Pinnapar Roughjanajirapa, Anthony Gerard O'Donnell. 2006. The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils. **Journal of Microbiological Methods.** 65:432– 441

Schaefer,M , F.Juliane. 2006. The influence of earthworms and organic additives on thebiodegradation of oil contaminated soil. **applied soil ecology** 36 : 53 – 62.

S. Khodijah Chaeruna,, Kazue Tazakib, Ryuji Asadab, Kazuhiro Kogure. 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oilspill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. **Environment International.** 30:911 – 922.

Sorkhoh,N.A., A.S.Ibrahim, M.A.Ghannou, and S.S.Radwan. 1993. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert. **Appl. Microbiol. Biotech.** 39:123-126.

Suparna Mukherji, Sheeja Jagadevan, Gita Mohapatra, Avinash Vijay. 2004. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field. **Bioresource Technology** 95: 281–286.

Tano-Debrah K., Fukuyama S., Otonari N., Taniguchi F.,Ogura M., 2000. An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils, Japan **Aquatec Co. Ltd**, 339-41 Kojima, Kosaza-cho, Kitamatsuura-gun, Nagasaki-ken 857-0401, Japan.

Tomohisa, K. and Misuru H. 2001. Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* for deep subterranean petroleum reservoirs. **Appl. Environ. Microbiol.**

Ward, D.R. and Brock, T.D. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments . **Appl. Environ. Microbiol.**35:353-359.

Yang Y., Z Wang. 2002. Oilfield produced water treatment with suface modified fiber ball Media filtration. **Science Technology** 46:165-170.

Yoshiki Matsumiya, Daisuke Wakita, Akishige Kimura, Sirilak Sanpa, and Motoki Kubo. 2007. Isolation and Characterization of a Lipid-Degrading Bacterium and Its Application to Lipid-Containing Wastewater Treatment. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Vol. 103, No. 4, 325–330.