



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2555

การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย
น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

**Isolation and Screening of Waste Lubricating Oil-
Degrading Microorganisms**

ดร. วิชุดา กล้าเวช

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

ธันวาคม 2556

รหัสโครงการ 2555A10562006

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย
น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

**Isolation and Screening of Waste Lubricating Oil-
Degrading Microorganisms**

ดร. วิชุดา กล้าเวช

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2555

ขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณที่สนับสนุนด้านสถานที่ และห้องปฏิบัติการสำหรับดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณนิสิตสาขาวิชาชีววิทยา และนิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่ร่วมแรงร่วมใจเป็นคณะทำงานวิจัยในการลงพื้นที่เก็บตัวอย่าง และทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

Isolation and Screening of Waste Lubricating Oil-Degrading Microorganisms

ชื่อผู้วิจัย วิชุดา กล้าเวช

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยทำการเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอน จำพวกน้ำมันดิบ (Crude oil) และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Waste lubricating oil, WLO) ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 56 ไอโซเลทที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร MSM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยเป็นเชื้อแบคทีเรีย 38 ไอโซเลท และเป็นเชื้อยีสต์ 18 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลทซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยแบคทีเรียไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท WK1 WK2 WK3 WK4 และ WK5 และเชื้อยีสต์ 1 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท WK6 แล้วนำจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทไปจำแนกโดยการหาลำดับดีเอ็นเอ ผลของลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งพบว่า เชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีรูปร่างค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น เป็นมันวาว มีทั้งขอบโคโลนีแบบเรียบ หยัก และแบบกระสวย เมื่อนำมาขยี้มสีแกรมแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ WK1 เป็นแบคทีเรียท่อนยาว ดิคลีแกรมบวก WK2 เป็นแบคทีเรียท่อนยาว ดิคลีแกรมบวก WK3 เป็นแบคทีเรียท่อนสั้น ดิคลีแกรมบวก สร่างสปอร์ และ WK4 เป็นแบคทีเรียท่อนสั้น ดิคลีแกรมบวก สร่างสปอร์ และอีก 1 ไอโซเลท คือ WK5 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนั้นลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ WK6 บนอาหารแข็ง YM เป็นยีสต์รูปร่างไข่ มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ ซึ่งจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันทางอนุโมเลกุล ด้วย 16S rDNA พบว่า WK1 คือ *Bacillus cereus* WK2 คือ *Bacillus altitudinis* WK3 คือ *Bacillus amyloliquefaciens*, WK4 คือ *Bacillus subtilis* WK5 คือ *Serratia* sp. และการพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันทางอนุโมเลกุล ด้วย 26S rDNA WK6 คือ *Issatchenkia orientalis* นอกจากนั้นยังได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของ

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี weight loss ผลการทดลองพบว่าในอาหาร BSM ที่เดิม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที จากนั้นวัดค่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ผสมเจริญได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว กล่าวคือ เชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีค่า weight loss เท่ากับร้อยละ 52.60 อีกทั้งเมื่อนำส่วนใสที่ได้จากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม มาทดสอบคุณสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) โดยทดสอบสมบัติของการเป็นสารลดแรงผิวด้วยวิธี Oil Displacement Area test (ODA) พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีการผลิตสารลดแรงผิวชีวภาพ เพราะสามารถทำให้น้ำมันดิบชนิด Weathered crude oil เกิดการกระจายน้ำมันมีพื้นที่ 11 ตารางเซนติเมตร ในขณะที่ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟค์เออร์ชีวภาพ (Bioemulsifier) ต่อน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันก๊าด (kerosene) น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีความสามารถในการสร้างสารอิมัลซิไฟค์เออร์ชีวภาพกับน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุด กล่าวได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ผสมนี้ไม่เพียงแต่จะสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว แต่ยังผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้อีกด้วย เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้มาประยุกต์ใช้ในชุดการทดลองที่ 1 คือ दिनที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 จากนั้นเติมกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จากวันเริ่มต้น ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 คือ दिनที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 แต่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วน้อยมาก ส่วนชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ใช้ दिनที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ผลการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน दिनทั้ง 4 ชุดการทดลอง ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี weight loss ผลการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่ 1 ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุด คือร้อยละ 48.67 รองลงมาได้แก่ชุดทดลองที่ 4 ซึ่งใช้ दिनไม่ฆ่าเชื้อแล้วเติม เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุดร้อยละ 41.33 ในขณะที่ชุดควบคุม คือชุดการทดลองที่ 2 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้เท่ากับร้อยละ 16.50 จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าสามารถนำเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนมาประยุกต์ใช้ในการจัดการสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

Abstract

This research aims to isolate and screen microorganisms that capable degrading hydrocarbons which contaminated in environment. The hydrocarbons such as crude oil and weathered crude oil contaminated soil samples were collected from lower Southern region including Nakhonsrithammarat, Phatthalung and Songkhla Provinces. The result showed 56 isolates (38 bacteria and 18 yeasts) that can grow in MSM medium containing 1 percent Waste Lubricating Oil (WLO) as a carbon source. In addition, 6 selected isolates can degrade WLO more than 50 percent. 5 bacteria strains, namely WK1, WK2, WK3, WK4 and WK5 whereas 1 yeast strain, namely WK6 were identified by morphology and DNA sequencing analysis. The result of morphology of colonies on agar medium showed round shape, off white color, shiny and smooth, wavy and shuttle with margin. When Gram staining and view under compound microscope, the result indicated WK1 and WK2 are long rod whereas WK3 and WK4 are short rod and produce endospores. All of 4 strains (WK1, WK2, WK3 and WK4) are Gram positive but WK5 is negative Gram and short rod. Moreover, WK6 is a yeast strain. It has oval shape and reproduction by budding. The identification result of 6 selected strains, WK1, WK2, WK3 WK4, WK5 and WK6 were indicated *Bacillus cereus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Serratia* sp. and *Issatchenkia orientalis*, respectively. The factors effecting for hydrocarbon degradation were also studied by the selected consortium microorganisms with weight loss method. The result of optimum condition for the WLO degradation the consortium contained 10% WLO as a carbon source, 3 g/L ammoniumsulfate as a nitrogen source with an initial pH 7.0. When they were cultivated in this medium in shake-flask (50 ml medium in 250 ml flask) at 150 rpm and 37°C, it showed maximum growth and the highest degrading activity was at the 52.60% weight loss at 48 h. In addition, the consortium can produce biosurfactant. Determination of Oil Displacement Area test (ODA), the result showed area of displacement as 11 cm². Emulsification activity (%EA) of supernatant with kerosene, soy bean oil, palm oil or rice bran oil, the result exhibited the best %EA with rice bran oil. From these results, the consortium not only can degrade WLO but also produce biosurfactant. The consortium was used for bioremediation of WLO-contaminated soil. They had 4 treatments, treatment 1 abiotic treatment (sterile waste lubricating contaminated soil + 10% WLO +consortium), the result of treatment 1 showed the amount of WLO-degrading microorganisms was increased from 0 day while

treatment 2 abiotic treatment (sterile waste lubricating contaminated soil + 10% WLO), exhibited the lower amount of WLO-degrading microorganisms than treatment 1 whereas treatment 3 and 4 were biotic treatment. The result of treatment 3 and 4 exhibited amount of WLO-degrading microorganisms were decreased. Finally, the application of the selected consortium to WLO degradation of the 4 experiments showed treatment 1 was the high potential, 48.67% weight loss followed by treatment 4 which had 41.33% weight loss while the control, treatment 2 was 16.50% weight loss. The conclusion of this research showed that this selected consortium which isolated from hydrocarbon contaminated soil can apply in xenobiotic contaminant effectively management and environmental friendly.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(2)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(4)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(10)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย	4
1.5 ขอบเขตการศึกษา	5
1.6 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ	5
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 การกำจัดการประกอบไฮโดรคาร์บอน	7
2.2 กระบวนการย่อยสลายและการบำบัดสารย่อยสลายยากโดยชีววิธี	9
2.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน	12
2.4 การย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์	16
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ของจุลินทรีย์	19
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	26
3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี	26
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	27
3.2.1 วิธีวิเคราะห์	27
3.2.2 การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันดิบและน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และ/หรือประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิว	28

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย (ต่อ)	
3.2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ ที่คัดเลือกได้	29
3.2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และ/หรือประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยเชื้อจุลินทรีย์ ผสมที่คัดเลือกได้	29
3.2.5 ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดและบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในพื้นที่จำลองดินที่มีการปนเปื้อน น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว	32
3.2.6 การวางแผนการทดลองการวิเคราะห์ผลทางสถิติ	34
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
4.1 การแยกและคัดเลือกรูปร่างที่สามารย่อยสลายน้ำมันดิบ และ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว	35
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ ที่คัดเลือกได้	38
4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและ/หรือ ประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้	41
4.4 ประสิทธิภาพในการกำจัดและบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดย เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในพื้นที่จำลองดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว	50
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	52
บทที่ 6 ผลผลิต	56
รายงานการเงิน	57
บรรณานุกรม	59
ประวัตินักวิจัย	62

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แบบที่เรียในดินที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน	12
2 กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs	14
3 กลุ่มของเชื้อราที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สารประกอบ PAHs	15
4 กลุ่มของสาหร่ายเซลล์เดียวและไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ PAHs	15
5 ชุดการทดลองประสิทธิภาพในการกำจัดและบำบัดสารย่อยสลายยากโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในพื้นที่จำลองดินประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้	33
6 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้	36
7 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	42
8 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร BSM ที่ปรับ pH เริ่มต้น 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	43
9 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	44
10 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	45
11 ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	46
12 กิจกรรมการเกิดอิมัลชันของส่วนใส (Culture supernatant) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ต่อตัวทำละลายต่างๆ	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
13 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในคืนวันที่ 30	51

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
2 การบำบัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์	17
3 วิธีการย่อยสลาย Aliphatic hydrocarbon	18
① = <i>n</i> -alkane monooxygenase, ② = alcohol dehydrogenase และ ③ = aldehyde dehydrogenase	
4 วิธีการย่อยสลาย Aromatic hydrocarbon	19
5 พื้นที่ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของสารย่อยสลายยากในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา	35
6 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000X (ขวา)	38
7 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000X (ขวา)	39
8 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000X (ขวา)	39
9 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000X (ขวา)	40
10 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000X (ขวา)	40
11 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร YM (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400X (ขวา)	41
12 ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่คัดเลือกได้ และประสิทธิภาพของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว	42
13 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ที่มีต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที	47
14 ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15 การทดสอบ Emulsification Activity (%EA) ที่เวลา 0 นาที (A) และที่เวลา 10 นาที (B)	49
16 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ที่ 0 และ 30 วัน ของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น	51
เครื่องย่นที่ใช้แล้วในดินของชุดทดลองต่างๆ	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ภาวะมลพิษในสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนและการสะสมของสารเคมีและของเสียอันตรายกำลังเป็นปัญหาใหญ่ของประเทศต่างๆ ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การตกค้างและปนเปื้อนสารมลพิษในสิ่งแวดล้อมเกิดจากการผลิตและใช้ในปริมาณสูงในอุตสาหกรรม เกษตรกรรม การบริโภค อุปโภค และการประกอบกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ รวมถึงเหตุการณ์ภัยพิบัติที่เกิดจากธรรมชาติเมื่อเร็วๆ นี้ ที่เมืองฟูกูชิมะ ประเทศญี่ปุ่น ด้วยกิจกรรมต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นทำให้สารเคมีหรือสารมลพิษรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อม เช่น การเกิดอุบัติเหตุของเรือบรรทุกน้ำมันซึ่งเป็นสาเหตุการรั่วไหลและปนเปื้อนของน้ำมันและไฮโดรคาร์บอนในทะเล การเกิดแผ่นดินไหวส่งผลให้เตาปฏิกรณ์นิวเคลียร์ระเบิดทำให้เกิดการรั่วไหลของสารกัมมันตภาพรังสีออกสู่ดิน น้ำ และบรรยากาศ เป็นต้น และล่าสุดกับเหตุการณ์ท่อส่งน้ำมันของบริษัทพีทีทีจีซีรั่ว ส่งผลให้น้ำมันดิบรั่วไหลลงสู่ทะเลที่อำเภอพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง แล้วกระจายตัวจนพัดเข้ามาปนเปื้อนที่ชายหาด และโขดหิน การย่อยสลายและบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเหล่านี้สามารถทำได้โดยใช้กระบวนการทางกายภาพ เช่น การเผา และการฝังกลบ เป็นต้น กระบวนการทางเคมี เช่น การทำให้สารมลพิษเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้สารมลพิษตกตะกอน และถูกสกัดแยกออกจากสิ่งแวดล้อมได้ และกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นการจัดการสารมลพิษโดยอาศัยความสามารถของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ จุลินทรีย์ และพืชที่มีความสามารถในการย่อยสลายและ/หรือบำบัดสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม กระบวนการทั้ง 3 ข้างต้นมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม เมื่อคำนึงถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างและ/หรือภายหลังการย่อยสลายและการบำบัด รวมทั้งการยอมรับของประชาชนแล้ว การย่อยสลายและบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนโดยชีววิธี (Biodegradation and Bioremediation) ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ และ/หรือพืชในการย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปสารมลพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดไป จัดว่าเป็นกระบวนการที่มีความเสี่ยงต่ำและก่อให้เกิดผลกระทบด้านลบน้อยกว่ากระบวนการอื่นๆ ดังนั้นในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันการย่อยสลายและบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนโดยชีววิธีจึงเป็นวิธีที่นำมาประยุกต์ใช้มากขึ้นในประเทศต่างๆ ทั่วโลก สำหรับประเทศไทย หลักการและเทคนิคการย่อยสลายและบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธีนี้จัดเป็นเทคโนโลยีใหม่ (อลิสรา, 2553) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นตัวการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant) ซึ่งใช้เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ สารทำให้เกิดฟอง ตัวทำละลาย และสารลดความหนืด รวมทั้งมีการใช้ใน

สิ่งแวดล้อมมากขึ้น เช่น ใช้ขจัดคราบน้ำมันและสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำและดิน โดยใช้สาร Rhamnolipid จากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. Surfactin จาก *Bacillus subtilis* Emulsan จาก *Acinetobacter* sp. และ Glycolipid จาก *Rhodococcus* sp. เป็นต้น จะเห็นได้ว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่หลากหลายเพื่อใช้ในการขจัดคราบน้ำมันทดแทนการใช้สารเคมี ทั้งนี้เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradability) ได้ง่าย และไม่เป็นอันตราย (สอิจ, 2542) นอกจากนี้ Vasudevan and Rajaram (2001) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้เทคนิค Bioaugmentation พบว่าการเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40 หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 90 วัน และเมื่อเติมสารอาหารอนินทรีย์ร่วมกับการเติมกล้ำเชื้อจะให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายร้อยละ 65 อีกทั้งจากการคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วบริเวณอู่ซ่อมรถและปั้มน้ำมันในเขตจังหวัดนครราชสีมา สุราษฎร์ธานีและสงขลาโดยวิธี enrichment culture ในอาหาร mineral salt medium (พีเอช 7.0) ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40 เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาศึกษาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเท่ากับร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับร้อยละ 40.46 (จิตติมา, 2551)

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ หรือเชื้อจุลินทรีย์ผสมนั้นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีกว่าจุลินทรีย์เดี่ยว จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกจากดินบริเวณพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารย่อยสลายยาก จำพวกไฮโดรคาร์บอน น้ำมันดิบ และ/หรือน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และ/หรือสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารมลพิษที่ปนเปื้อนในดิน เมื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายและบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนโดยชีววิธีแล้ว จะมุ่งเน้นนำเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ในแบบจำลองดินที่มีการปนเปื้อนสารมลพิษในระดับห้องทดลอง (Lab scale) ได้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้และ/หรือสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

1.2.2 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

1.2.3 ประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในแบบจำลองดินที่มีการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนในระดับห้องทดลอง (Lab scale)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

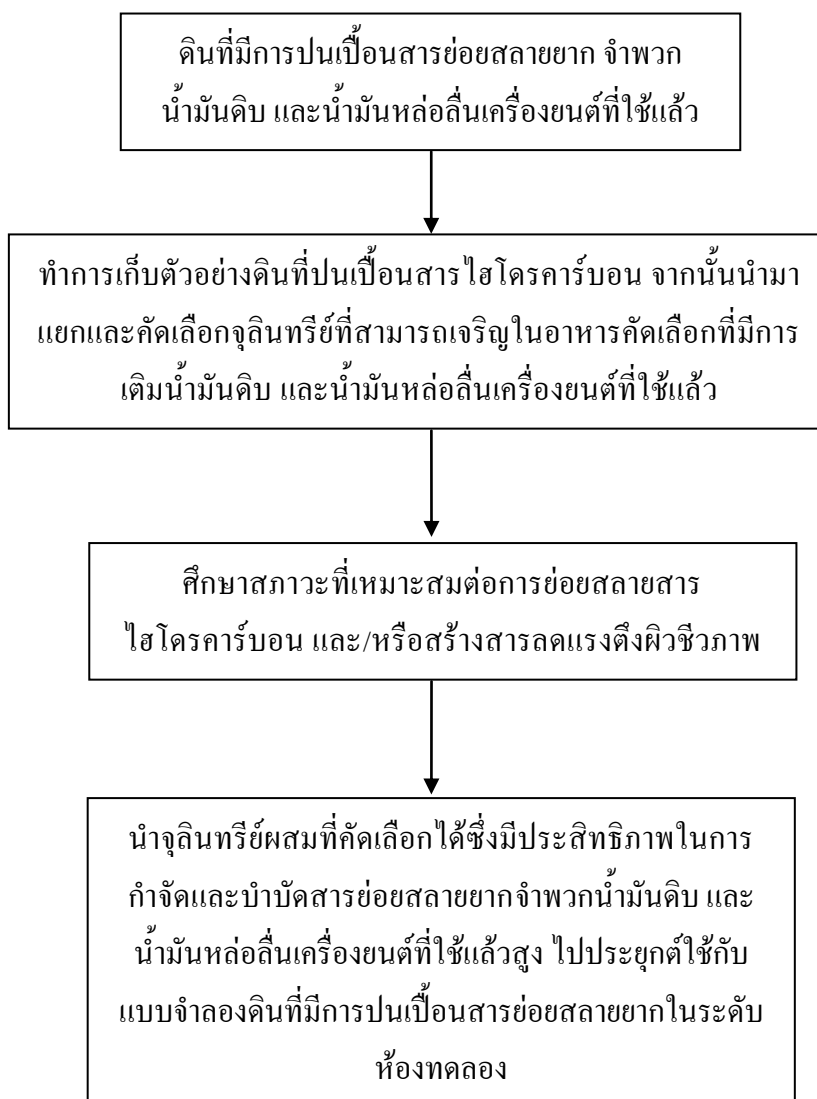
1.3.1 ทราบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่แยกได้จากดินที่สามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้และ/หรือสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

1.3.2 ทราบสถานะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

1.3.3 สามารถประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในแบบจำลองดินที่มีการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนในระดับห้องทดลอง (Lab scale)

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย

สมมุติฐานงานวิจัย : จุลินทรีย์ที่แยกและคัดเลือกจากดินที่ปนเปื้อนสารย่อยสลายยาก จำพวกน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว น่าจะมีศักยภาพในการกำจัดและบำบัดสารย่อยสลายยากดังกล่าว นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ควรสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม รวมถึงสามารถนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไปประยุกต์ใช้ในระดับห้องทดลองได้



ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

1.5 ขอบเขตการศึกษา

ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธี enrichment culture ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ โดยเก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา จากนั้นนำไอโซเลทที่แยกได้มาศึกษาลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์และลำดับดีเอ็นเอ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารดังกล่าวในดินโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ โดยศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยทำการวิเคราะห์ผลการย่อยสลายน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยวิธีการคำนวณหาน้ำหนักที่หายไป (Weight loss) ทดสอบคุณสมบัติการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดและบำบัดสารย่อยสลายซากดังกล่าวในแบบจำลองดินในระดับห้องทดลอง (Lab scale)

ตัวอย่างดิน และน้ำที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

ขอบเขตพื้นที่ ได้แก่ เขตพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา

ขอบเขตเวลา ทำการศึกษาและวิเคราะห์เป็นเวลา 1 ปี (เริ่มตั้งแต่การอนุมัติโครงการ)

1.6 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

ประเด็นที่ทำการศึกษา	เดือน												ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1. ทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อมาคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารย่อยสลายซาก และ/หรือสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ													ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารย่อยสลายซาก และ/หรือสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดและบำบัดสารย่อยสลายซาก โดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้													ทราบสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดและบำบัดสารย่อยสลายซาก
3. การประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้มากำจัดและบำบัดสารย่อยสลายซากในพื้นที่จำลองซึ่งมีการปนเปื้อนของสารย่อยสลายซากของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้													ทราบศักยภาพในการกำจัดและบำบัดสารย่อยสลายซากในพื้นที่จำลองซึ่งมีการปนเปื้อนของสารย่อยสลายซากของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ประเด็นที่ทำการศึกษา	เดือน												ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
4. ทำการรวบรวมข้อมูลทั้งหมดพร้อมวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูล													จัดการข้อมูลและประมวลผลข้อมูลที่ได้จากการเก็บข้อมูลทุกขั้นตอน จากนั้นทำการสรุปและอภิปรายผล รายงานฉบับสมบูรณ์
5. ดำเนินการเขียนงานวิจัยเพื่อนำข้อมูลผ่านการวิเคราะห์และสังเคราะห์มาเป็นฐานข้อมูลสำหรับวางแผนการเผยแพร่ต่อไป													
6. นำเสนองานวิจัยฉบับสมบูรณ์													งานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เพื่อเผยแพร่ข้อมูลต่อไป

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

การกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้หลายวิธีตามความเหมาะสมของแต่ละพื้นที่ โดยปกติแล้วสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลักคือ

1) วิธีการทางกายภาพ (Physical method)

เป็นวิธีการควบคุม กำจัด และเก็บกวาดคราบน้ำมันด้วยกลวิธีหรืออุปกรณ์เครื่องมือ อุปกรณ์แต่ละชนิดมีหลักการและประสิทธิภาพในการทำงานแตกต่างกัน และในบางพื้นที่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือมากกว่า 1 ชนิด มาปฏิบัติงานในลักษณะผสมผสานกัน ซึ่งประกอบด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1.1) การเติมอากาศ เป็นการเพิ่มออกซิเจนละลายในน้ำให้มีปริมาณสูงขึ้น อาจใช้แอร์เจท (Air jet) หรือกังหันสำหรับวิดน้ำ

1.2) Soil vapor extraction เป็นวิธีบำบัดโดยการดูดสารไฮโดรคาร์บอนที่ระเหยได้ออกจากดิน ซึ่งการบำบัดจะได้ผลดีในดินที่มีความพรุนสูง ดังนั้นดินที่มีความพรุนต่ำหรือแน่นทึบสามารถเพิ่มความพรุนและรอยแตกร้าวด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การใช้น้ำหรืออากาศความดันสูงอัดลงในชั้นดินเพื่อทำให้เกิดรอยร้าว เป็นต้น

1.3) การเผา เป็นวิธีบำบัดที่สามารถทำได้รวดเร็ว สามารถกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนได้หมดถึงร้อยละ 98 แต่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศและความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน

2) วิธีการทางเคมี (Chemical method)

เป็นการใช้สารเคมีกำจัด หรือลดปริมาณสารปนเปื้อน เช่น สารเคมีกำจัดคราบน้ำมัน (Oil dispersant) มีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) และตัวทำละลายบางชนิดยังมีส่วนผสมของสารที่สามารถควบคุมการแพร่กระจายของคราบน้ำมันที่แตกตัวในน้ำ โดยสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันจะทำให้ความแตกต่างของแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันลดลงจนแรงตึงผิวของน้ำมันใกล้เคียงกับน้ำ การนำสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันไปใช้โดยการฉีดพ่นลงบนคราบน้ำมันทำให้น้ำมันเกิดการแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายและนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้ (สมควร, 2545) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีและมีตัวทำละลายเป็นองค์ประกอบซึ่งย่อยสลายยากและเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (Healy *et al.*, 1996)

นอกจากนี้ยังมีการใช้โอโซนในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยโอโซนจัดเป็นสารออกซิแดนท์ (Oxidant) ที่รุนแรง เมื่อละลายอยู่ในน้ำจะเกิดการแพร่เข้าไปยังผิวและในรูพรุนของดินทำให้เกิดการออกซิไดส์ของ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ได้สารตัวกลาง (Intermediate) หรือผลิตภัณฑ์ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันของกรดคาร์บอกซิลิก ฟีนอล อัลดีไฮด์ และคีโตน ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่า PAHs และ Intermediate ที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกับโอโซนเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้หลายชนิดซึ่งสารผลิตภัณฑ์เหล่านี้สามารถย่อยสลายต่อไปโดยทางชีวภาพ

3) วิธีการทางชีวภาพ (Biological method)

วิธีนี้เป็นการใช้สิ่งมีชีวิตเช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์และสาหร่ายในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในกระบวนการเมแทบอลิซึมซึ่งต้องใช้เวลาในการย่อยสลายนาน ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายให้เป็นไปอย่างรวดเร็วจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิ ออกซิเจน ธาตุอาหารที่สำคัญเช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้เหมาะสม โดยจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะช่วยให้การย่อยสลายสามารถดำเนินไปได้อย่างรวดเร็ว จากการศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ (Jobson *et al.*, 1972)

3.1) การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Natural attenuation) เกิดจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสถานที่ปนเปื้อนสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยกระบวนการย่อยสลายจะเกิดอย่างช้าๆ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีจำนวนน้อยและสภาวะแวดล้อมอาจจะไม่เหมาะสม เช่น แหล่งไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสไม่เพียงพอ ความชื้น pH หรือปริมาณออกซิเจนไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน วิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนในกรณีที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันปริมาณมาก (Forsyth *et al.*, 1995)

3.2) การย่อยสลายโดยชีววิธี (Bioremediation) เป็นการปรับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ pH ความชื้นหรือการเติมสารอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ตลอดจนการใช้จุลินทรีย์ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจะเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนได้เร็วขึ้น โดยวิธีนี้สามารถแบ่งกว้างๆ ออกเป็น *ex-situ* Bioremediation หรือการนำดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนแล้วจึงดำเนินการบำบัดด้วยวิธีการทางชีววิธีต่างๆ และ *in-situ* Bioremediation หรือการบำบัดดินหรือน้ำบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยไม่นำดินหรือน้ำออกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อน ทำให้สามารถลดต้นทุนในการขนย้ายและลดปัญหาการแพร่กระจายหรือปนเปื้อนใน

ระหว่างการขนส่ง การเลือกวิธีในกระบวนการบำบัดจะขึ้นกับชนิดและปริมาณสารที่ปนเปื้อน หรือสภาพแวดล้อมที่เกิดการปนเปื้อน (อลิสสา, 2553)

2.2 กระบวนการย่อยสลายและบำบัดสารที่ย่อยสลายยากโดยชีววิธี

การใช้สารสังเคราะห์ต่างๆ ที่มนุษย์คิดค้นขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารพิษและกำจัดได้ยาก สารเหล่านี้เป็นสารที่มนุษย์สร้างขึ้นเรียกว่า Xenobiotic compounds ซึ่งเมื่อมีเหลือตกค้างอยู่ในสภาพแวดล้อมก็จะเกิดเป็นสารพิษปนเปื้อน หรือ Toxic pollutants ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ แต่ด้วยความสามารถพิเศษของจุลินทรีย์บางกลุ่มโดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลุ่มแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas* sp. ซึ่งมีความสามารถในการใช้สารอาหารได้มากมาย ทั้งสารปนเปื้อนในธรรมชาติประเภทสารอินทรีย์หรือ Organic pollutants รวมทั้ง Xenobiotic compounds ได้หลายชนิดเพื่อการเจริญ จึงได้มีการศึกษาทดลองเพื่อนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายสารพิษเหล่านี้ โดยมีการจัดการสภาวะต่างๆ เพื่อให้เกิดกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเรียกว่ากระบวนการย่อยสลายและบำบัดสารย่อยสลายยากโดยชีววิธี หรือ Biodegradation and Bioremediation

มีนักวิทยาศาสตร์ตั้งข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับการย่อยสลายหรือบำบัดสารย่อยสลายยากได้ของจุลินทรีย์ อาจเกิดด้วยวัตถุประสงค์ 2 รูปแบบ (เสาวนีย์, 2547) คือ

1. การย่อยสลายเพื่อนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์ โดยเซลล์จุลินทรีย์จะใช้สารปนเปื้อนที่ย่อยสลายยากเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึม

2. การย่อยสลายแบบ Comatabolism โดยจุลินทรีย์ใช้สารอาหารปกติทั่วไปเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ในขณะที่เดียวกันก็สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนที่ย่อยสลายยากได้ด้วย ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญ สารปนเปื้อนที่ย่อยสลายยากนั้นจะเรียกว่า Cosubstrate สำหรับกระบวนการ Comatabolism นี้ แม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไม่ถูกนำไปใช้สร้างความเจริญแก่จุลินทรีย์ก็ตาม แต่อาจถูกนำไปใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่อยู่ร่วมกันได้ ความสามารถในการเกิดกระบวนการ Comatabolism Transformation นี้จะขึ้นกับเอนไซม์ที่มีในจุลินทรีย์นั้นๆ และขึ้นกับสาร Co-factors

กระบวนการย่อยสลายสารย่อยสลายยากโดยจุลินทรีย์นี้เป็นกระบวนการกำจัดสารพิษหรือสารปนเปื้อนต่างๆ ที่ปลอดภัย เนื่องจากสารต่างๆ จะเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ และถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจนได้เป็นสารโครงสร้างง่ายๆ เช่น สารประกอบจำพวกคาร์บอนจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ส่วนสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์ จะถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรท (NO_3) แอมโมเนีย (NH_3) และซัลเฟต (SO_4) เป็นต้น ซึ่งสาร

เหล่านี้ไม่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในขณะที่กระบวนการกำจัดโดยวิธีการทางกายภาพมักจะเป็นการกำจัดโดยเพียงเปลี่ยนแปลงที่อยู่ของสารพิษนั้นหรือเปลี่ยนจากรูปแบบหนึ่งไปเป็นอีกรูปแบบหนึ่งเพื่อการทำลายโดยวิธีการเผาอื่นๆ ได้ง่ายขึ้นเท่านั้น

2.2.1 เทคนิคในการบำบัดสารย่อยสลายยากโดยชีววิธี

ซึ่งเทคนิคที่สำคัญและนิยมเลือกนำมาใช้มี 2 แบบด้วยกัน คือ

1) Biostimulation เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณสารอาหารจำกัดหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม โดยการเติมสารอาหาร เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส การเพิ่มปริมาณออกซิเจน การปรับความชื้นหรือ pH ให้เหมาะสมเพื่อกระตุ้นการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสถานที่ที่มีการปนเปื้อน (Iwamoto and Nasu, 2001) วิธีนี้จะอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่น การใช้เทคนิค Biostimulation โดยเติมสารอินทรีย์หรือปุ๋ยเคมีลงในสถานที่ปนเปื้อนจะสามารถส่งเสริมอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและมีบางรายงานพบว่าระดับความเข้มข้นของสารอาหารมีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ เช่น Braddock *et al.* (1997) พบว่าการเติมสารอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันเชื้อเพลิง (Fuel Oil) ที่ปนเปื้อนในดิน ซึ่งสอดคล้องกับ Atagana *et al.* (2003) แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 25 ต่อ 1 ให้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันสน้ำตาลที่ใช้สำหรับทาเพื่อรักษาเนื้อไม้ (Creosote) ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูง

2) Bioaugmentation เป็นเทคนิคที่ส่งเสริมอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยการเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งกล้าเชื้อที่ใช้อาจจะแยกมาจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนนั่นเอง หรือแยกมาจากแหล่งปนเปื้อนอื่น หรือเป็นเชื้อที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นๆ แล้ว นอกจากนี้มีรายงานของ Dave *et al.* (1994) ที่ศึกษาการย่อยสลายกากน้ำมัน (Slop Oil) โดยการใช้เทคนิค Bioaugmentation ที่มีการเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 7 สายพันธุ์ ลงในดินที่มีการปนเปื้อน Slop oil หลังจาก 30 วัน พบว่าการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย Slop Oil ได้ร้อยละ 70 ขณะที่การย่อยสลายโดยอาศัยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในดินมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพียงร้อยละ 40 ซึ่งสอดคล้องกับ Vasudevan and Rajaram (2001) ซึ่งศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยการใช้เทคนิค Bioaugmentation พบว่าการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลयर้อยละ 40 หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 90 วัน และเมื่อเติมสารอาหารอินทรีย์ร่วมกับการเติมกล้าเชื้อจะให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลयर้อยละ 65 นอกจากนี้ Bento *et al.* (2003) ได้เปรียบเทียบ

ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลโดยใช้เทคนิค Bioaugmentation Biostimulation และ Attenuation พบว่าเทคนิค Bioaugmentation มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีกว่าเทคนิคอื่นๆ โดยสามารถย่อยสลายในส่วนของ C_{12} - C_{23} ได้ร้อยละ 75 และส่วนของ C_{23} - C_{40} ได้ร้อยละ 73 หลังจาก 12 สัปดาห์ของการบ่ม

เทคนิคหรือเทคโนโลยีดังกล่าวข้างต้นนี้ต้องอาศัยความรู้ทั้งทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ วิศวกรรมศาสตร์ และจุลชีววิทยาร่วมกัน ข้อจำกัดของการย่อยสลายหรือการบำบัดสารย่อยสลายยากที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ธรรมชาติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการ อันที่จริงแล้วสารมลพิษ (Pollutants) ต่างๆ ที่ต้องการให้จุลินทรีย์ย่อยสลายนั้นไม่ใช่สารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ง่าย แต่จุลินทรีย์ย่อยสลายสารเหล่านั้นภายใต้สภาวะที่จำเป็นเพื่อการอยู่รอด ดังนั้นการปรับสภาวะแวดล้อมทางกายภาพเพื่อให้เอื้ออำนวยต่อการย่อยสลายสารนั้นๆ ของจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งจำเป็น บางครั้งอาจต้องมีการกระตุ้นความสามารถของจุลินทรีย์ในขั้นแรก โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ไว้ในสภาพแวดล้อมที่มีสารย่อยสลายยากนั้นๆ ในปริมาณน้อยก่อน เพาะเลี้ยงเชื้อไว้สักช่วงเวลาหนึ่งเพื่อให้สารนั้นไปกระตุ้น (Inducer) ให้จุลินทรีย์เกิดการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารนั้นขึ้น ดังนั้นกระบวนการย่อยสลายต่างๆ จะเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพต้องทำการศึกษา ทดลอง และวิจัยถึงปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมในทุกด้าน

กระบวนการย่อยสลายสารต่างๆ เหล่านี้ อาจเกิดได้ทั้งโดยกระบวนการแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic degradation) และไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic degradation) แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการที่ใช้ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนที่ย่อยสลายยากที่มีประสิทธิภาพส่วนใหญ่คือกระบวนการแบบใช้ออกซิเจน โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายควรมีคุณสมบัติสำคัญ (เสาวนีย์, 2547) ดังนี้

1. ต้องมีความสามารถในการที่จะเข้าสัมผัสกับสารปนเปื้อนที่ย่อยสลายยากนั้นได้ เพื่อที่จะทำการย่อยสลาย เช่น หากเป็นสารพวกไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่จะทำการย่อยสลายดังกล่าวได้จะต้องสามารถสร้างสารจำพวกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) หรือสารอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพ (Bio-emulsifier) ได้ เป็นต้น
2. ต้องสามารถผลิตเอนไซม์ประเภท Oxygenase ได้ เนื่องจากขั้นตอนแรกในการย่อยสลายจะเป็น Oxidative process ซึ่งต้องมีการดึงออกซิเจนเข้าไปใช้ในกระบวนการ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Oxygenase
3. สามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนที่ย่อยสลายยากต่างๆ ที่ละขั้นตอนจนกระทั่งได้สารที่เป็นสารตัวกลาง (Intermediates) ในวิถีเมแทบอลิซึมปกติ เช่น Tricarboxylic Acid Cycle หรือ TCA Cycle เพื่อเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายที่สมบูรณ์
4. การสร้างส่วนประกอบของเซลล์ทำได้โดยการนำสาร Intermediates ต่างๆ ข้างต้นไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง และเป็นส่วนประกอบซึ่งเป็นสารประเภทน้ำตาล ในกระบวนการ

Gluconeogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการสร้าง Glucose-6-Phosphate จากสารอาหารที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต เช่น อะซีเตต กลีเซอรอล หรือโพรพาน สารอาหารเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลางใน Embden-Myerhoff Pathway หรือ EMP Pathway แล้วทำปฏิกิริยาย้อนกลับ ส่วนขั้นตอนใดที่เอนไซม์ไม่สามารถทำปฏิกิริยาย้อนกลับได้ ก็จะใช้เอนไซม์อื่นเข้ามาช่วย

2.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญ นั่นคือจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานซึ่งจะถูกเปลี่ยนหรือย่อยสลายไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และองค์ประกอบของเซลล์โดยวิธีต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมนั้นประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนรูปหรือย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายๆ สายพันธุ์ บางสายพันธุ์อาจมีความสำคัญในช่วงแรกหรือช่วงหลังหรือตลอดการย่อยสลาย ทำให้โอกาสในการเปลี่ยนรูปหรือย่อยสลายสารเกิดขึ้นได้มากกว่าสิ่งแวดล้อมที่มีจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียวเพราะบางครั้งสภาวะแวดล้อมอาจไม่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์นั้น ทำให้การเปลี่ยนรูปหรือการย่อยสลายสารไม่เกิดขึ้น ความหลากหลายของสายพันธุ์จุลินทรีย์ในดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของดินและปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น ชนิดและปริมาณสารอาหาร ความชื้น pH อุณหภูมิ และการระบายอากาศภายในดิน เป็นต้น โดยแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดในพื้นที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งสายพันธุ์เด่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบคทีเรียในดินที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

Gram-negative bacteria	Gram-positive bacteria
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Nocardia</i> spp.
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> spp.
<i>Flavobacterium/ Cytophaga</i> group	<i>Arthrobacter</i> spp.
<i>Xanthomonas</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.

ที่มา : Baker *et al.* (1994)

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มักจะพบอยู่ในธรรมชาติจะเกิดการเปลี่ยนแปลง (Transformation) ได้โดยกระบวนการต่าง ๆ เช่น การดูดซับกับดินหรือตะกอน การสลายตัวโดยแสง การระเหย การเกิด oxidation และการสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตเป็นต้น ขบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นบางขบวนการเหล่านี้อาจทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนหายไปจากสิ่งแวดล้อมได้ส่วนหนึ่งโดยเฉพาะในกลุ่มของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แต่ในส่วนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงส่วนใหญ่แล้วมักจะถูกดูดซับไว้กับอนุภาคของดินหรือตะกอน ทำให้เกิดการสะสมและเพิ่มความคงทนในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น อีกกระบวนการหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจศึกษาเป็นอย่างมากก็คือ การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Biodegradation) ซึ่งเป็นขบวนการสำคัญในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน ในขณะที่บางชนิดมีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทำให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบชนิดต่าง ๆ ที่มีความเป็นพิษน้อยลง

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติเกิดขึ้นได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อแลกเปลี่ยนสารโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงและได้พลังงานออกมาสำหรับนำไปใช้ในการสร้างเซลล์

กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนน้ำหนักโมเลกุลสูง Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) พบในจุลินทรีย์ทุกกลุ่มได้แก่แบคทีเรีย เชื้อรา ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายเซลล์เดียว (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในตารางที่ 2-4 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

PAH	แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Anthracene	<i>Beijerinckia</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp.	Cerniglia, 1992; Kastner et al., 1994
Phenanthrene	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Vibrio</i> sp., <i>Arthrobacter</i> <i>olychromogenes</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>	Cerniglia, 1992; Geisilbrecht et al., 1996; Juhasz et al., 1997
Fluoranthene	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Gordona</i> sp.	Ye et al., 1996; Weissenfels et al., 1990; Kastner et al., 1994
Pyrene	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Cycloclasticus</i> sp.	Boonchan et al., 1998 (b); Sepic et al., 1997; Geiselbrecht et al., 1998
Chrycene	<i>Rhodococcus</i> sp.	Cerniglia, 1992
Benz[a]anthracene**	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i> , <i>Beijerinckia</i> sp.	Aitken et al., 1998; Ye et al., 1996; Cerniglia, 1992
Benzo[a]pyrene**	<i>Beijerinckia</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.	Cerniglia, 1992; Boonchan et al., 1998 (b); Dean and Cerniglia, 1996
Coronene**	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Boonchan et al., 1998(b)

หมายเหตุ **แบคทีเรียไม่สามารถใช้ PAH ชนิดนั้น ๆ เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียง
แหล่งเดียวได้ การย่อยสลายเกิดขึ้นโดยขบวนการ cometabolism

ที่มา : คัดแปลงจาก (Cerniglia, 1992)

ตารางที่ 3 กลุ่มของเชื้อราที่มีความสามารถในการออกซิไดส์สารประกอบ PAHs

PAH	เชื้อรา	เอกสารอ้างอิง
Naphtalene	<i>Absidia glauca</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Basidiobolus ranarum</i> , <i>Candida utitis</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Cerniglia, 1992
Anthracene	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Ramaria</i> sp., <i>Trametes versicolor</i>	Andresson and Henrysson, 1996; Cerniglia, 1992
Phenanthrene	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> , <i>Trametes versicolor</i>	Cerniglia, 1992; Hammel et al., 1992
Fluoranthene	<i>Cunninghamella elegans</i>	Cerniglia, 1992
Pyrene	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i>	Cerniglia, 1992
Benz[a]ntracene	<i>Cunninghamella elegans</i>	Cerniglia, 1992
Benzo[a]pyrene	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>Chrysosporium pannorum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes</i> <i>versicolor</i>	Cerniglia, 1992

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Cerniglia, 1992)

ตารางที่ 4 กลุ่มของสาหร่ายเซลล์เดียวและไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดส์ PAHs

PAH	สาหร่ายเซลล์เดียวและไซยาโนแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Naphtalene	<i>Oscillatoria</i> sp. (strain JCM), <i>Microcoleus</i> <i>chthonoplastes</i> , <i>Agmenellum</i> <i>quadruplicatum</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i>	Narro et al., 1992(a); Cerniglia, 1992; Narro et al., 1992(b)
Phenanthrene	<i>Oscillatoria</i> sp. (strain JCM), <i>Agmenellum</i> <i>quadruplicatum</i>	Narro et al., 1992(a); Narro et al., 1992(b)
Benzo[a]pyrene	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Cerniglia, 1992

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Cerniglia, 1992)

2.4 การย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

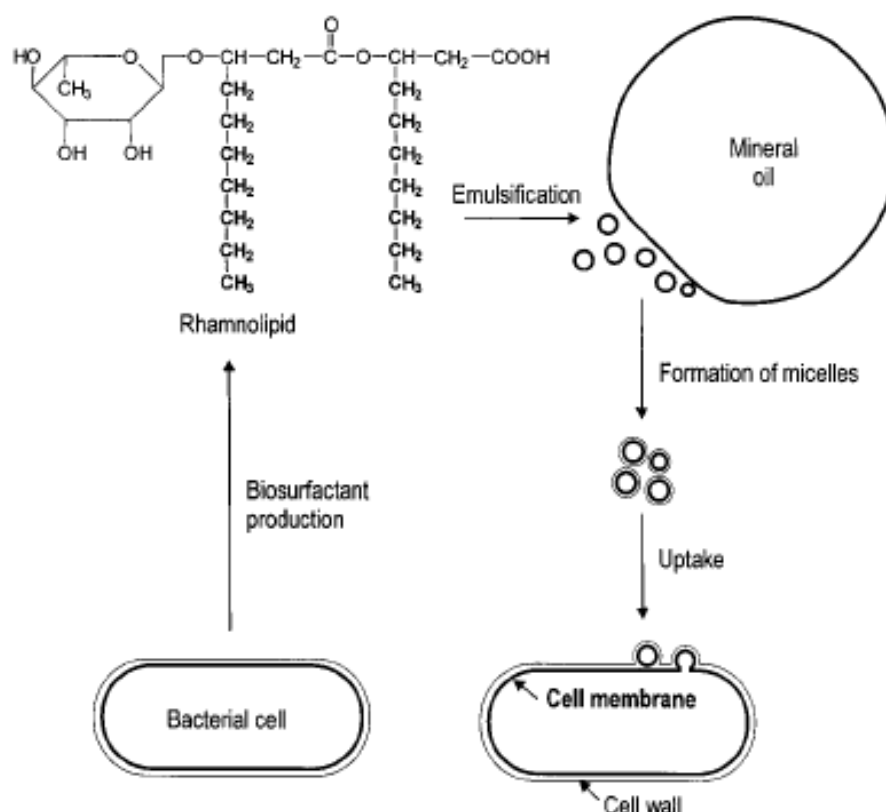
การนำจุลินทรีย์จำพวก แบคทีเรีย ยีสต์ รา เชื้อราโนแบคทีเรีย และสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีความสามารถในการย่อยสลายคราบน้ำมันมาย่อยสลายคราบน้ำมัน เนื่องจากน้ำมันดิบ (Crude oil) ในธรรมชาติ สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbons) ซึ่งจะปรากฏทั่วไปในทะเล ในดิน และสิ่งแวดล้อมต่างๆ ดังนั้นการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์จึงเป็นอีกหนทางหนึ่งซึ่งสามารถกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ น้ำมันดิบ สามารถแบ่งได้ตามองค์ประกอบของอัลเคน (Alkanes) อะโรมาติกส์ (Aromatic) แอสฟาทีน (Asphatenes) ไนโตรเจน (Nitrogen) ออกซิเจน (Oxygen) และซัลเฟอร์ (Sulphur) จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้แสดงให้เห็นว่า น้ำมันดิบ ที่ประกอบด้วยอัลเคนที่มีความเข้มข้นสูงจะง่ายต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ในอัลเคนที่เป็นสายตรงและอัลเคนที่เป็นกิ่งก้านสาขา จะถูกเมแทบอลิซ์ (metabolize) โดยจุลินทรีย์เป็นอันดับแรก ขณะที่อัลเคนที่มีสายยาว (C_{28} ถึง C_{32}) Cycloalkane และ Asphaltenes จะไม่ถูกย่อยสลาย อย่างไรก็ตามการเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพจะลดลงเมื่อมี Benzene ring เพิ่มขึ้น การย่อยสลายคราบน้ำมันเกิดจากการที่ไฮโดรคาร์บอนถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ซึ่งกลไกการใช้ไฮโดรคาร์บอนโดยการดูดซึมอัลเคน เข้าสู่เซลล์นั้น มีความสัมพันธ์กันกับความสามารถของจุลินทรีย์ในการปล่อยสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) การสัมผัสของผิวเซลล์กับหยดน้ำมันมาจากการเกิดของเมแทบอลิท์ระดับเซลล์ (Cellularmetabolite) ด้วยคุณสมบัติ surface active เพื่อลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวที่มีค่าความเข้มข้นสูงกว่า Critical Micelles Concentration (CMC) สามารถเกิดเป็น Micelles ได้ซึ่งจะละลายอัลเคนเข้าสู่เซลล์ได้เร็วขึ้นและทำให้ไฮโดรคาร์บอนถูกย่อยสลายไปในที่สุด (พงศธร, 2551) แสดงดังภาพที่ 2

2.4.1 วิธีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือสารประกอบ Aliphatic hydrocarbon และสารประกอบ Aromatic hydrocarbon ซึ่งมีวิธีการย่อยสลายดังนี้

1) การย่อยสลายสารประกอบ Aliphatic hydrocarbon

การย่อยสลายสารประกอบ Aliphatic hydrocarbon นั้น พบว่าบางชนิดที่ปลายสายไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่จะถูกย่อยโดยกลไกการเกิดปฏิกิริยา Oxidation และ Dehydrogenation มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดไขมัน ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อโดยกลไกการเกิด β -Oxidation (Atlas, 1991) ในกรณีการย่อยสลาย Cyclohexane เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยา Hydroxylation โดยมีเอนไซม์ Oxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็นสารประกอบ Alicyclic Alcohol จะเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยปฏิกิริยา



ภาพที่ 2 การบำบัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

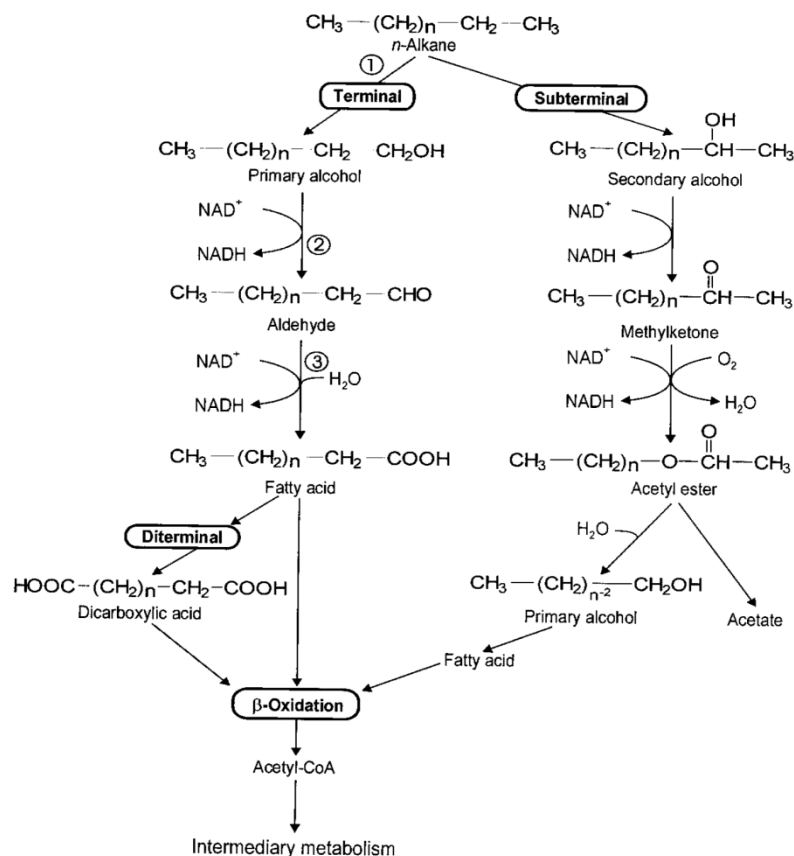
ที่มา: Fritsche and Hofrichter (2000)

Dehydrogenation และ Oxidation ได้เป็นสารประกอบ Dicarboxylic acid ซึ่งเข้าสู่กลไกการเกิด β -Oxidation ซึ่งปฏิกิริยานี้จะตัดคาร์บอนอะตอมโดยใช้เอนไซม์ Oxygenase เป็นเอนไซม์เริ่มต้นในการเปลี่ยนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนให้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเอนไซม์ Dehydrogenase จะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นอัลดีไฮด์และกรดไขมัน ตามลำดับ ซึ่งสารตัวกลาง (Intermediate) ที่ได้ก่อนเข้าสู่กระบวนการ Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) คือ Acetyl-CoA และจะถูกใช้เป็น Building blocks สำหรับสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ (ภาพที่ 3)

2) การย่อยสลายสารประกอบ Aromatic hydrocarbon

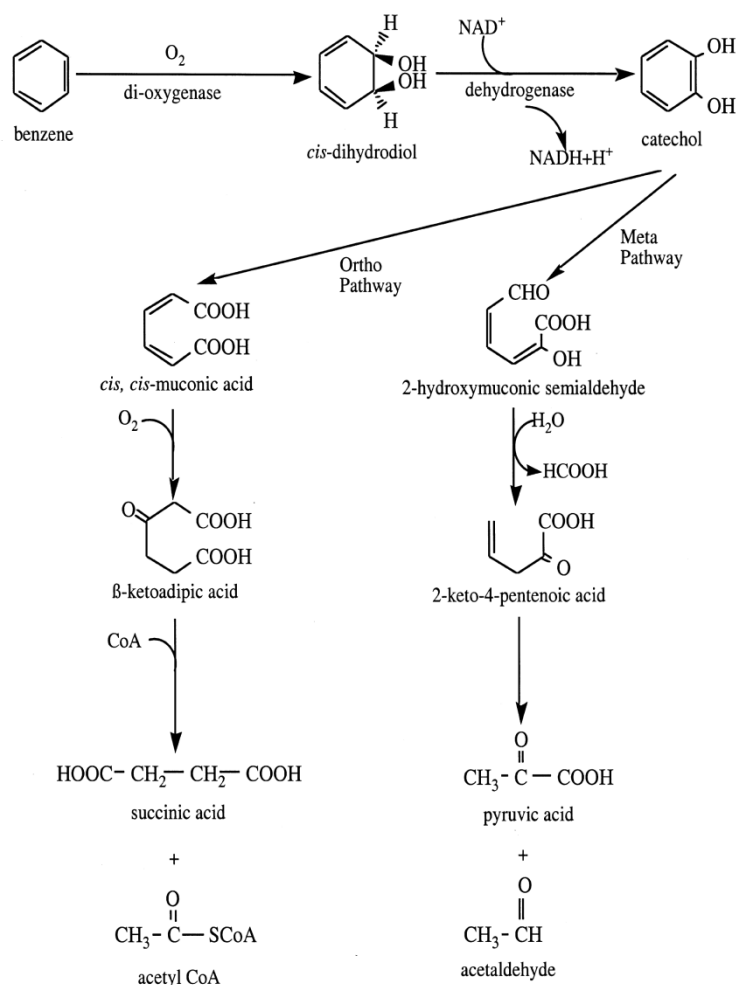
การย่อยสลายสารประกอบ Aromatic hydrocarbon เริ่มต้นจากการย่อยสลายส่วนที่เป็น Side Chain แล้วจึงย่อยส่วนของวงแหวนเบนซีน โดยอาศัยปฏิกิริยา Hydroxylation และ Dehydrogenation ในการเติมออกซิเจนเข้าไปในวงเบนซีนด้วยเอนไซม์ Oxygenase ให้อยู่ในรูปของ Diol จากนั้นเอนไซม์ Dehydrogenase จะเปลี่ยน Diol ให้อยู่ในรูปของสารที่ไม่เสถียรหรือที่เรียกว่า Catechol ซึ่งการย่อยสลายโดยการแตกวงเบนซีนจะเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ Ortho หรือ Meta cleavage (ภาพที่ 4) ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่จะนำสารตัวกลางไปใช้สังเคราะห์

องค์ประกอบต่างๆ ซึ่งสารตัวกลางที่ได้จากการแตกวงเบนซีนแบบ Ortho cleavage คือ Succinate และ Acetyl-CoA ส่วนสารตัวกลางจากการแตกวงเบนซีนแบบ Meta cleavage คือ Acetaldehyde และ Pyruvate นอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีโครงสร้างของโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์เพื่อสร้างเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายให้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จนได้ผลผลิตสุดท้ายคือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ



ภาพที่ 3 วิธีการย่อยสลาย Aliphatic hydrocarbon ① = n -alkane monooxygenase, ② = alcohol dehydrogenase และ ③ = aldehyde dehydrogenase

ที่มา : Fritsche and Hofrichter (2000)



ภาพที่ 4 วิธีการย่อยสลาย Aromatic hydrocarbon

ที่มา : Galvis *et al.* (2006)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ต้องการสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารแตกต่างกันเช่น จุลินทรีย์ที่อาศัยในดินที่มีการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจำกัด จำเป็นต้องปรับระดับสารอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ความชื้น pH ปริมาณออกซิเจนในดิน และอุณหภูมิที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินให้สมบูรณ์และรวดเร็วขึ้น โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ ได้แก่

2.5.1 ชนิดและปริมาณของสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อน

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินมีหลายรูปแบบ บางชนิดจุลินทรีย์ย่อยสลายไม่ได้หรือย่อยสลายได้ยาก เช่น Aromatic hydrocarbon เป็นสารไฮโดรคาร์บอนไม่ละลายน้ำซึ่งจุลินทรีย์จะย่อยสลายได้ยาก ดังนั้นการเติมสารเคมีบางชนิดลงไป เช่น สารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยลดแรงตึงผิว หรือสารอิมัลซิไฟเดอร์เพื่อช่วยให้เกิดการรวมตัวกันของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำ อีกทั้งยังทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้นทำให้ง่ายแก่การย่อยสลาย

2.5.2 ความชื้น

ความชื้นในดินทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านสารอาหาร ออกซิเจนและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย โดยระดับความชื้นที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์อยู่ที่ประมาณร้อยละ 30 - 90 ซึ่งความชื้นในดินที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ได้คิดเป็นร้อยละ 50 ของน้ำทั้งหมดในดิน (Baker and Diane, 1994) โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์จะย่อยสลายสารได้ดีในระดับความชื้นที่พืชเจริญได้ หากมีความชื้นมากเกินไปจะทำให้ปริมาณออกซิเจนในดินลดลง

2.5.3 pH

โดยส่วนใหญ่ pH ของดินจะพบอยู่ในช่วง 2.5-11 ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและแร่ธาตุต่างๆที่อยู่ในดิน ซึ่งพบว่าที่ pH 7-9 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Dibble and Bartha, 1979) แต่ดินส่วนใหญ่จะมีสภาพเป็นกรดจำเป็นต้องปรับสภาพดินให้เป็นกลาง นอกจากนี้ช่วง pH ที่เป็นกลางยังทำให้ธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้ วิธีที่เลือกใช้ส่วนใหญ่คือการเติมปูนขาว หรือโคโคไมต์

2.5.4 ออกซิเจน

กระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนแต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนกระบวนการย่อยสลายจะเกิดได้เร็วและสมบูรณ์กว่า โดยปริมาณออกซิเจนในดินจะขึ้นกับความพรุนของดินและปริมาณน้ำในดินที่อยู่ตามรูพรุนซึ่งจะทำให้ให้ออกซิเจนในดินน้อยลง โดยทั่วไปพบว่าในดินมีปริมาณออกซิเจนน้อยที่สุดร้อยละ 10 ซึ่งเพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ในการเจริญและเพื่อให้กระบวนการย่อยสลายเกิดเร็วขึ้นอาจมีการเติมอากาศในดิน วิธีการเติมอากาศขึ้นกับขนาดของพื้นที่ ปริมาณของไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนและระดับความลึกที่มีการปนเปื้อนในดิน ในกรณีที่มีการปนเปื้อนมีความลึกประมาณ 6 - 12 นิ้ว นิยมใช้ฟางโปรยลงไปแล้วทำการไถพรวน วิธีนี้จะช่วยปรับสภาพโครงสร้างของดิน (Baker and Diane, 1994) หรือทำการขุดฝังท่อเติมอากาศกรณีที่มีการปนเปื้อนมีความลึกลงไป

2.5.5 สารอาหาร

จุลินทรีย์ต้องการสารอาหารเพื่อนำไปใช้สร้างส่วนประกอบของเซลล์หรือสร้างพลังงานที่จำเป็นในการดำรงชีวิต สารอาหารถือเป็นส่วนสำคัญที่จะส่งเสริมให้การย่อยสลายมี

ประสิทธิภาพสูงสุด (Trindade *et al.*, 2005) โดยพบว่าดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจะมีปริมาณแหล่งคาร์บอนในดินเพิ่มขึ้นในขณะที่แหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลงในแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนจะช่วยให้งิจกรรมของจุลินทรีย์ในการสร้างและสลายสารเพื่อความอยู่รอดและการเจริญดำเนินไปอย่างรวดเร็ว (Bragg *et al.*, 1994; Venosa *et al.*, 1996) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ตลอดจนอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

2.5.6 อุณหภูมิ

การเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นกับปฏิกิริยาทางเคมีของการสร้าง (Anabolism) และสลายสาร (Catabolism) โดยอัตราของปฏิกิริยาทางเคมีจะขึ้นกับอุณหภูมิ พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 10 องศาเซลเซียส จากอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะทำให้จุลินทรีย์มีเมแทบอลิซึมสูงขึ้นเป็น 2 เท่า (Baker and Diane, 1994) อย่างไรก็ตามช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์จะขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดด้วย ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์

2.5.7 สารลดแรงตึงผิว (Surfactant)

สารลดแรงตึงผิวถูกนำมาใช้ในการลดแรงตึงผิวหรืออิมัลซิไฟด์ (Emulsify) เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของสารที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อย โดยนำไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการย่อยสลายคราบน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพิ่มความสามารถในการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ทำให้การย่อยสลายน้ำมันเป็นไปอย่างรวดเร็ว

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สำหรับการย่อยสลายสารประกอบในกลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าสารประกอบในกลุ่มนี้ที่มีโครงสร้างง่าย ๆ หรือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือมีโครงสร้างซับซ้อน สารประกอบอะโรมาติกที่มีวงแหวนเบนซีนหนึ่ง สอง หรือสามวงอยู่ในโมเลกุล เช่น Phenol Naphthalene และ Anthracene จะถูกย่อยสลายได้ง่าย แบคทีเรียกลุ่มที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ดี เช่น *Pseudomonas Mycobacterium Achromobacter Bacillus* และ *Nocardia* spp. สำหรับสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป จัดเป็นสารที่ย่อยสลายได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับอินทรีย์สารชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในดิน (Cerniglia, 1992)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ได้ทำการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหรือบำบัดสารปนเปื้อนที่ย่อยสลายยากได้ อาทิเช่น Mercadé *et al.* (1996) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเลี้ยงเชื้อ *Rhodococcus* sp. และ *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีปริมาณลดลงร้อยละ 7.87 - 45.89 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

จิราภรณ์ และคณะ (2537) สํารวจตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนด้วยคราบน้ำมันบริเวณฝั่งแม่น้ำเจ้าพระยา 65 ตัวอย่าง แยกและคัดเลือกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ 8 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและน้ำมันเตาได้ภายใน 7 วันและมีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 31012 และ *Rhodococcus* sp. ATCC21504 ซึ่งย่อยสลายได้เฉพาะน้ำมันดิบและใช้เวลาย่อยสลายนานกว่า 14 วัน การศึกษาคุณสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมีประกอบกับการใช้อุปกรณ์จัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ระบบเอพีไอ พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จัดอยู่ใน 2 จีนัส คือ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter*

ปัญญาพล (2543) ศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนบางชนิด ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันและกากตะกอน ผลการจำแนกชนิดพบว่า จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* *circulans* *Pseudomonas* *alkaligenes* และ *Yarrowia* sp. ตามลำดับ จุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดยที่ *Yarrowia* sp. สายพันธุ์ D2-1 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีกว่าจุลินทรีย์อีก 2 สายพันธุ์ รวมทั้งมี Dioxygenase activity ด้วยการย่อยสลายนอร์มอล-เตตระเดเคน พริสเทนและฟีแนนทรีน สามารถลดปริมาณฟีแนนทรีนได้ร้อยละ 90 ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B3-1 สามารถลดปริมาณไฮโดรคาร์บอน ในน้ำมันดิบได้ ร้อยละ 35 ภายในเวลา 1 วัน และร้อยละ 55 เมื่อครบ 7 วันเมื่อปรับค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 6-7 พบว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนถูกย่อยสลายได้มากขึ้นเป็นร้อยละ 70 ส่วน *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C1-2 และ *Yarrowia* sp. สายพันธุ์ D2-1 ในภาวะที่ควบคุมค่า pH สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันได้ร้อยละ 80 และ 82 ตามลำดับ

Jirasripongpun *et al* (2002) ศึกษาลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันที่แยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ โดยใช้ไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เครื่องยนต์เป็นแหล่งคาร์บอนในการจำแนกไอโซเลต และสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์หาลำดับเบส 16S rDNA สปีชีส์ของแบคทีเรีย วิเคราะห์หาลำดับเบส 18S rRNA สปีชีส์ของยีสต์ พบว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas mandii* *Rhodococcus* sp. *Norcadia simplex* *Gordona terrea* *Debaryomyces hansenii* ซึ่งสายพันธุ์

ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันสูงสุด คือ *Norcadia simplex* ซึ่งย่อยสลาย Saturate Aromatic และ Resin ได้เล็กน้อยมีค่าเท่ากับร้อยละ 52.46 38.13 และ 18.81 ตามลำดับ

Liang *et al.* (2006) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ โดยจะใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์หมายเลข 20 เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารที่ใช้แยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากตะกอนน้ำมันที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบโดยใช้วิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายที่สามารถจำแนกได้ คือ เชื้อ *Zoogloea* sp.

ธนรัตน์ (2550) ศึกษาวัสดุดูดซับและย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียจากดิน ทำการเก็บตัวอย่างดินในบริเวณอู่ซ่อมรถยนต์เพื่อนำมาหาแบคทีเรียในดินที่สามารถอยู่รอดได้ จากนั้นนำแบคทีเรียไปทดสอบการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยใช้อัตราส่วนของน้ำมันดิบที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือร้อยละ 0.05 0.5 1 และ 5 ปริมาตรของแบคทีเรียแต่ละชนิด แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดไปถ่ายลงวัสดุดูดซับพบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องและเจริญเติบโตได้ มีจำนวน 16 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบการย่อยสลายกับน้ำมันดิบที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดได้ มีจำนวน 12 ไอโซเลต และจากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร พบว่า แบคทีเรีย ไอโซเลต VB41 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบดีที่สุด

วิชุดา และคณะ (2551) ได้ทำการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 36 ไอโซเลต ได้แก่แบคทีเรีย 25 ไอโซเลต และยีสต์ 11 ไอโซเลต โดยยีสต์ไอโซเลต PO 1.2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและสามารถสร้างสารอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพ (Bio-emulsifier) ได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าโคโลนีของยีสต์ PO1.2 บนอาหาร YM agar มีลักษณะ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ แบนราบ เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางลำดับดีเอ็นเอ ด้วย 26S rDNA Sequencing พบว่าเป็นเชื้อ *Issatchenkia orientalis* เมื่อนำ *I. orientalis* PO1.2 มาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ผลการทดลองพบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุดที่ร้อยละ 0.5 ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 63.60 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *I. orientalis* PO1.2 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพ โดยเมื่อนำส่วนโสมมาทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity) กับน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว พบว่าเชื้อ *I. orientalis* PO1.2 มีประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 71.67 ในอาหารที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนั้นยังมี

รายงานการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 83 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย 62 ไอโซเลท และเป็นยีสต์ 21 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียไอโซเลท GR 2.4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและสามารถสร้างสารอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง Nutrient agar โคโลนีแสดงลักษณะขอบเรียบ สีขาวขุ่น มีลักษณะพื้นฐานวิทยาเป็นรูปท่อนสั้น ดิดสีแกรมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางลำดับดีเอ็นเอด้วย 16S rDNA พบว่าเป็น *Serratia* sp. เมื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว แบคทีเรีย *Serratia* sp. GR 2.4 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายร้อยละ 60 นอกจากนี้ *Serratia* sp. GR 2.4 ยังสามารถผลิตสารอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพได้ โดยจากการนำส่วนในสมาทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันกับไขมันซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดเท่ากับร้อยละ 54.55 ในอาหารที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งคาร์บอน (วิชุดา และ เครือมาศ, 2551)

จิตติมา (2551) ศึกษาวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพเป็นการใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์จะใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน จากนั้นคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานพบว่า กลุ่มเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ได้แก่ *Acinetobacter* sp. *Pseudomonas* sp. *Nocardia* sp. *Rhodococcus* sp. *Gordona terrae* และ *Ralstonia* sp. โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนคือ ช่วงอุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส pH 5.5 - 8.0 อัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เท่ากับ 1: 25 และสารลดแรงตึงผิว คือ Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.005-1.0 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยพบว่า *Nocardia simplex* *Gordona terrae* และ *Pseudomonas mandelii* มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุดคือร้อยละ 50.00 30.00 และ 27.60 ตามลำดับ

การย่อยสลายน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์นั้นเกิดขึ้นได้โดยสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันถูกย่อยสลาย ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิด ในขณะที่จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการปรับตัวและการพัฒนาระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการย่อยสลาย จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะใช้ไฮโดรคาร์บอนที่มีสายสั้นหรือยาวก็

ได้ เช่น *Mycobacterium* สามารถใช้ Ethane (C_2H_6) จนถึง Paraffin จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ Ethane เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้มีหลายกลุ่มด้วยกัน เช่น *Mycobacterium* *Nocardia* *Streptomyces* *Pseudomonas* *Flavobacterium* แบคทีเรียที่มีรูปร่างทรงกลมหลายชนิดรวมทั้งมีจำพวกสาขายก็สามารถใช้ Ethane ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Mycobacteria* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย Ethane ได้ดีที่สุด สำหรับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่านี้ พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ดีคือพวก Acid-fast ได้แก่ *Mycobacteria* *Norcadia* *Pseudomonas* *Streptomyces* *Desulfovibrio* *Corynebacterium* และพวกแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมและเชื้รบางชนิด (ศุภศิลป์, 2552)

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 ตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนคราบน้ำมันดิบ หรือน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งเก็บหน้าดิน ระดับ 0 – 15 เซนติเมตรจากบริเวณสวนปาล์มน้ำมัน โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม อุโมงค์รถยนต์ และรถจักรยานยนต์ภายในจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา

3.1.2 อุปกรณ์

- 1) ไมโครปิเปตขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
- 2) ตู้อบความดันสูง
- 3) ตู้บ่มเชื้อ
- 4) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
- 5) กล้องจุลทรรศน์
- 6) เครื่องผสม (vortex mixer)
- 7) กรวยแยก
- 8) กรวยกรอง
- 9) โถดูดความชื้น
- 10) ตู้ดูดควัน
- 11) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 12) เตาให้ความร้อน
- 13) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

3.1.3 สารเคมี

- 1) น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ผ่านการใช้แล้ว (ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านซ่อมรถจักรยานยนต์ใน อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง)
- 2) น้ำมันดิบ (ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่)
- 3) Dichloromethane
- 4) Amphotericin B (antifungal) ยี่ห้อ GIBGO, USA

5) Chloramphenicol (antibacterial) ยี่ห้อ GIBCO, USA

6) อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1 Nutrient Broth (NB) จากบริษัท Himedia Laboratories Pub. Ltd.

5.2 Yeast Malt Broth (YMB) จากบริษัท Himedia Laboratories Pub. Ltd.

5.3 Basal Salt Medium (BSM) ดัดแปลงจาก Katemai *et al.* (2008)

5.4 Mineral Salt Medium (MSM) ดัดแปลงจาก จิตติมา (2551)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 วิธีวิเคราะห์

1) ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

วิธีชั่งหาน้ำหนักน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่หายไป (Weight loss method) โดยสกัด Culture broth ด้วย Dichloromethane ในอัตราส่วน 2:1 ทำการสกัด 2 ครั้ง แล้วนำส่วนของตัวทำละลายมากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 ทำแห้งตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำสารที่ได้อบในเตาซีเคเตอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้น และชั่งน้ำหนักสารที่ได้ จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (จิตติมา, 2551) จากสูตร

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยน้ำมัน (\%)} = ((W_1 - W_2) / W_1) \times 100$$

W_1 = น้ำหนักของน้ำมันเริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักของน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2) การทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน [Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI)]

ปิเปตน้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มี culture supernatant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดความสูงของของเหลวทั้งหมดและของเหลวที่เกิดอิมัลชันด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ และคำนวณร้อยละการทำให้เกิดอิมัลชันคงตัว ค่าที่ได้ที่เวลา 10 นาทีเรียกว่า %EA ในขณะที่ค่าที่ได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง เรียกว่า %EI (Cooper and Goldenberg, 1987) การคำนวณหากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน(%) แสดงดังสมการ

$$\%EA \text{ และ } \%EI = \frac{\text{ความสูงของของเหลวที่เกิดอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของของเหลวทั้งหมด}} \times 100$$

3) การทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil Displacement Area (ODA) test)

ปิเปต น้ำมันดิบ (Crude oil) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำกลั่น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในจาน Petri dish (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 95 มิลลิเมตร) ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ขึ้นทันที จากนั้นค่อยๆ หยด culture supernatant ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนตรงกลางของแผ่นฟิล์มน้ำมัน ซึ่งจะทำให้เกิดช่องว่างใสขึ้น ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงกลมที่เกิดขึ้น เพื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมันดิบ เป็นตารางเซนติเมตร สูตรการคำนวณดังสมการ (Youssef *et al.*, 2004)

$$\text{Oil Displacement Area (ODA)} = 22 / 7 (r)^2 \text{ ตารางเซนติเมตร}$$

r = รัศมีการกระจายตัวของตัวอย่างบนผิวหน้าของน้ำมันดิบ

3.2.2 การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบและน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและ/หรือประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ใส่ตัวอย่างดิน และน้ำที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง น้ำหนัก 5 กรัม ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM (Mineral Salt Medium) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ที่มีน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน) (Mercadé *et al.*, 1996) บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นแยกออกเป็น 2 ชุดการทดลอง แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หรือจนกระทั่งเห็นการเจริญของจุลินทรีย์ จากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 10 ลงในอาหาร MSM ใหม่และทำการเลี้ยงตามวิธีการเดิมอีก 3 ครั้ง (ดัดแปลงจากจิตติมา, 2551) ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยทำการเจือจางแบบ Serial dilution ในช่วง 10^{-1} ถึง 10^{-5} ลงบนอาหาร NA (ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะชนิดแอมพิเทอริซิน บีเพื่อยับยั้งเชื้อรา) และ YMA (ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะชนิดคลอแรมเฟนิคอลเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย) ทำการเกลี่ยให้ทั่วด้วยเทคนิค Spread plate นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง NA และ YMA ไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน จากนั้นแยกเชื้อซ้ำด้วยวิธี cross streak อีก 2-3 ครั้งให้ได้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ ซึ่งทำการตรวจสอบโดยสังเกตลักษณะโคโลนีบนจานอาหารแข็ง และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร MSM ที่ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อในการทดสอบขั้นต่อไป

3.2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น และทำการย้อมแกรม (กรณีแบคทีเรีย) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอ และทำ PCR เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอโดย 16S rDNA (กรณีแบคทีเรีย) หรือ 26S rDNA (กรณียีสต์และรา) โดยใช้ universal oligonucleotide primers วิเคราะห์ลำดับเบสโดยเครื่อง ABI PRISM™ 3100 DNA Sequencer และทำการเทียบเคียงลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม BLAST ซึ่งเข้าถึงได้จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

3.2.4 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและ/หรือประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

1) การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 ในอาหาร NB หรือ YMB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นมาผสมกันเพื่อเป็นกล้าเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์ผสม ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยวัดค่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.5

2) วิธีการสกัดแยกน้ำมัน

นำตัวอย่างอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม (Culture broth) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้และไคลคลอโรมีเทนใส่กรวยแยกด้วยอัตราส่วน 2:1 โดยขั้นตอนนี้ทำในตู้ดูดควัน หากมีกรวยน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วติดในหลอดเซนตริฟิวส์ให้กั้วด้วยไคลคลอโรมีเทนให้หมด แล้วนำส่วนใสที่เป็นชั้นของไคลคลอโรมีเทนมาทำการระเหยให้แห้ง ใส่ในเคซิเคเตอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ กำหนดหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน หรือ Weight loss ในข้อ 3.2.1

3) การวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสม

ปิเปตสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายเซลล์ไปวัดการเจริญด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

4) การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่ได้จากข้อ 1) (ข้อ 3.2.4) ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Basal salt medium (BSM) ปริมาตร 45

มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 5 10 และ 15 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง หรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์กับส่วนใส โดยสารละลายเซลล์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ส่วนส่วนใสที่ได้นำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ ค่าความสามารถในการกระจายน้ำมัน หรือ ODA (ข้อ 3.2.1) กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI) (ข้อ 3.2.1) และทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้ หรือ Weight loss ในข้อ 3.2.1 จากนั้นเลือกปริมาณน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5) การศึกษาในโตรเจนที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

นำกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 1) (ข้อ 3.2.4) ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรถ่ายลงอาหาร BSM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 4) โดยมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ ยูเรีย และชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง หรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์กับส่วนใส โดยสารละลายเซลล์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ส่วนส่วนใสที่ได้นำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ ค่าความสามารถในการกระจายน้ำมัน หรือ ODA (ข้อ 3.2.1) กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI) (ข้อ 3.2.1) และทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้ หรือ Weight loss ในข้อ 3.2.1 เลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

6) การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

นำกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 1) (ข้อ 3.2.4) ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรถ่ายลงอาหาร BSM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 4) โดยมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 5) ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 7 8 และ 9 รวมทั้งชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง หรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่าง

ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์กับส่วนใส โดยสารละลายเซลล์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ส่วนส่วนใสที่ได้นำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ ค่าความสามารถในการกระจายน้ำมัน หรือ ODA (ข้อ 3.2.1) กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI) (ข้อ 3.2.1) และทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว หรือ Weight loss ในข้อ 3.2.1 เลือกพีเอชเริ่มต้นที่เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

7) การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

นำกล้ำเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 1) (ข้อ 3.2.4) ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรถ่ายลงอาหาร BSM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 4) โดยมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 5) ปรับพีเอชเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 6) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง 37 และ 45 องศาเซลเซียส รวมทั้งชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์กับส่วนใส โดยสารละลายเซลล์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ส่วนส่วนใสที่ได้นำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ ค่าความสามารถในการกระจายน้ำมัน หรือ ODA (ข้อ 3.2.1) กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI) (ข้อ 3.2.1) และทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว หรือ Weight loss ในข้อ 3.2.1 เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

8) การศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

นำกล้ำเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 1) (ข้อ 3.2.4) ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรถ่ายลงอาหาร BSM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 4) โดยมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 5) ปรับพีเอชเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 6) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 150 200 และ 250 รอบต่อนาที รวมทั้งชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม อุณหภูมิที่ได้จากข้อ 7) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์กับส่วนใส โดยสารละลายเซลล์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ส่วนส่วนใสที่ได้นำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ ค่าความสามารถในการกระจายน้ำมัน หรือ ODA (ข้อ 3.2.1) กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI) (ข้อ 3.2.1) และทดสอบ

ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว หรือ Weight loss ในข้อ 3.2.1 เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

9) การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ และการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

นำกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 1) (ข้อ 3.2.4) ร้อยละ 10 ถ่ายลงอาหาร BSM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว แหล่งไนโตรเจนและปรับพีเอช เริ่มต้น บ่มอุณหภูมิ และความเร็วรอบในการเขย่า ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 8) จากนั้นเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 0 6 12 18 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง โดยทุกช่วงเวลาจะเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์กับส่วนใส โดยสารละลายเซลล์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ส่วนส่วนใสที่ได้นำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ ค่าความสามารถในการกระจายน้ำมัน หรือ ODA (ข้อ 3.2.1) กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน Emulsification activity (%EA) และ Emulsification Index (%EI) (ข้อ 3.2.1) และทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหรือ Weight loss ในข้อ 3.2.1

3.2.5 ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดและบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในพื้นที่จำลองดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

นำดินที่ไม่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยแบ่งดินออกเป็น 4 ชุดการทดลอง แต่ละชุดใช้ดิน 100 กรัม ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 14×20×8 เซนติเมตร (ดัดแปลงจาก Dave *et al.*, 1994) สามารถออกแบบการทดลองดังตารางที่ 5

- ชุดการทดลองที่ 1 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 และเติม suspension ของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเชื้อ 10^6 CFU/กรัมดิน

- ชุดการทดลองที่ 2 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4

- ชุดการทดลองที่ 3 ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 และเติม suspension ของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเชื้อ 10^6 CFU/กรัมดิน

- ชุดการทดลองที่ 4 ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4

ทุกชุดการทดลองควบคุมปริมาตรของสารละลายที่เติมในดินให้เท่ากันโดยใช้ น้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิดปากภาชนะด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างดินในวันที่ 0 และ 30 วัน เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหรือ Weight loss ในข้อ 3.2.1

ตารางที่ 5 ชุดการทดลองประสิทธิภาพในการกำจัดและบำบัดสารย่อยสลายยากโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในพื้นที่จำลองดิน

ชุดทดลอง	ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	กล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ 10^6 CFU ต่อกรัมดิน	ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (ร้อยละ)
			10
1	+	+	+
2	+	-	+
3	-	-	+
4	-	+	+

หมายเหตุ สัญลักษณ์ + หมายถึง ชุดการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หรือ เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว หรือ เติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

- หมายถึง ชุดการทดลองที่ไม่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หรือ ไม่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว หรือ ไม่เติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

ชุดการทดลอง 1 หมายถึง ดินฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + เชื้อจุลินทรีย์ผสม

ชุดการทดลอง 2 หมายถึง ดินฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

ชุดการทดลอง 3 หมายถึง ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

ชุดการทดลอง 4 หมายถึง ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + เชื้อจุลินทรีย์ผสม

3.2.5 การวางแผนการทดลองการวิเคราะห์ผลทางสถิติ CRD (completely randomized design)

วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Version 11 วิธี One Way ANOVA

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การแยกและคัดเลือกรังนกที่สามารย่อยสลายน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

จากการสำรวจพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารย่อยสลายซากจำพวก น้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช (NS) พัทลุง (PT) และสงขลา (SK) แล้วได้เก็บตัวอย่างดิน และนำมาเพื่อคัดแยกและคัดเลือกรังนกที่สามารย่อยสลายสารดังกล่าว ซึ่งภาพที่ 5 เป็นภาพพื้นที่ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว



ภาพที่ 5 พื้นที่ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา

จากผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร MSM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 56 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย 38 ไอโซเลท และเป็นเชื้อยีสต์ 18 ไอโซเลท (ตารางที่ 6) และพบว่าสามารถแยกเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้มากกว่าที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลทซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้มากกว่าร้อยละ 50 จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ทั้ง 6 ไอโซเลทมาตั้งรหัดใหม่ โดยแบคทีเรียไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท WK1 WK2 WK3 WK4 และWK5 และเชื้อยีสต์ 1 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท WK6 แล้วนำจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทไปจำแนกชนิดต่อไป

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพในการย่อย สลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)	ไอโซเลท	ประสิทธิภาพในการย่อย สลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)
แบคทีเรีย		ยีสต์	
PT1.9	15.50±0.00	PT1.2	55.30±0.00
PT2.4	10.75±0.35	PT1.6	35.50±0.00
PT2.10	22.00±0.35	PT2.6	10.95±0.35
PT2.15	16.50±0.00	PT2.13	22.00±0.00
PT2.1	20.15±0.35	PT2.19	18.50±0.00
PT3.3	12.00±0.35	PT3.1	31.15±0.35
PT3.4	50.85±0.00	SK3.3	42.00±0.35
PT3.10	10.75±0.35	SK3.4	25.50±0.35
PT3.16	22.00±0.35	SK3.10	30.75±0.35
PT4.1	16.50±0.00	SK3.16	29.00±0.35
PT5.3	24.15±0.35	SK4.1	15.65±0.00
SK2.4	55.50±0.35	SK4.8	12.00±0.35
SK3.10	9.50±0.00	SK4.20	27.15±0.35
SK5.5	28.55±0.35	NS6.8	17.00±0.35
SK5.11	10.75±0.35	NS6.9	9.50±0.00
SK7.3	51.50±0.00	NS6.13	22.35±0.35
SK8.4	27.15±0.35	NS7.0	10.05±0.05

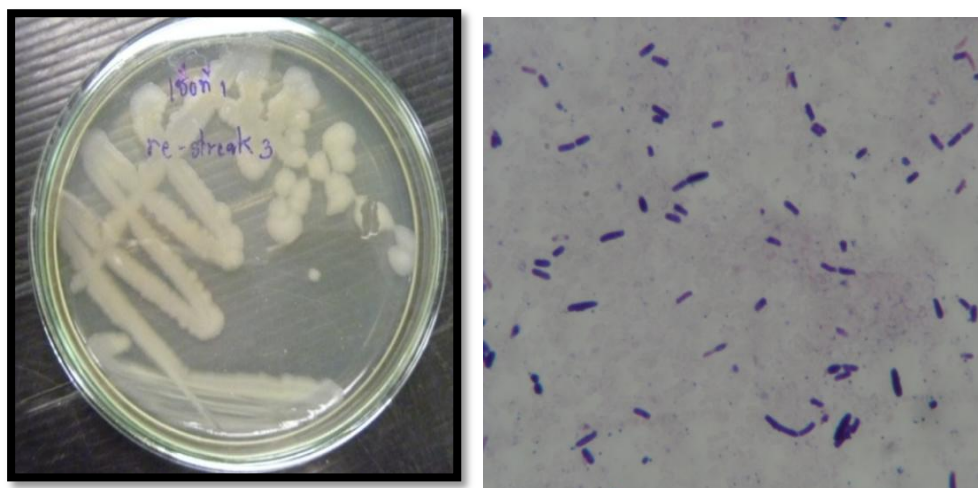
ตารางที่ 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพในการย่อย สลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)	ไอโซเลท	ประสิทธิภาพในการย่อย สลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (%)
แบคทีเรีย		ยีสต์	
SK8.10	18.50 ± 0.35	NS8.5	11.95 ± 0.00
SK8.16	11.55 ± 0.00		
SK9.1	20.15 ± 0.35		
SK9.3	52.00 ± 0.35		
SK9.4	9.50 ± 0.00		
SK9.10	21.15 ± 0.35		
SK9.15	17.85 ± 0.00		
NS1.3	13.60 ± 0.00		
NS2.2	19.10 ± 0.00		
NS2.9	52.00 ± 0.00		
NS3.2	13.50 ± 0.00		
NS3.8	6.50 ± 0.00		
NS4.4	22.30 ± 0.035		
NS4.10	26.33 ± 0.35		
NS5.3	8.65 ± 0.00		
NS5.12	17.85 ± 0.00		
NS5.16	20.00 ± 0.00		
NS6.7	12.33 ± 0.35		
NS6.13	10.99 ± 0.35		
NS6.20	20.50 ± 0.00		
NS7.1	12.45 ± 0.00		

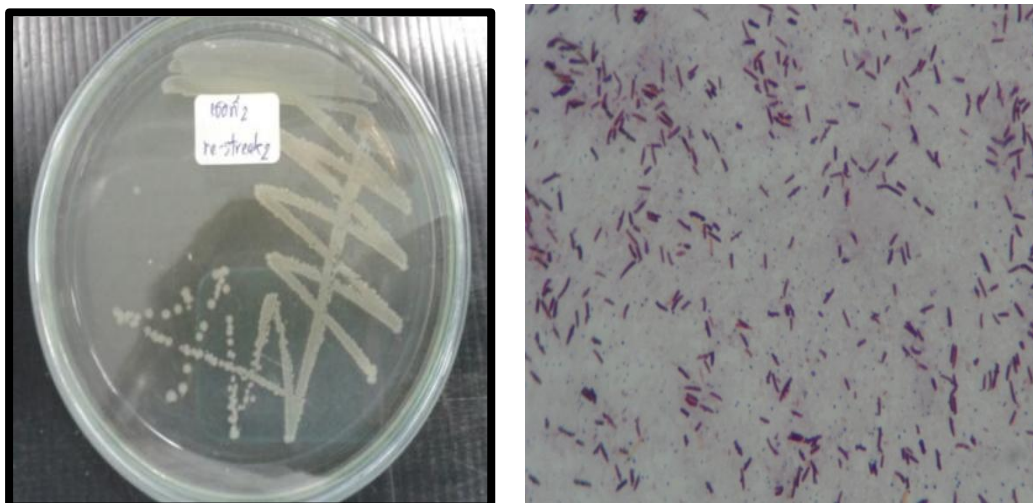
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิด และทำการศึกษาลักษณะเบื้องต้นพบว่า เชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น เป็นมันวาว มีทั้งขอบโคโลนีแบบเรียบ หยัก และแบบกระสวย เมื่อนำมาข้อมสีแกรมแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ WK1 เป็นแบคทีเรียท่อนยาว ติดสีแกรมบวก WK2 เป็นแบคทีเรียท่อนยาว ติดสีแกรมบวก WK3 เป็นแบคทีเรียท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ และ WK4 เป็นแบคทีเรียท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ และอีก 1 ไอโซเลท คือ WK5 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ภาพที่ 11 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ WK6 บนอาหารแข็ง YM เป็นยีสต์รูปร่างไข่ มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ ซึ่งจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันทางอนุโมเลกุล ด้วย 16S rDNA ซึ่งขนาดของผลผลิต PCR ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ประมาณ 450 bp พบว่า WK1 คือ *Bacillus cereus* (homology 98%) WK2 คือ *Bacillus altitudinis* (homology 100%) WK3 คือ *Bacillus amyloliquefaciens* (homology 99%) WK4 คือ *Bacillus subtilis* (homology 100%) WK5 คือ *Serratia* sp. (homology 98%) และ การพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันทางอนุโมเลกุล ด้วย 26S rDNA WK6 ซึ่งขนาดของผลผลิต PCR ของยีสต์ประมาณ 950 bp คือ *Issatchenkia orientalis* (homology 100%)

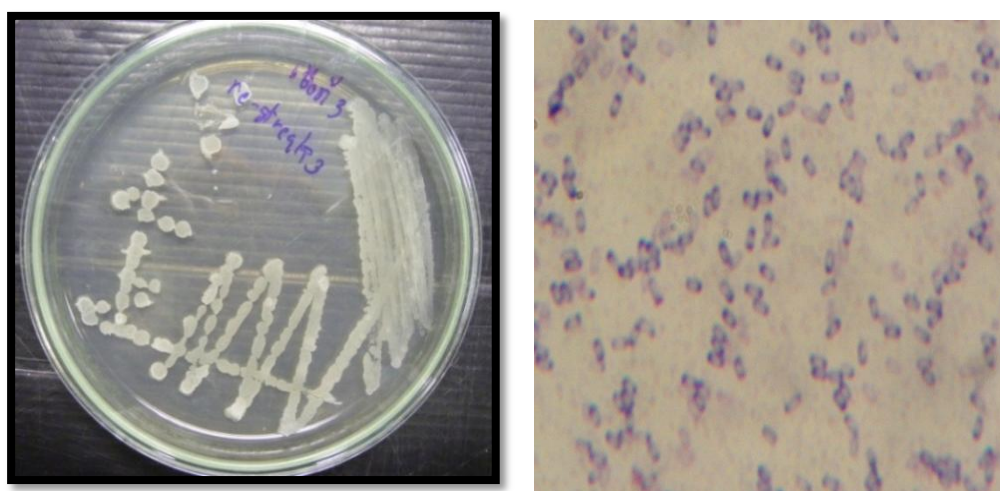
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งและการข้อมติดสีแกรม รวมถึงลักษณะการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของไอโซเลท WK1 WK2 WK3 WK4 และ WK5 แสดงดังภาพที่ 6 ถึง 10 ตามลำดับ



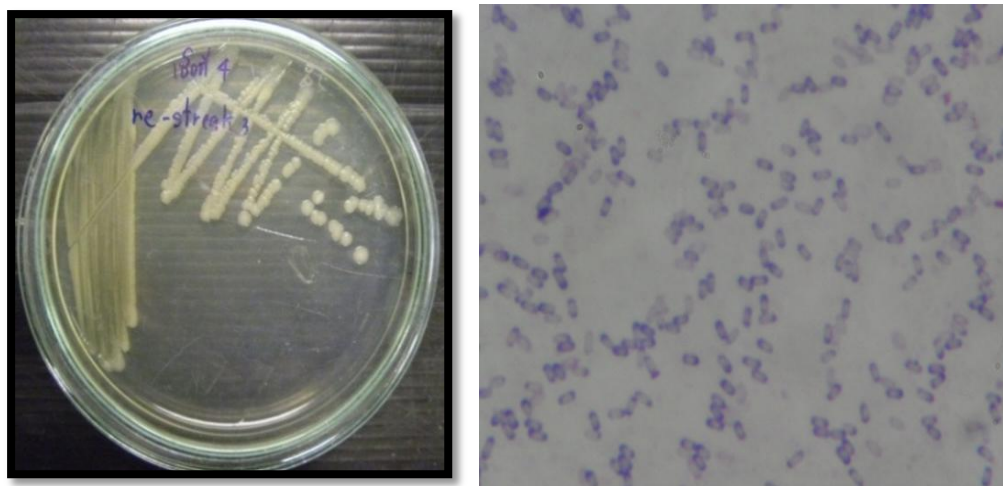
ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X (ขวา)



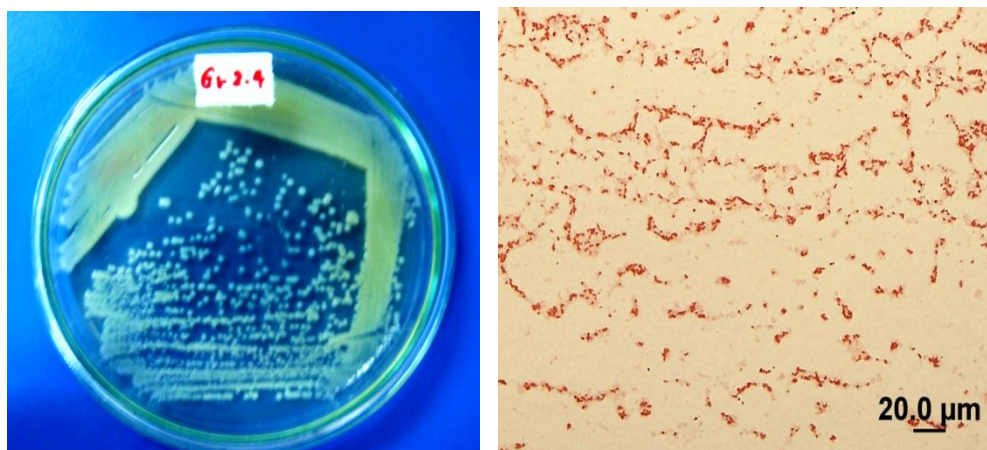
ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X (ขวา)



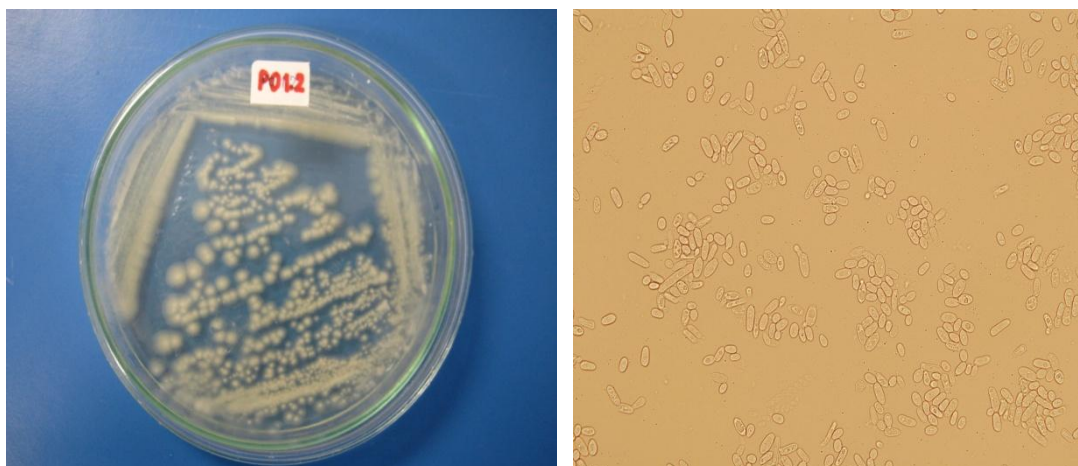
ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X (ขวา)



ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลต WK4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X (ขวา)



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลต WK5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X (ขวา)



ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร YM (ซ้าย) และเชื้อไอโซเลท WK6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400X (ขวา)

4.3 สถานะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและ/หรือประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

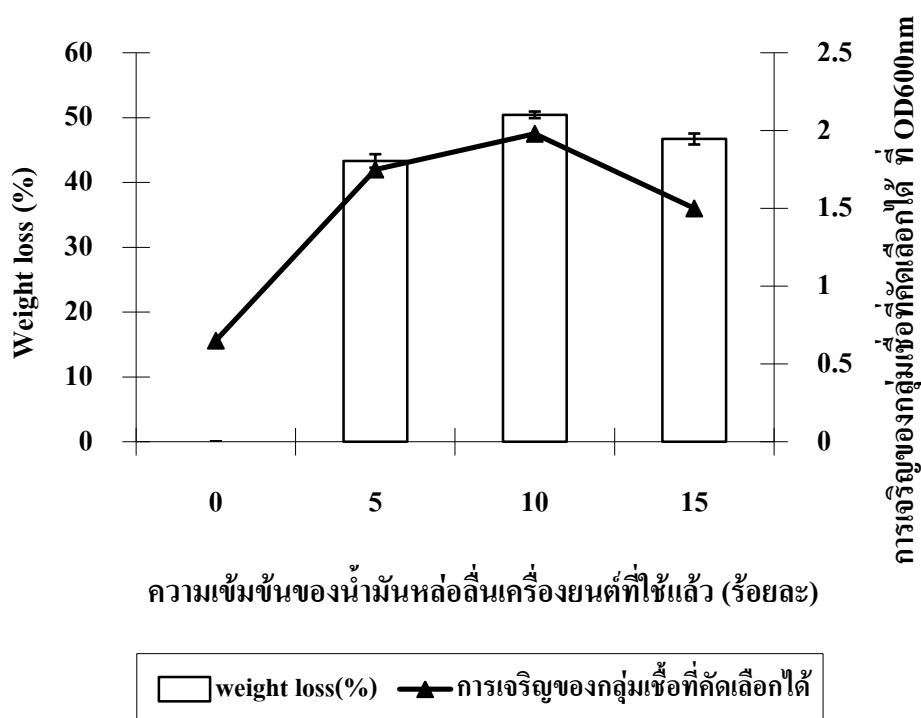
4.3.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสม

จากการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมพบว่าความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (WLO) ร้อยละ 0 5 10 และ 15 อาหาร BSM ที่เติม WLO ทั้ง 3 ความเข้มข้น สังเกตพบว่าน้ำมัน WLO แยกตัวผสมเข้ากับอาหาร เป็นเนื้อเดียวกัน และมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ซึ่งความเข้มข้น WLO ร้อยละ 10 นั้นเชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 50.44 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 ดังนั้นจึงเลือกเติม WLO ร้อยละ 10 ในการทดลองต่อไป เพราะสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วได้มากที่สุด และภาพที่ 12 แสดงการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ที่มีต่อการย่อยสลาย WLO ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ โดยเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ร้อยละ)	Weight loss (ร้อยละ)	
	อุณหภูมิ 37 °C	อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)
0	-	-
5	43.33 ^c	28.17 ^b
10	50.44 ^a	30.53 ^a
15	46.72 ^b	29.00 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับต่างกันในคอลัมน์ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 12 ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ และประสิทธิภาพของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

4.3.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสม

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสม อาหาร BSM ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่าอาหาร BSM ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนน้ำมันจะแตกตัวและผสมเข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นได้จึงมีลักษณะขุ่นและสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 51.33 (ตารางที่ 8) ส่วนอาหาร BSM ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ ร้อยละ 16.12 ดังนั้นจึงเลือกเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร BSM ในการทดลองต่อไป เพราะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว

ตารางที่ 8 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสม โดยเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	Weight loss (ร้อยละ)	
	อุณหภูมิ 37 °C	อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)
ชุดควบคุม	16.12 ^d	10.50 ^c
แอมโมเนียมซัลเฟต	51.33 ^a	30.67 ^b
แอมโมเนียมคลอไรด์	45.00 ^c	39.50 ^a
ยูเรีย	48.67 ^b	32.67 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับต่างกันในคอลัมน์ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.3.3 พื้เอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดย

เชื้อจุลินทรีย์ผสม

จากการศึกษาพื้เอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหาร BSM ที่เติมแหล่ง WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการศึกษาพื้เอชเริ่มต้นที่ 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 พบว่า ลักษณะน้ำมันในอาหาร BSM มีการแตกตัวและลอยอยู่บนอาหาร อาหารจึงมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย และที่พื้เอช เท่ากับ 7 เชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 51.85 ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับพื้เอชเริ่มต้นต่างกัน พบว่าน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เติมลงไปได้หายไปปริมาณเล็กน้อย น่าจะมีสาเหตุมาจากการระเหย หรือการเกิดปฏิกิริยา photochemical oxidation ที่ส่งผลให้น้ำหนักของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหายไป ดังนั้นจึงเลือกทำการปรับพื้เอชเริ่มต้นที่ 7.0 ในการทดลองต่อไป แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 พื้เอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสม โดยเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

พื้เอชเริ่มต้น	Weight loss (ร้อยละ)	
	อุณหภูมิ 37 °C	อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)
6.0	18.25 ^c	19.50 ^c
7.0	51.85 ^a	32.15 ^b
8.0	46.10 ^b	39.67 ^a
9.0	47.18 ^b	32.20 ^b
ชุดควบคุม (6.0)	10.66 ^c	9.86 ^d
ชุดควบคุม (7.0)	12.20 ^d	9.48 ^d
ชุดควบคุม (8.0)	9.33 ^c	7.62 ^c
ชุดควบคุม (9.0)	9.00 ^c	7.84 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับต่างกันในกลุ่มนี้ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.3.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมัน หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสม

จากการศึกษาอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่เดิม WLO ร้อยละ 10 และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 จากนั้นทำการศึกษาอุณหภูมิ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อาหาร BSM น้ำมันแตกตัวและผสมเข้ากับอาหารจึงมีลักษณะขุ่นมาก เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 51.90 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเลี้ยงกลุ่มเชื้อในอุณหภูมิสูงขึ้น คือ 45 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้มากกว่าที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 10 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสม โดยเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เดิม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดลอง	Weight loss (ร้อยละ)		
	อุณหภูมิ 37 °C	อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)	อุณหภูมิ 45 °C
ชุดควบคุม	18.52 ^b	19.33 ^b	19.96 ^b
ชุดทดลอง	51.90 ^a	32.55 ^a	46.67 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับต่างกันในคอลัมน์ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.3.5 ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมัน หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสม

จากการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มี WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน และ แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 จากนั้นศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่ 120 150 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเร็วรอบในการเขย่าทั้งสามความเร็วรอบส่งผลให้น้ำมันจะแตกตัวและผสมเข้ากับอาหาร BSM ได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีลักษณะขุ่นมาก และที่ความเร็วรอบเท่ากับ

150 รอบต่อนาที สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 52.00 แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่า ที่ความเร็วรอบการเขย่า 200 และ 250 รอบต่อนาที สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ไม่แตกต่างกันกับที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แต่เมื่อพิจารณาในด้านการประหยัดพลังงานไฟฟ้าแล้ว จึงเลือกใช้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11 นอกจากนี้ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม แล้วนำไปบ่มในตู้เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณน้ำมันหล่อลื่นหายไปเล็กน้อย ร้อยละ 12.64

ตารางที่ 11 ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสม โดยเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

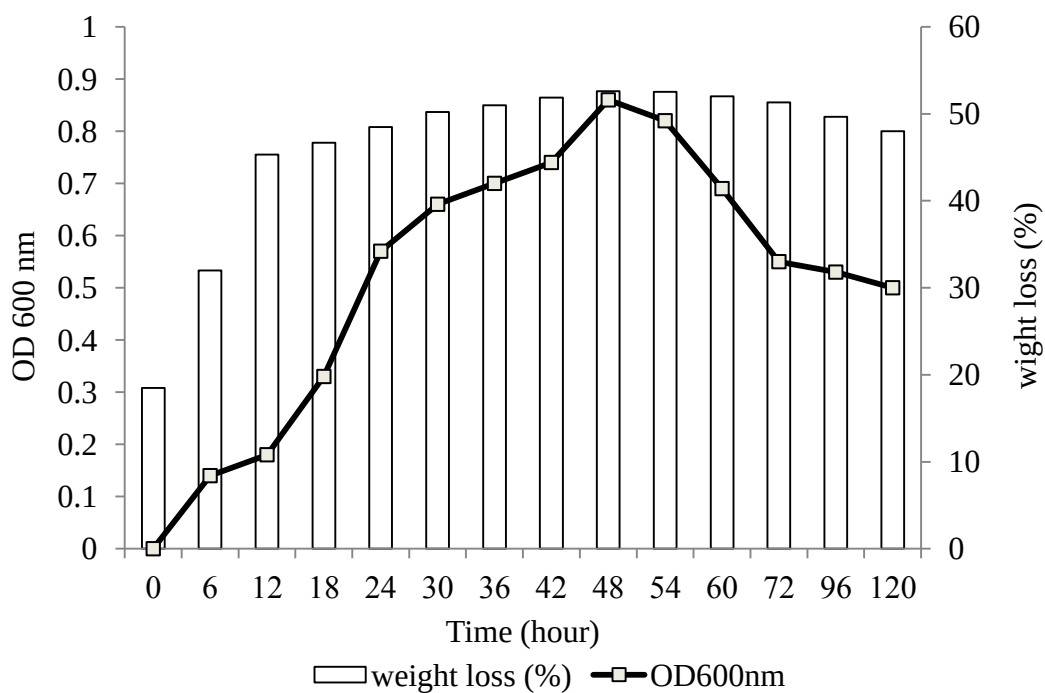
ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบต่อนาที)	Weight loss (ร้อยละ)
120	50.55 ^b
150	52.00 ^a
200	51.87 ^a
250	51.60 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับต่างกันในคอลัมน์ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.3.6 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ และประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

จากการศึกษาการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในอาหาร BSM ที่เติม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 0 6 12 18 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้เริ่มแบ่งเซลล์และเจริญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 48 โดยเจริญได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว กล่าวคือ เชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อย

สลายน้ำมันได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น จนมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีค่า weight loss เท่ากับร้อยละ 52.60 แสดงผลดังภาพที่ 13 หลังจากนั้นการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์จะค่อยๆ ลดลง นอกจากนี้ภาพที่ 14 ยังแสดงลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นว่าเป็นการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์



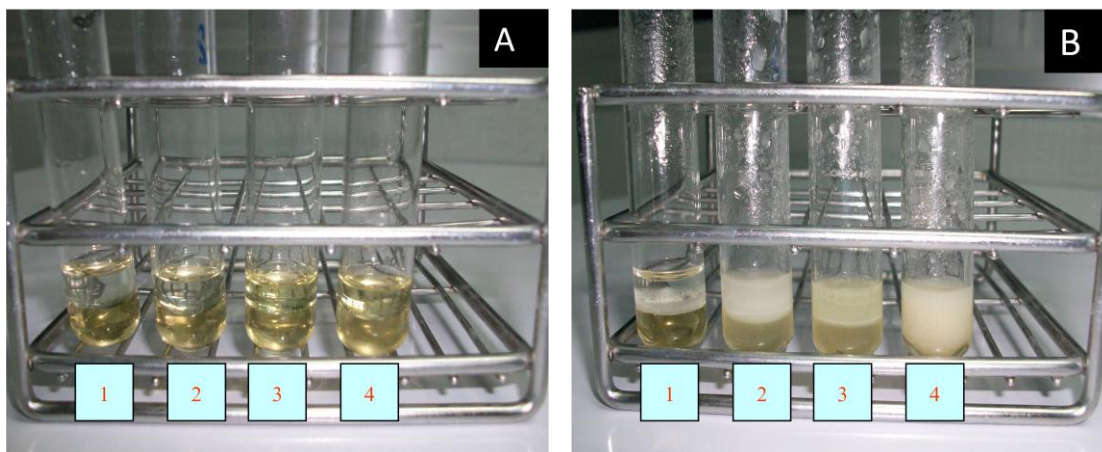
ภาพที่ 13 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ที่มีต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เติม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นที่ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที



ภาพที่ 14 ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X

4.3.7 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้

จากการนำส่วนใสที่ได้จากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4.3.6 มาทดสอบคุณสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) โดยทดสอบสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวด้วยวิธี Oil Displacement Area test (ODA) พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพราะสามารถทำให้น้ำมันดิบ ชนิด Weathered crude oil เกิดการกระจายน้ำมันมีพื้นที่ 11 ตารางเซนติเมตร ในขณะที่ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ (Bioemulsifier) ต่อน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันก๊าด (kerosene) น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีความสามารถในการสร้างสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพกับน้ำมันรำข้าว ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 15) นอกจากนี้ในตารางที่ 12 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ต่อสารละลายต่างๆ ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว จากผลการทดลองกล่าวได้ว่า เชื้อจุลินทรีย์ผสมนี้นอกจากจะสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ยังผลิตสารลดแรงตึงชีวภาพได้อีกด้วย



ภาพที่ 15 การทดสอบ Emulsification Activity (%EA) ที่เวลา 0 นาที (A) และที่เวลา 10 นาที (B)

หมายเหตุ 1 คือ น้ำมันก๊าด (kerosene) 2 คือ น้ำมันถั่วเหลือง
 3 คือ น้ำมันปาล์ม 4 คือ น้ำมันรำข้าว

ตารางที่ 12 กิจกรรมการเกิดอิมัลชันของส่วนใส (Culture supernatant) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อตัวทำละลายต่างๆ

ชนิดน้ำมัน	% EA	%EI
kerosene	0	0
xylene	30.00	20.00
น้ำมันถั่วเหลือง	52.94	27.78
น้ำมันปาล์ม	47.06	23.53
น้ำมันรำข้าว	58.82	29.41

หมายเหตุ ส่วนใสที่นำมาทดสอบ ใช้ที่เวลา 48 ชั่วโมง

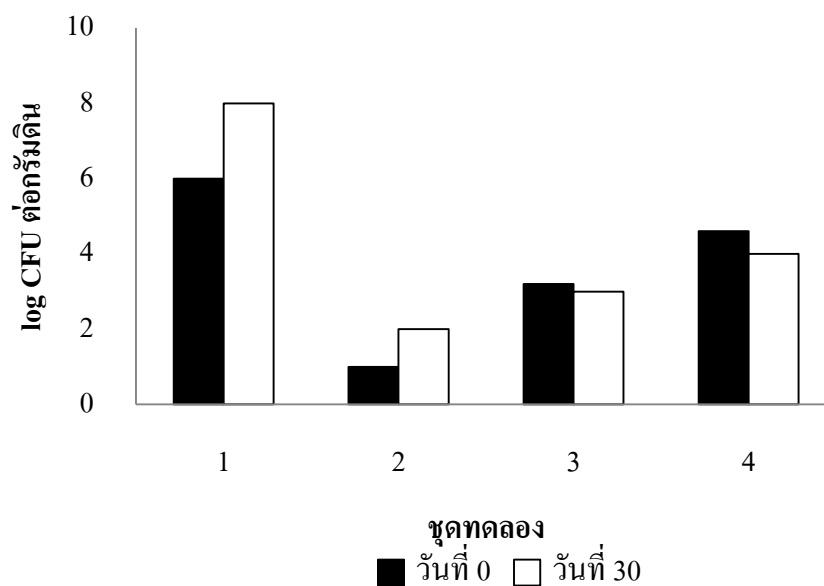
%EA (Emulsification Activity) หมายถึง กิจกรรมของการเกิดอิมัลซิไฟด์เออร์ เป็นเวลา 10 นาที

%EI (Emulsification Index) หมายถึง กิจกรรมของการเกิดอิมัลซิไฟด์เออร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4 ประสิทธิภาพในการกำจัดและบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในพื้นที่จำลองดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

นำดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมาเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 10 กรัม ต่อ 100 กรัมดิน และเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ให้มีจำนวนเชื้อ 10^6 CFU ต่อกรัมดิน จากภาพที่ 16 พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ในชุดการทดลองที่ 1 มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจากวันเริ่มต้น ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วน้อยมาก ส่วนชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ใช้ดินที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วลดลงอย่างมาก

นอกจากนี้ผลการประยุกต์ใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินทั้ง 4 ชุดการทดลอง ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี weight loss ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 10^6 CFU ต่อกรัมดิน ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุด คือร้อยละ 48.67 รองลงมาได้แก่ชุดทดลองที่ 4 ซึ่งใช้ดินไม่ฆ่าเชื้อแล้วเติม กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุด ร้อยละ 41.33 ในขณะที่ชุดควบคุม คือชุดการทดลองที่ 2 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้เท่ากับร้อยละ 16.50 ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 13



ภาพที่ 16 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ที่ 0 และ 30 วัน ของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินของชุดทดลองต่างๆ

หมายเหตุ ชุดการทดลอง 1 หมายถึง ดินฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + เชื้อจุลินทรีย์ผสม

ชุดการทดลอง 2 หมายถึง ดินฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

ชุดการทดลอง 3 หมายถึง ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

ชุดการทดลอง 4 หมายถึง ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + เชื้อจุลินทรีย์ผสม

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในในวันที่ 30

ชุดทดลอง	Weight loss (%)
1	48.67 ^a
2	16.50 ^c
3	39.67 ^b
4	41.33 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับต่างกันในกลุ่มนี้ หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอน จำพวกน้ำมันดิบ และน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง ได้แก่จังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 56 ไอโซเลทที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร MSM ที่เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยเป็นเชื้อแบคทีเรีย 38 ไอโซเลท และเป็นเชื้อยีสต์ 18 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลทซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้มากกว่าร้อยละ 50 จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ทั้ง 6 ไอโซเลทมาตั้งรหัดใหม่ โดยแบคทีเรียไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท WK1 WK2 WK3 WK4 และ WK5 และเชื้อยีสต์ 1 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท WK6 แล้วนำจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทไปจำแนกโดยการหาลำดับดีเอ็นเอ ผลของลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งพบว่า เชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีรูปร่างค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น เป็นมันวาว มีทั้งขอบโคโลนีแบบเรียบ หยัก และแบบกระสวย เมื่อนำมาข้อมสีแกรมแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ WK1 เป็นแบคทีเรียท่อนยาว ดิคสีแกรมบวก WK2 เป็นแบคทีเรียท่อนยาว ดิคสีแกรมบวก WK3 เป็นแบคทีเรียท่อนสั้น ดิคสีแกรมบวก สร้างสปอร์ และ WK4 เป็นแบคทีเรียท่อนสั้น ดิคสีแกรมบวก สร้างสปอร์ และอีก 1 ไอโซเลท คือ WK5 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนั้นลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ WK6 บนอาหารแข็ง YM เป็นยีสต์รูปร่างไข่ มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ ซึ่งจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันทางอนุโมเลกุล ด้วย 16S rDNA พบว่า WK1 คือ *Bacillus cereus* WK2 คือ *Bacillus altitudinis* WK3 คือ *Bacillus amyloliquefaciens*, WK4 คือ *Bacillus subtilis* WK5 คือ *Serratia* sp. และการพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันทางอนุโมเลกุล ด้วย 26S rDNA WK6 คือ *Issatchenkia orientalis* ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของจิตติมา (2551) ที่ศึกษาวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพด้วยการใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยจุลินทรีย์จะใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงาน จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่มีการปนเปื้อนด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ได้แก่ *Acinetobacter* sp. *Pseudomonas* sp. *Nocardia* sp. *Rhodococcus* sp. *Gordonia terrae* และ *Ralstonia* sp. นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของฟิรกันดี และคณะ (2550) ซึ่งรายงานว่าสามารถแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน ซึ่งเป็นการรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน โดยเฉพาะการปนเปื้อน

น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วแหล่งการเก็บตัวอย่างการวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 แหล่ง คือ แหล่งเก็บตัวอย่างธรรมชาติ เช่น น้ำพุร้อนและป่าอนุรักษ์ และแหล่งเก็บตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเครื่องใช้แล้ว เช่น บริเวณอุโมงค์มรดกและสถานีเติมน้ำมัน พบเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายคราบน้ำมัน จากตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณน้ำพุร้อนจำนวน 3 ไอโซเลทเป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 22 ไอโซเลท และจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน 8 ไอโซเลท และพบจำนวนจุลินทรีย์จากบ้านโป่งจำนวน 38 ไอโซเลท (SA1-SA38) จากห้วยโจ้ จำนวน 40 ไอโซเลท (PW1-PW40) จุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำมันโดยวิธี Partition gravimetric method และวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยน้ำมันในกลุ่มไฮโดรคาร์บอนด้วยกระบวนการทางชีวเคมี คือ การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสในเบื่องค์ดิน พบจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายน้ำมัน จำนวน 10 ไอโซเลท

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี weight loss ผลการทดลองพบว่าในอาหาร BSM ที่เติม WLO ร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 0 6 12 18 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้เริ่มแบ่งเซลล์และเจริญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 48 โดยเจริญได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว กล่าวคือ เชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น จนมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีค่า weight loss เท่ากับร้อยละ 52.60 แสดงผลดังภาพที่ 13 หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสมจะค่อยๆ ลดลง อีกทั้งเมื่อนำส่วนใสที่ได้จากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมมาทดสอบคุณสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) โดยทดสอบสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวด้วยวิธี Oil Displacement Area test (ODA) พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพราะสามารถทำให้น้ำมันดิบชนิด Weathered crude oil เกิดการกระจายน้ำมันมีพื้นที่ 11 ตารางเซนติเมตร ในขณะที่ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ (Bioemulsifier) ต่อน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันก๊าด (kerosene) น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ผสมมีความสามารถในการสร้างสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพกับน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุด นอกจากนี้ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ต่อสารละลายต่างๆ ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว กล่าวได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ผสมนี้

นอกจากจะสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ยังผลิตสารลดแรงตึงผิวภาพได้อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zinjarde และ Pant (2002) ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์จากตัวอย่างโคลนและน้ำจากระอบ ๆ ท่าเรือ Mumbai จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียและยีสต์ได้ 17 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์ให้ผลการย่อยสลายน้ำมันมากกว่าร้อยละ 10 ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* สามารถย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbons ในน้ำมันดิบได้ดีที่สุด โดยเพิ่มแหล่งไนโตรเจนและอัตราการให้อากาศที่แตกต่างกัน คือ 0 50 100 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด และอัตราการให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย สารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบได้สูงถึงร้อยละ 78

เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้มาประยุกต์ใช้ในการทดลองที่ 1 คือดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจากวันเริ่มต้น ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 คือดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 แต่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วน้อยมาก ส่วนชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ใช้ดินที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วลดลงอย่างมาก

นอกจากนี้ผลการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินทั้ง 4 ชุดการทดลอง ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี weight loss ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ 10^6 CFU ต่อกรัมดิน ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุด คือร้อยละ 48.67 รองลงมาได้แก่ชุดทดลองที่ 4 ซึ่งใช้ดินไม่ฆ่าเชื้อแล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้ ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุด ร้อยละ 41.33 ในขณะที่ชุดควบคุม คือชุดการทดลองที่ 2 สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้เท่ากับร้อยละ 16.50 ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ จิตติมา (2551) ที่ทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9 พบว่า ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 98 หลังจากการย่อยสลาย 30 วัน โดยค่าประสิทธิภาพที่สูงนี้เนื่องจากการทดลองของจิตติมา (2551) การปรับสภาวะที่เหมาะสม คือปรับระดับความชื้นในดินเท่ากับร้อยละ 17 เติมน้ำอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสโดยให้มีอัตราส่วนของคาร์บอนไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 300:10:1 อีกทั้งยังสอดคล้องกับรายงานของ Dave *et al.* (1994) ที่ศึกษาการย่อยสลายกากน้ำมัน (Slop Oil) โดยใช้เทคนิค Bioaugmentation ที่มีการเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 7 สายพันธุ์ ลงในดินที่มีการปนเปื้อน Slop oil หลังจาก 30 วัน พบว่าการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย Slop Oil ได้ร้อยละ 70 ขณะที่การย่อยสลายโดยอาศัยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในดินมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพียงร้อยละ

40 ซึ่งสอดคล้องกับ Vasudevan and Rajaram (2001) ซึ่งศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยการใช้เทคนิค Bioaugmentation พบว่าการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40 หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 90 วัน และเมื่อเติมสารอาหารอนินทรีย์ร่วมกับการเติมกล้าเชื้อจะให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายร้อยละ 65 นอกจากนี้ Bento *et al.* (2003) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลโดยการใช้เทคนิค Bioaugmentation Biostimulation และ Attenuation พบว่าเทคนิค Bioaugmentation มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีกว่าเทคนิคอื่นๆ โดยสามารถย่อยสลายในส่วนของ $C_{12}-C_{23}$ ได้ร้อยละ 75 และส่วนของ $C_{23}-C_{40}$ ได้ร้อยละ 73 หลังจาก 12 สัปดาห์ของการบ่ม แต่อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดและบำบัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้

บทที่ 6

ผลผลิต

6.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

Klawech W., Yeunyong A. and Chaipolrit P. Biodegradation of waste lubricating oil by *Bacillus subtilis*. **African Journal of Biotechnology**. 5 June 2013 Vol. 12(23), pp. 3685-3688.
DOI: 10.5897/AJB2013.12274

6.2 การประชุมนำเสนอผลงานวิชาการระดับชาติ และนานาชาติ

วิชุดา กล้าเวช, ดวงกมล ทองกัน และพีระพรรณ สุดวุ่น. 2556. การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ประจำปี 2556. ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี สงขลา. 22-25 พฤษภาคม 2556. หน้า 805-811. (แบบโปสเตอร์)

วิชุดา กล้าเวช, เกตนภาพร กองเมือง และพิมพกา บุญรอด. 2556. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว. ในการประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 6-7 ธันวาคม 2556. หน้า 371-378. (แบบบรรยาย)

รายงานสรุปการเงิน
เลขที่โครงการ 2555A10562006
โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
มหาวิทยาลัยทักษิณ
การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์
ที่ใช้แล้ว

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ดร. วิชุดา กล้าเวช

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 พฤษภาคม 2555 ถึงวันที่ 30 ตุลาคม 2556

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 17 พฤษภาคม 2555 ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน 2556

รายจ่าย

หมวด	งบประมาณ รวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย งวดปัจจุบัน	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน			
2. ค่าจ้าง	31,760	31,800	-40
3. ค่าวัสดุ	60,000	60,000	0
4. ค่าใช้สอย	50000	50,000	0
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	8,240	8,300	-60
- ค่าจัดทำรูปเล่มร่าง รายงานฉบับสมบูรณ์			
- ค่าจัดทำรูปเล่มร่าง รายงานฉบับสมบูรณ์			
- ค่าหมึกพิมพ์			
- ค่ากระดาษ			
- ค่าไปสเตอร์ในการ นำเสนอผลงาน			
รวม	150,000	150,100	-100

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	75,000 บาท	เมื่อ พฤษภาคม 2555
งวดที่ 2	60,000 บาท	เมื่อ พฤศจิกายน 2555
งวดที่ 3	-	เมื่อ -
รวม	135,000	

.....
()

หัวหน้าโครงการวิจัย
วันที่ 27 ธันวาคม 2556

.....
()

เจ้าหน้าที่การเงินโครงการวิจัย
วันที่ 27 ธันวาคม 2556

บรรณานุกรม

- Atagana, H. I., Haynes, R. J. and Wallis, F. M. 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation*. 14: 297–307.
- Atlas, R. M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Technol. Biol.* 52 : 149-156.
- Baker, H. K. and Diane, S. H. 1994. Bioremediation. *In Environmental Microbiology Associates*. p. 10-259. McGraw-Hill, New York.
- Braddock, J. F., Ruth, M. L. and Catterall, P. H. 1997. Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils : implications for nutrient-amended bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 31 : 2078–2084.
- Bento, F. M., Camargo F. A. O., Okeke B. and Frankenberger-Júnior, W. T. 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz. J. Microbiol.* 34 : 65-68.
- Cerniglia, Carl E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Biodegradation*. 3: 351-368.
- Cooper, D.G. and Goldenberg, B.G. 1987. Surface active agents from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 224-229.
- Dave, H., Ramakrishna, C., Bhatt, B. D. and Desai, J. D. 1994. Biodegradation of slope oil from petroleum industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10 : 653-656.
- Dibble, J. T. and Bartha, R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 : 729-739.
- Forsyth, J. V., Tsao, Y. M. and Bleam, R. D. 1995. Bioremediation: when is augmentation needed. *In Bioaugmentation for Site Remediation*. (Hinchee, R. E., Fredrickson, J., Alleman, B. C., eds). p. 1–14. Battelle Press, Columbus.
- Fritsche, W. and Hofrichter, M. 2000. Aerobic degradation by microorganisms : principles of bacterial degradation. *In Biotechnology Environmental Processes II*. Vol. IIb. (Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, A., eds). p. 145-167. Wiley-Vch Verlage, Weinheim.
- Galvis, L. A. B., Bernal, D. A., Valdivia, A. C. R. and Dendooven, L. 2006. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline–alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*. 62 : 1749–1760.

- Healy, M. G., Devine, C. M. and Murphy, R. 1996. Microbial production of biosurfactants. Res. Conserv. Rec. 18 : 41-57.
- Iwamoto, T and Nasu, M. 2001. Current bioremediation practice and perspective (review). J. Biosci. Bioeng. 92 : 1-8.
- Jirasripongpun, K. 2002. The characterization of oil degrading microorganism from lubricating oil contaminated (scale) soil. Letters in Appl. Microbiol. 35: 296–300.
- Jobson, A., Cook, F. D. and Westlake, D. W. S. 1972. Microbial utilization of crude oil. Appl. Microbiol. 22 : 1082-1089.
- Katamai, W., Maneerat, S., Kawai, F., Kanzaki, H., Nitoda, T. and H-Kittikun, A. 2008. Purification and Characterization of a Biosurfactant Produced by *Issatchenkia orientalis* SR4. Journal of General Applied Microbiology. 54: 79-82.
- Liang, J., Wang, X., GU, Z., De, L. Z. and XIE, S.Q. 2006. Biodegradation of lubricating oil in wastewater with *Zoogloea* sp". Soil Science Society of China. 16 (4): 540-544.
- Mercadé, M. E., Monleón, L., de Andeés, C., Rodón, I., Martinez, E., Espuny, M. J. and Manresa, A. 1996. Screening and selecting of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. J. Appl. Bacteriol. 81 :161-166.
- Trindade, P. V. O., Sobral, L. G., Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F. and Soriano, A. U. 2005. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil : a comparison study. Chemosphere. 58 : 515-522.
- Vasudevan, N. and Rajaram, P. 2001. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. Environ. Inter. 26 : 409-411.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M. and McInerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J. Microbiol. Meth. 56 : 339–347.
- Zinjarde, SS. and Pant, AA. (2002). Hydrocarbon degrades from tropical marine environmental. Mar. Pollut.Bull. 44:118-121.
- จิตติมา แก้วเรือง(2551).การแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ในดิน.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จิราภรณ์ สุขุมวาสี พวงเพ็ญ สุชนันท์ สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ และวัลลภา อรุณไพโรจน์. 2537. การคัดเลือกและจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติย่อยสลายน้ำมัน. สืบค้นเมื่อ 2 กรกฎาคม 2551 จาก<http://www.lib.sit.tu.ac.th/cgi-bin/gw-43-3/>.

ธนรุจน์ บุญช่วย. 2550. วัสดุดูดซับและย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียจากดิน.

สืบค้นเมื่อ 2 กรกฎาคม 2551 จาก http://www.dailynews.co.th/web/html/popup_news/.

ปัญจพล ชีโนดม. 2543. การสร้างกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายน้ำมันดิบ. สืบค้นเมื่อ 2

กรกฎาคม 2551 จาก <http://www.tkc.go.th/thesis/abstract.asp>

พงศธร ประภักกรางกุล. (2551). การย่อยสลายคราบน้ำมันโดยจุลินทรีย์. สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2555, จาก <http://www.tistr.or.th>.

พืรงานต์ บรรเจิดกิจ สมคิด ดีจริงและรัฐพล จันทรเดช. (2550). การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน. ปริญญานิพนธ์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

วิชุดา เกตุใหม่ และ เครือมาศ ขงทะเล. 2551. การกำจัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์. ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35. เดอะ ไทด์ รีสอร์ท จังหวัดชลบุรี. วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552.

วิชุดา เกตุใหม่ เสาวภา แก้วสุกใสและลีษา แขนา. 2551. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว. ในการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 19. โรงแรม เจ บี หาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา. วันที่ 24-25 กันยายน 2552.

ศุภศิลา มณีรัตน์. (2552). การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ใน Soil slurry. งานวิจัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สอึง จักขุศิลา. (2542). “เทคโนโลยีการทำความสะอาดดิน”. วารสารการตลาดไฟฟ้าเครื่องกล

อิเล็กทรอนิกส์ เทคโนโลยีอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม. 10 (113). หน้า 39-41.

เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ: เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. มหาวิทยาลัยมหิดล โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน. นครปฐม. 212 หน้า.

สมควร ไข่แก้ว. 2545. ผลกระทบของน้ำมันและสารเคมีจัดคราบน้ำมันต่อกิ้งกูดดำ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อลิสรา วังใน. 2553. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 351 หน้า.

ประวัตินักวิจัย

- | | |
|-------------------|--|
| ชื่อ-สกุล | นางวิชาดา กล้าเวช |
| คุณวุฒิ/สาขา | ปร. ค. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ : 2551
วท. ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง : 2546
วท. บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยขอนแก่น : 2543 |
| ตำแหน่งทางวิชาการ | อาจารย์ |
| ผลงานทางวิชาการ | |
| งานวิจัย | |
- วิชาดา กล้าเวช, ดวงกมล ทองกัน และพีระพรรณ สุกวุ่น. 2556. การย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยจุลินทรีย์. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ประจำปี 2556. ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี สงขลา. 22-25 พฤษภาคม 2556. หน้า 805-811. (แบบโปสเตอร์)
- วิชาดา กล้าเวช, เกตนภาพร กองเมือง และพิมพ์ภา บุญรอด. 2556. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว. ในการประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 6-7 ธันวาคม 2556. หน้า 371-378. (แบบบรรยาย)
- Klawech, W. Yeunyong, A. and Chaipolrit, P. (2013). Biodegradation of waste lubricating oil by *Bacillus subtilis*. African Journal of Biotechnology. 12(23): 3685-3688.
- Katamai, W. (2012). Biosurfactant from yeasts. Walailak Journal of Science and Technology. 9(1): 1-8.
- วิชาดา เกตุใหม่ เสาวภา แก้วสุกใส และลีชา แชนา. (2553). การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 12 (3) : 202-213.
- Katamai, W. and Yongtalay, K. (2010). “Waste Lubricating Oil-Biodegrading Microorganisms,” Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010). (page 73). March 4-6, 2010. Royal Mekong Nongkhai Hotel, Nong Khai, Thailand.
- วิชาดา เกตุใหม่ เสาวภา แก้วสุกใส และลีชา แชนา. (2552). “การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว,” ในรายงานการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 19. (หน้า 96-97). วันที่ 24-25 กันยายน 2552. ณ โรงแรม เจ บี. จังหวัดสงขลา.

- Katamai, W., Maneerat, S., Kawai, F., Kanzaki, H., Nitoda, T. and H-Kittikun, A. (2008). Purification and Characterization of a Biosurfactant Produced by *Issatchenkia orientalis* SR4. *Journal of General Applied Microbiology*. 54: 79-82.
- Katamai, W., Maneerat, S., Kawai, F. and H-Kittikun, A. (2006). Isolation and screening of biosurfactant producing-yeast from oil contaminated soils. *Annual Report 2006*. Research Institute for Bioresources, Okayama University. 55p.