

รายงานการวิจัย

การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันในประเทศไทย
Bioremediation of oil-polluted water in Thailand

นายอรรณพ อิมพัลทรัพย์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สัญญาเลขที่ RSA13/2537 ลงวันที่ ๑ ธันวาคม ๒๕๓๗

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนเมธีวิจัย ระยะเวลา ๓ ปี (พ.ศ. ๒๕๓๘-๒๕๔๐) ตามสัญญาเลขที่ RSA13/2537 ลงวันที่ ๑ ธันวาคม ๒๕๓๗ ศาสตราจารย์วิทยา มีภูมิสม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประยัด โภคจิตติยุกต์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์สุเทพ ไวยครุฑธา ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดการวิจัย และยังเป็นคณะกรรมการที่ปรึกษาและสอบป้องกันวิทยานิพนธ์แก่นางสาวกุลวดี ทองภูเบศร์ ซึ่งเป็นผู้ช่วยทำการวิจัยนี้โดยตลอด บริษัทบางจากปิโตรเลียม จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันดิบ Tapis ที่ใช้ตลอดในการวิจัย และคุณจงโปรด คชภูมิ เจ้าหน้าที่ส่วนเทคนิคและสิ่งแวดล้อม โรงกลั่นบางจาก ที่ให้ความช่วยเหลือประสานงานด้านบ่อบำบัดน้ำเสีย และน้ำตัวอย่างจากบ่อบำบัด นายเลิศศักดิ์ คงศักดิ์และนางสาวพุดตาน ไสริย์ ผู้ช่วยวิจัยในระยะเวลาต่างระหว่างการวิจัย

บทคัดย่อ

ในการศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันดิบของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งแยกได้จากสิ่งแวดล้อม จำนวน ๑๒๗ ชนิด โดยคัดเลือกในอาหาร Bushnell & Haas (BH) ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ ๑ และตรวจวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ โดยใช้ Capillary Gas Chromatography และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count พบว่า กลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง คือ M14 เมื่อทำการจำแนกชนิด พบว่า M14 ประกอบด้วยแบคทีเรีย ๗ ชนิด โดยมี M14-07 (*Acinetobacter baumannii*) และ M14-01 (*Pseudomonas aeruginosa*) ในปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดี ตามลำดับ

ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันดิบของจุลินทรีย์ต่าง ๆ คือ M14-01 และ M14-07 ที่เลี้ยงร่วมกัน, กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีในบ่อน้ำมันของโรงกลั่นน้ำมันบางจาก และยีสต์ MU15Y ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบได้ดี พบว่า ผลการย่อยสลายน้ำมันดิบไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕

การศึกษาการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนอิมิตัวชนิดต่าง ๆ พบว่า ได้ผลการย่อยสลายเรียงลำดับก่อนหลังและมากน้อย ดังนี้ ไฮโดรคาร์บอนอิมิตัว ชนิดสายตรงสั้น, ชนิดสายตรงยาว และ ชนิดแขนง ตามลำดับ

ในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์กลุ่ม M14 โดยเฉพาะ M14-01 และ M14-07 พบว่า พีเอช ๘, ความเข้มข้นของน้ำมันดิบร้อยละ ๐.๕ อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็น ๒.๕ และ ๕.๐ กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีที่สุดของสภาพการศึกษา โดยมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดและไฮโดรคาร์บอนอิมิตัว C9-C33 ลดลงร้อยละ ๙๓.๕ และ ๙๙.๕ ในเวลา ๔ วัน ในการศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมันบางจากในหอดูดลอง พบว่า การเติมจุลินทรีย์ M14-01 และ M14-07 ร่วมกับการเติมสารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสดังกล่าวข้างต้น ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันในน้ำเสียดีกว่าการเติมจุลินทรีย์หรือสารอาหารเพียงอย่างเดียว และดีกว่าการไม่เติมเลย ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕

Abstract

From a primary screening, 127 isolates of oil degrading bacteria were collected from the environment. Mixed culture of M14 was eventually obtained by the mean of sequential screening in Bushnell & Haas supplemented with 1 % Tapis crude oil. Oil degrading activity was determined by a capillary gas chromatography. Growth of microorganism was measured by the plate count technique on Nutrient Agar medium. Two strains of 7 isolates in M14 mixed culture were found to be predominant and identified as *Pseudomonas aeruginosa* (M14-01) and *Acinetobacter baumannii* (M14-07).

To improve the efficiency of the crude oil biodegradation, the optimum parameters were pH8, 0.5 % Tapis crude oil, 2.5 g/l nitrogen, 0.5 g/l phosphorus, 30 °C. In such optimum condition, total and C9-C33 hydrocarbons were degraded approximately 93.5 % and 99.5 %, respectively on day 4. Bioremediation of wastewater taken from Bangchak oil refinery by seeding (M14-01 and M14-07 mixed culture) and nutrient addition (2.5 g/l N and 0.5 g/l P) improved the efficiency of oil degradation, in comparison with either seeding or nutrient addition alone or the control (no seeding, no nutrient addition). In addition, the investigation of the biodegradation of 0.1 g mixed hydrocarbons showed that alkanes were degraded in the following order : shorter straight chain, longer chain and branched chain.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
ABSTRACT	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
วัสดุและวิธีการทดลอง	6
น้ำมันดิบ	6
จุลินทรีย์	6
อาหารเลี้ยงเชื้อ	7
Bushnell - Haas (BH)	7
Yeast extract-Peptone-Dextrose-Carbenicillin (YPDC)	7
การวิเคราะห์วัดปริมาณจุลินทรีย์	7
การวิเคราะห์วัดค่า optical density	7
การวิเคราะห์วัดปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable plate count)	7
การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนของน้ำมันดิบที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ	7
การสกัดน้ำมันดิบออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ	7
การวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ (hexane soluble fraction) โดยใช้ Gas Chromatography (GC)	8
การคำนวณปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ	8
การวิเคราะห์ทางสถิติ	8

การแยกและการคัดเลือกเชื้อที่ย่อยสลายน้ำมันดิบ	8
ขั้นแรก (primary screening)	8
ขั้นที่ 2 (secondary screening)	9
การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (preculture หรือ seed)	10
สำหรับเชื้อบริสุทธิ์	10
สำหรับเชื้อผสม	10
การศึกษาการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture)	10
การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบของจุลินทรีย์ผสมหลายสายพันธุ์ (mixed culture)	10
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการย่อยสลายน้ำมันดิบ	10
ผลของ pH	10
ผลของอุณหภูมิ	10
ผลของแหล่งคาร์บอน	10
ผลของชนิด n-alkane	10
ผลของความเข้มข้นน้ำมันดิบ Tapis	11
ผลของปริมาณไนโตรเจน	11
ผลของปริมาณฟอสฟอรัส	11
การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบของ mixed culture (M14-01 และ M14-07) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	11
การศึกษาเปรียบเทียบการบำบัดน้ำเสียจากโรงกลั่นบางจาก	11
การเก็บ Stock culture ของเชื้อที่แยกได้	11
Working stock culture	11
Main stock culture	12
ผลการทดลองและการวิจารณ์	13
องค์ประกอบของน้ำมันดิบ Tapis ที่วิเคราะห์โดย GC	13
Abiotic degradation ของ 0.5 % Tapis ในอาหารเหลว BH	16
การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมัน	18
การศึกษาการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture)	20
การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบของจุลินทรีย์ผสมหลายสายพันธุ์ (mixed culture)	23

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการย่อยสลายน้ำมันดิบ	28
ผลของ pH	28
ผลของอุณหภูมิ	30
ผลของแหล่งคาร์บอน	32
ผลของชนิด n-alkane	32
ผลของความเข้มข้นน้ำมันดิบ Tapis	33
ผลของปริมาณไนโตรเจน	35
ผลของปริมาณฟอสฟอรัส	37
การศึกษาเปรียบเทียบการบำบัดน้ำเสียจากโรงกลั่นบางจาก	39
หนังสืออ้างอิง	42
ผลที่ได้ (OUTPUT)	45
ภาคผนวก	46
การตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบ โดยวิธี DCPIP	46
วิธีที่ 1 ดัดแปลงจากวิธีของ Hanson et al., 1993 (modified Hanson et al., 1993)	46
วิธีที่ 2 หยด DCPIP ลงใน culture broth โดยตรง	46

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 Fractionation of Iranian crude oil, Agha Jari	3
ตารางที่ 2 Major Genera of Oil-Degrading Bacteria and Fungi from Marine and Brackish Water Environment.....	4
ตารางที่ 3 แสดงรหัส สถานที่เก็บตัวอย่าง	6
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณที่เหลือของ C9-C13 ในอาหารเหลว BH + 0.5 % Tapis (control) ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าแบบ หมุนวน 200 รอบต่อนาที.....	16
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณ hydrocarbon ที่เหลือในอาหารเหลว BH + 0.5 % Tapis (control) ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าแบบ หมุนวน 200 รอบต่อนาที.....	16
ตารางที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์และโคไลของแบคทีเรีย กลุ่ม M14 ที่เลี้ยงใน BH broth + 1 % Tapis อุณหภูมิ 30 °C เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที	18
ตารางที่ 7 แสดงผลการทดลองทางชีวเคมีและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย กลุ่ม M14.....	19
ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันดิบของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และจุลินทรีย์ผสม.....	26
ตารางที่ 9 ผลของ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis + 0.1M ของ buffer ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).....	30
ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis + 0.1M phosphate buffer pH8 เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).....	32
ตารางที่ 11 การย่อยสลายของ alkane ชนิดต่าง ๆ (0.1 g total weight) โดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH ซึ่งมี 0.1M phosphate buffer pH8 ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อ นาที).....	32
ตารางที่ 12 ผลของปริมาณน้ำมันดิบต่อการย่อยสลายน้ำมันโดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis + 0.1M phosphate buffer, pH 8 ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).....	35
ตารางที่ 13 ผลของปริมาณไนโตรเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis + 0.1M phosphate buffer, pH8 ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).....	37
ตารางที่ 14 ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).	39
ตารางที่ 15 การบำบัดน้ำเสียจากบ่อแยกน้ำมันของโรงกลั่นบางจาก (เจือจาง 1/4 เท่า ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).	41

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แผนผังการแยกและคัดเลือกเชื้อย่อยสลายน้ำมันดิบ ขั้นที่ 2 (secondary screening)	9
รูปที่ 2 แสดง GC chromatogram ของน้ำมันดิบ Tapis ส่วนที่ละลายได้ใน hexane.....	14
รูปที่ 3 GC chromatogram ของ standard n-alkane	15
รูปที่ 4 GC chromatogram ของน้ำมันดิบที่เหลือในอาหารเหลว BH ที่ไม่ได้ใส่จุลินทรีย์ (control flask) ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที	17
รูปที่ 5 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของ M14-07 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่า แบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	20
รูปที่ 6 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของ M14-01 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่า แบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	21
รูปที่ 7 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของ MR1/7-011 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	22
รูปที่ 8 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของยีสต์ MU15Y ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	22
รูปที่ 9 การเจริญเติบโตของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่าแบบ หมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	23
รูปที่ 10 การย่อยสลายน้ำมันดิบ Tapis ของเชื้อผสมกลุ่มต่าง ๆ เทียบกับเชื้อบริสุทธิ์ M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	24
รูปที่ 11 การเจริญเติบโตของเชื้อผสม M14-01, M14-07 และ MU15Y ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	25
รูปที่ 12 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม กลุ่ม M14 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	27
รูปที่ 13 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสมในตัวอย่างน้ำจากบ่อเดิมอากาศของโรงกลั่นน้ำมันบาง จากในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K ₂ HPO ₄ เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C	27
รูปที่ 14 ผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และมี 0.1 M phosphate หรือ borate buffer เขย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อ นาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน	29
รูปที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และมี 0.1 M phosphate pH 8 เขย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที เป็น เวลา 7 วัน	31
รูปที่ 16 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดิบต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14- 07 ในอาหารเหลว BH ที่มี 0.1 M phosphate pH 8 เขย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน	34
รูปที่ 17 ผลของปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ใน อาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และมี 0.1 M phosphate pH 8 เขย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อ	

นาที่ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	36
รูปที่ 18 ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และมี 0.1 M phosphate pH 8 เขย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที่ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	38
รูปที่ 19 สภาวะต่าง ๆ ในการบำบัดน้ำเสียโรงกลั่นบางจาก	40

บทนำ

น้ำมันยังคงเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในประเทศไทย และเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์จำนวนมากที่ใช้ในชีวิตประจำวันที่ผลิตขึ้นจากขบวนการในอุตสาหกรรมน้ำมันปิโตรเลียม (ปิโตรเคมี) ปริมาณการใช้เพิ่มขึ้นทุกปี และแหล่งน้ำมันส่วนใหญ่มาจากภายนอกประเทศ เช่น ตะวันออกกลาง เป็นต้น ต้องมีการนำเข้าในปริมาณมาก โดยการขนส่งทางเรือเป็นส่วนใหญ่ อุบัติเหตุที่ทำให้น้ำมันรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมในระหว่างการขนส่งได้เพิ่มจำนวนบ่อยครั้งมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในทะเล มหาสมุทร หรือแม่น้ำที่เรือขนถ่ายขนาดเล็กผ่านเข้ามาได้ นอกจากนี้ ชายฝั่งทะเล มหาสมุทร และบนบก แม้กระทั่งใต้ดิน รวมถึงแหล่งน้ำใต้ดินด้วย ก็มีโอกาสดับรับการปนเปื้อนของน้ำมันที่รั่วไหลได้ ในกรณีการรั่วไหลในทะเลอยู่ใกล้ชายฝั่งมาก โดยอาศัยกระแสลมและกระแสน้ำ ทำให้ความเข้มข้นถูกพัดพาเข้าสู่ชายฝั่งได้ ก่อนที่จะถูกเก็บกวาดหรือถูกทำลายไป (weathering) หรือในกรณีอุบัติเหตุการขนส่งทางบก หรือแม้กระทั่งท่อขนส่งน้ำมันที่มีอยู่ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจชายฝั่งทะเลภาคใต้ (Southern Seaboard) หรือกรณีถังเก็บน้ำมันใต้ดินที่ยากแก่การตรวจสอบสภาพถัง เกิดรอยรั่วขึ้น (Cheremisinolf และคณะ 1990; Hoeppel และคณะ 1991) เป็นสาเหตุที่ทำให้มีการปนเปื้อนของน้ำมันทั้งในดินและน้ำได้

นอกจากอุบัติเหตุการรั่วไหลแล้ว จากปริมาณการใช้น้ำมันที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก ทำให้ขบวนการผลิตต้องขยายตามไปด้วย ซึ่งในขบวนการผลิตมีแหล่งที่ก่อให้เกิดของเสียจากน้ำมันและน้ำปนเปื้อนน้ำมัน เช่น กากตะกอนของน้ำมันที่กักเก็บ น้ำชะล้างจากขบวนการผลิต โดยปกติ มีขบวนการกำจัด/บำบัดอยู่แล้ว โดยใช้เครื่องมืออุปกรณ์ทางกายภาพและจุลินทรีย์ในธรรมชาติช่วยในการย่อยสลาย แต่จากแนวโน้มของปริมาณของเสียที่จะเพิ่มขึ้น การศึกษาวิจัยในเรื่องนี้จะช่วยให้ประสิทธิภาพของการบำบัดดีขึ้น

แหล่งที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำมันเข้าสู่สภาพแวดล้อมแหล่งใหญ่แหล่งหนึ่ง คือ การใช้น้ำมันของผู้ใช้ปลายทาง (End Users) ที่ขาดความระมัดระวังและความรับผิดชอบ เช่น การเปลี่ยนถ่ายน้ำมันเครื่อง แล้วเททิ้งลงสู่ท่อระบายน้ำต่าง ๆ (Reid and Streebin, 1972- ทุกปีในอเมริกา น้ำมันเครื่องใช้แล้วประมาณ 350 ล้านแกลลอนถูกเททิ้งสู่ระบบน้ำทิ้งชุมชน) การหกสละของน้ำมันและผลิตภัณฑ์น้ำมันอื่น ๆ ภายในบริเวณสถานีบริการ อยู่ซ่อมบริการเครื่องจักร เครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันและรถยนต์ เป็นต้น

ปัญหาเหล่านี้ ถ้าไม่มีการป้องกันและเตรียมการแก้ไขและ/หรือป้องกัน จะทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม และในที่สุดจะส่งผลโดยตรงต่อมนุษย์อย่างมาก

ปัจจุบันได้มีหลายวิธีการที่ใช้ในการกำจัด/บำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนสภาพแวดล้อม คือ วิธีทางกายภาพ เคมี หรือชีววิทยา

วิธีทางกายภาพ เหมาะสมที่จะนำมาใช้เก็บกวาดน้ำมัน (Skimming) ออกจากสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำหรือผิวพื้นดินที่มีอาณาบริเวณกว้างใหญ่พอให้เครื่องจักร เครื่องมือขนาดใหญ่ทำงานได้อย่างสะดวก แต่ไม่เหมาะสมกับชายฝั่งที่เป็นป่าชายเลน แนวปะการัง หรือชั้นของดินหรือทรายที่ลึกกว่า 50 เซนติเมตร

วิธีทางเคมี ได้แก่การใช้สารเคมีจำพวก detergent หรือ dispersant ที่ทำให้น้ำมันกระจายตัวออกไปเป็นอนุภาคเล็ก และรอให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติทำการย่อยสลายต่อไป การใช้สารเคมีเป็นวิธีที่มีการเสี่ยง เนื่องจากสารเคมีที่ใช้อาจเป็นตัวก่อให้เกิดมลภาวะแก่สิ่งแวดล้อมเอง

วิธีทางชีววิทยาหรือการใช้จุลินทรีย์ เป็นวิธีการที่ยอมรับมากที่สุด เพราะขบวนการย่อยสลายน้ำมันที่เกิดขึ้นกับคราบน้ำมันที่หลงเหลือจากวิธีทางกายภาพ หรือทางเคมีก็ดี ก็คือ การย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยน้ำมันต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติอยู่แล้ว นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเติมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติ หรือแม้

กระทรวงการเดิมจุนทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ โดยวิธีพันธุวิศวกรรม ที่มีความสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดี (U.S. Congress, Office of Technology Assessment, 1991)

การศึกษาวิจัยอย่างมีระบบ จะช่วยพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีทางชีววิทยาให้สมบูรณ์และดีขึ้น การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดคราบน้ำมัน แม้ว่าได้มีมานานแล้วในต่างประเทศ แต่เพิ่งได้นำมาใช้ในภาคสนามขนาดใหญ่เมื่อไม่นานมานี้ ตั้งแต่อุบัติเหตุเรือบรรทุกน้ำมัน Exxon Valdez ในปี ค.ศ. 1989 เป็นต้นมา และผลการใช้ได้แสดงแนวโน้มหรือชี้ให้เห็นว่า การใช้จุลินทรีย์อย่างมีระบบแบบแผน จะนำไปสู่ประสิทธิภาพในการบำบัดคราบน้ำมันที่ดี

อย่างไรก็ดี การศึกษาวิจัยทั้งหมดได้กระทำในต่างประเทศ และลักษณะภูมิประเทศและภูมิอากาศอบอุ่นและหนาว ซึ่งแตกต่างจากประเทศไทยที่อยู่ในเขตร้อนชื้น แม้ว่าจะมีการศึกษาวิจัยในเขตร้อนแบบทะเลทรายเมื่อไม่นานมานี้ การศึกษาวิจัยในประเทศไทยยังมีจำนวนน้อยมาก การศึกษานี้หวังว่าจะเป็นการศึกษาที่รวบรวมข้อมูลที่สำคัญสำหรับประเทศไทยโดยเฉพาะ และเป็นการพัฒนาความรู้ความเชี่ยวชาญของผู้วิจัย ในการที่จะทำการวิจัยในสาขานี้ในประเทศไทยให้ดีขึ้นและเป็นที่ยอมรับของต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ขณะนี้ได้มีบริษัทต่างประเทศที่จำหน่ายผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ได้เริ่มเข้ามาดำเนินกิจการในประเทศไทยบ้างแล้ว แต่เรายังไม่มีหน่วยวิจัยตรวจสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ประเภทนี้มาก่อน จึงหวังว่า การศึกษาวิจัยครั้งนี้จะช่วยให้พัฒนามีหน่วยงานดังกล่าวขึ้นภายในประเทศ และมีความพร้อมในการตรวจสอบคุณภาพและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เหล่านั้น และเป็นที่ยอมรับของต่างประเทศ มีศักยภาพที่จะตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศเหมาะสมกับสภาพของประเทศไทยและ/หรือภูมิภาคส่วนนี้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีคุณสมบัติย่อยสลายน้ำมันที่เหมาะสม
2. ศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกและการย่อยสลายน้ำมัน
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เช่น ปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
4. ศึกษาและรวบรวมข้อมูลของปริมาณ ประเภทและรายละเอียดของน้ำมันและผลิตภัณฑ์น้ำมันในประเทศไทยที่มีแนวโน้มก่อให้เกิดปัญหามลภาวะ

การตรวจเอกสาร

น้ำมันดิบ (Crude oil) ที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันและผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีชนิดต่าง ๆ เกิดขึ้นในธรรมชาติ มีองค์ประกอบทางเคมีที่สลับซับซ้อน เป็นของผสมที่มีไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) ชนิดต่าง ๆ เป็นส่วนใหญ่ นอกนั้นเป็นสารประกอบที่ออกซิเจน กำมะถันและไนโตรเจนเจือปนอยู่ในปริมาณน้อย ตารางที่ 1 เป็นการแบ่งส่วน (Fractionation) ของน้ำมันดิบ ตามขนาดของโมเลกุล โดยการกลั่น และ/หรือ คุณสมบัติ polarity

ตารางที่ 1 Fractionation of Iranian crude oil, Agha Jari

By distillation				By adsorption	
Fraction	Boiling range (°C)	Vol (%)	C atoms	Fraction	Vol (%)
Gasoline	40-180	30.5	5-10	Asphaltene	1.7
Kerosene	180-230	9.5	10-13	Saturates	59.5
Gas-oil	230-300	14.5	12-17	Aromatics	14.0
Lubricant	300-400	17.5	17-26	Polar aromatics	23.2
Residue	> 400	25	> 24		

แหล่งที่มา Gutnick, D.L. and Rosenberg, E. (1977) Oil tankers and pollution: A microbiological approach. Ann. Rev. Microbiol. 31, p. 381.

การย่อยสลายสารในธรรมชาติหรือสิ่งแวดล้อมโดยจุลินทรีย์ (Biodegradation) เป็นขบวนการธรรมชาติที่เกิดขึ้นเป็นปกติประจำอย่างสม่ำเสมอเพื่อรักษาสมดุลย์ของสิ่งแวดล้อม การศึกษาการย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์ได้มีกันมานานตั้งแต่ในศตวรรษที่ 1940 (Zobell, 1946) แต่ยังไม่ค่อยเป็นที่รู้จักแพร่หลายกัน การวิจัยจำกัดวงเฉพาะในกลุ่มจุลินทรีย์เท่านั้น ได้มีหนังสือที่รวบรวมบทบาทของจุลินทรีย์ต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของปิโตรเลียม เช่น Petroleum Microbiology (Atlas, 1984) เป็นต้น ตารางที่ 2 ได้รวบรวมชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราที่มีคุณสมบัติย่อยสลายน้ำมัน ได้มีการศึกษารวบรวมผลของน้ำมันต่อระบบนิเวศวิทยาและสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด (Green and Trett, 1989) ในวันที่ 24 มีนาคม คศ 1989 เรือบรรทุกน้ำมัน Exxon Valdez ซึ่งบรรทุกน้ำมันดิบ North Slope มาเต็มมระวาง ได้เกยตื้นบริเวณชายฝั่งของ Prince William Sound, อลาสกา เป็นเหตุให้น้ำมันดิบรั่วไหลออกมาปริมาณ 11 ล้านแกลลอน (Wade, 1990) และมีผลกระทบต่อสภาพนิเวศวิทยาในบริเวณนั้นเป็นอย่างมาก ได้มีการนำเทคโนโลยีในการกำจัดคราบน้ำมันตามชายฝั่ง โดยมีการนำเทคโนโลยีที่ช่วยเร่งขบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพและรวดเร็วขึ้น ที่เรียกว่า Bioremediation (ในที่นี้ ขอเรียกว่า 'การชีวบำบัด') หรือที่รู้จักกันในชื่ออื่น ๆ เช่น Bioreclamation, Biorestitution (Singleton, 1994) มาใช้ในภาคสนามขนาดใหญ่ ทำให้เป็นที่รู้จักของคนทั่วไป วิธีการที่ใช้ คือ การเติมสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการ หรือ 'ปุ๋ย' ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำได้ โดยการละลายเป็นไปอย่างช้า เพื่อให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญเติบโต โดยมีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่า ขบวนการธรรมชาติในการย่อยสลายน้ำมันได้มีแนวโน้มที่ถูกเร่งให้เร็วขึ้นในแปลงทดลองที่ใส่ 'ปุ๋ย' โดยเฉพาะ Hexadecane และ Phenanthrene ถูกย่อยสลายมากขึ้นพร้อมกับปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไฮโดรคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นในชั้นใต้ผิวดิน เมื่อใส่ 'ปุ๋ย' ครั้งแรก และเมื่อใส่ 'ปุ๋ย' เป็นครั้งที่ 2 ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งชั้นผิวดินและใต้ผิวดินมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเท่า ๆ กัน (Lindstrom และคณะ 1991)

ตารางที่ 2 Major Genera of Oil-Degrading Bacteria and Fungi from Marine and Brackish Water Environment

Bacteria	Fungi
Achromobacter	Allescheria
Acinetobacter	Aspergillus
Actinomyces	Aureobasidium
Aeromonas	Botrytis
Alcaligenes	Candida
Arthrobacter	Cephalosporium
Bacillus	Cladosporium
Beneckea	Cunninghamella
Brevibacterium	Debaromyces
Coryneforms	Fusarium
Erwinia	Gonytrichum
Flavobacterium	Hansenula
Klebsiella	Helminthosporium
Lactobacillus	Mucor
Leucothrix	Oidiodendrum
Moraxella	Paecilomyces
Nocardia	Phialophora
Peptococcus	Penicillium
Pseudomonas	Rhodosporidium
Sarcina	Rhodotorula
spherotilus	Saccharomyces
Spirillum	Saccharomycopsis
Streptomyces	Scopulariopsis
Vibrio	Sporobolomyces
Xanthomyces	Torulopsis
	Trichoderma
	Trichosporon

แหล่งอ้างอิง : Floodgate, G.D. (1984) The Fate of Petroleum in Marine Ecosystems, In Atlas, R.M. (ed.) Petroleum Microbiology, Macmillan Publishing Co., New York, p. 373

ข้อจำกัดที่สำคัญในการชีวบำบัดของน้ำหรือดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา พบว่า แหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีอยู่ ไม่ได้สัดส่วนกับปริมาณของแหล่งคาร์บอน (น้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน, Hydrocarbons) ไม่เพียงพอกับความต้องการของเชื้อ ทำให้การชีวบำบัดเป็นไปได้อย่างช้า ๆ ซึ่งถ้าใช้ 'ปุ๋ย' ที่ค่อยปล่อยไนโตรเจนและ

ฟอสฟอรัสอย่างช้า จะทำให้อัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็น 86% จาก 15% ในแปลงที่ไม่ได้เติมปุ๋ย นอกจากนี้ ในการทดลองเดียวกัน พบว่าอัตราการย่อยสลายในฤดูร้อน (25 °C) สูงกว่าในฤดูหนาว (10 °C) คือ 0.13 mg/g sand/day และ 0.06 mg/g sand/day ตามลำดับ (Rosenberg และคณะ 1992) แสดงให้เห็นว่า สภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศมีส่วนในการย่อยสลายของน้ำมันด้วย

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น โดยปกติพันธุ์พืชและสัตว์ ตลอดจนแมลงมีความหลากหลายสายพันธุ์มากกว่าประเทศในเขตอบอุ่นหรือเขตหนาว เพราะฉะนั้น พันธุ์จุลินทรีย์ก็น่าจะมีความหลากหลายเช่นเดียวกัน และเชื่อว่ามีความโน้มที่จะมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ดีและเหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศในแถบนี้มากกว่าสายพันธุ์ที่นำมาจากเขตอบอุ่นหรือเขตหนาว ซึ่งก็เป็นสาเหตุและจุดประสงค์หนึ่งของการศึกษาวิจัยนี้

วัสดุและวิธีการทดลอง

น้ำมันดิบ

น้ำมันดิบที่ใช้ตลอดการวิจัย คือ น้ำมันดิบ Tapis จากประเทศมาเลเซีย ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท บางจากปิโตรเลียม จำกัด (มหาชน)

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้มาจากการแยกจากตัวอย่างน้ำและดินตามแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 *Candida tropicalis* MU15Y เป็นยีสต์ที่สามารถย่อยน้ำมันดิบได้ดี ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณมณี ผลิต ผลการพิมพ์

ตารางที่ 3 แสดงรหัส สถานที่เก็บตัวอย่าง

ที่	รหัส	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันเดือนปีที่เก็บ
1	JP1/1	แม่น้ำเจ้าพระยา-ห้องอาหารไทโร ทำน้ำเกียกกาย	14 / 4 / 38
2	JP1/2	แม่น้ำเจ้าพระยา-ทำน้ำวัดจันทน์โมสร	14 / 4 / 38
3	JP1/3	แม่น้ำเจ้าพระยา-ท่าเรือฝั่งตรงข้ามวัดจันทน์ ๓	14 / 4 / 38
4	JP1/4	แม่น้ำเจ้าพระยา-ท่าเรือ โรงเรียนราชินีล่าง ปากคลองตลาด	14 / 4 / 38
5	JP1/5	แม่น้ำเจ้าพระยา-ท่าเรือราชนาวิสัยโมสร	14 / 4 / 38
6	RP1/1	ระยอง-หาดแม่รำพึง-ทรายไม่เห็นคราบน้ำมัน	29 / 4 / 38
7	RP1/2	ระยอง-หาดแม่รำพึง-ทรายผสมคราบน้ำมัน	29 / 4 / 38
8	RP1/3	ระยอง-หาดแม่รำพึง-เม็ดคราบน้ำมัน	29 / 4 / 38
9	MP1/1	ระยอง-แหลมแม่พิมพ์-ทรายชายน้ำ	29 / 4 / 38
10	MP1/2	ระยอง-แหลมแม่พิมพ์-ทรายในร่องน้ำทิ้งร้านอาหารทะเล	29 / 4 / 38
11	SH1/1	โคลนบริเวณชายฝั่งอ่าวตังตาล สัตหีบ ชลบุรี	20 / 5 / 38
12	SY1/1	คูน้ำในมหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม	22 / 7 / 38
13	SY1/2	แม่น้ำนครชัยศรี นครปฐม	22 / 7 / 38
14	MR1/2	น้ำคลองหลังอุ้มอรรถ ต.สะलग อ.แมริม เชียงใหม่	21 / 8 / 38
15	MR1/3	ดินร้านอาหาร ต.ริมใต้ อ.แมริม เชียงใหม่	21 / 8 / 38
16	MR1/6	ดินอุ้มอรรถ ต.สะलग อ.แมริม เชียงใหม่	21 / 8 / 38
17	MR1/7	น้ำทิ้งที่ระบายน้ำอุ้มอรรถ ต.ดอนแก้ว อ.แมริม เชียงใหม่	21 / 8 / 38
18	MC1/4	น้ำทิ้งที่ระบายน้ำร้านอาหาร อ.เมือง เชียงใหม่	2 / 10 / 38
19	MC1/5	น้ำทิ้งที่ระบายน้ำปั๊มน้ำมันบางจาก อ.เมือง เชียงใหม่	2 / 10 / 38
20	UD1/1	น้ำทิ้งที่ระบายน้ำปั๊มน้ำมันเอสโซ่ อุตรดิตถ์	2 / 10 / 38

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด เมื่อต้องการทำเป็นอาหารแข็ง เติมน้ำมันปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร และทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที (Autoclaving) หรือตามที่ระบุไว้เป็นกรณีไป

Bushnell - Haas (BH)

ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) MgSO_4 0.2, CaCl_2 0.02, KH_2PO_4 1, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1, KHO_3 1, FeCl_3 0.05 และเมื่อต้องการใช้ในการแยกเชื้อที่ย่อยสลายน้ำมันดิบ เติมน้ำมันดิบ Tapis ในปริมาณที่ต้องการ (ร้อยละ 0.5 – 1) ซึ่งน้ำมันดิบ Tapis ได้ผ่านการกรองด้วยเยื่อกรอง 0.45 ไมครอน (Gelman) หลังทำการอุ่นที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาทีใน Water bath เรียกอาหารว่า BH-oil

Yeast extract-Peptone-Dextrose-Carbenicillin (YPDC)

ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) Yeast extract (Difco) 10, Peptone (Difco) 20, D-Glucose 20 ปรับ pH เป็น 6.8 เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autoclave และเมื่อเย็นแล้ว เติม Carbenicillin ปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่อ 1 ลิตรของ YPDC

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

การวิเคราะห์วัดค่า optical density

นำตัวอย่างสารละลายเชื้อที่เจือจางเหมาะสมแล้วด้วยน้ำกลั่น มาวัดค่า optical density ใน cuvette ที่มีขนาดทางเดินแสง 10 มิลลิเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร เทียบกับน้ำกลั่น

การวิเคราะห์วัดปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable plate count)

นำ 0.1 มิลลิลิตรของสารละลายที่ทำการเจือจางที่เหมาะสมแล้ว เกลี่ยบนอาหารแข็ง (NA สำหรับแบคทีเรีย หรือ YPD+carbenicilline 100 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับยีสต์ หรือตามที่กล่าวเป็นกรณี) นำไปเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส จนสังเกตเห็นโคโลนีชัดเจนที่นับได้ ทำการนับเฉพาะจานที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี คำนวณหาปริมาณเชื้อตามสูตร ดังนี้

ปริมาณเชื้อ (CFU/ml) = (จำนวนโคโลนีที่นับได้ x Dilution factor)/ปริมาณที่เกลี่ย (ml)

การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนของน้ำมันดิบที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การสกัดน้ำมันดิบออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำ 50 ml BH+0.5 % Tapis ที่เลี้ยงเชื้อจนได้เวลาตามต้องการ เติมสารละลาย 1-eicosene ใน chloroform ความเข้มข้น 1 % w/v ปริมาณ 1 ml ลงในอาหารก่อนทำการสกัดเพื่อเป็น internal standard (IS) จากนั้น จึงใส่อาหารลงใน 1000 ml separating funnel เติม 80 ml chloroform เติมน้ำมันเชื้อก่อน แล้วเทใส่ใน separating funnel เขย่าเป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น ทำการแยกชั้นล่าง ซึ่งเป็น chloroform ที่มีน้ำมันละลายอยู่ สกัดน้ำมันที่เหลืออยู่อีกครั้ง โดยใช้ 20 ml chloroform เติมลงใน separating funnel ทำการเขย่าและตั้งทิ้งไว้เช่นเดิม แล้วเทสารละลายน้ำมันใน chloroform ที่สกัดได้ ผ่าน anhydrous Na_2SO_4 20 กรัมบนกระดาษกรอง Whatman No. 40 เพื่อดูดน้ำออกจากสารละลายน้ำมัน นำไประเหยแยก chloroform ออกจากด้วย vacuum rotary evaporator ที่ปรับความดันอากาศภายในขวดระเหยเท่ากับ 160 mmHg อุณหภูมิ 35 °C จนกระทั่ง chloroform ระเหยหมด ปรับความดันใน evaporator ให้เท่ากับความดันบรรยากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน นำน้ำมันดิบที่สกัดได้มาละลายใน 10 ml hexane กรองด้วย glass membrane

filter GF-A (Whatman) ใส่เก็บไว้ในขวดที่มีฝาเกลียวปิดสนิท นำไปเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอนำไปทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) ต่อไป

การวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ (hexane soluble fraction) โดยใช้ Gas Chromatography (GC)

นำสารละลายน้ำมันดิบใน hexane ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Shimadzu GC-9A (splitless mode) ซึ่งมี Flame Ionization Detector (FID) เป็นอุปกรณ์วัด บันทึกและคำนวณผลด้วย Shimadzu C-R3A Integrator ติดตั้ง J&W DB-5 capillary column ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.53 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร สภาพการวิเคราะห์ปรับตั้ง ดังนี้ อุณหภูมิของ Injector และ detector เท่ากับ 300°C อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ 50°C รักษาไว้คงที่เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ทำการเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 3°C ต่อนาที จนได้อุณหภูมิสุดท้าย 300°C รักษาไว้ให้คงที่อีกเป็นเวลา 35 นาที Carrier gas ที่ใช้ คือฮีเลียม (Helium) ซึ่งควบคุมอัตราการไหลด้วยความดันคงที่ 60 kPa ปรับตั้งอัตราการไหลของฮีเลียมผ่าน septum purge และ split flow เป็น 10 และ 60 มล./นาที ตามลำดับ Make up gas ใช้ไนโตรเจน ซึ่งมีอัตราการไหล 30 มล./นาที ความดันของไฮโดรเจนและอากาศที่ใช้จุด FID เท่ากับ 0.5 และ 0.6 kg/cm^3 ตามลำดับ

การคำนวณปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ

ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือได้แสดงไว้เป็นร้อยละ โดยทำตามวิธีการของ Sorkhoh *et al.* (1990) และ Mueller *et al.* (1992) ดังนี้

ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ (ร้อยละ) = (ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือในช่วงเวลาที่ศึกษา/ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในวันที่ 0) $\times 100$

โดยปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ หมายถึง อัตราส่วนของผลรวมของพื้นที่ใต้ peak ของไฮโดรคาร์บอนใน GC chromatogram ต่อพื้นที่ใต้ peak ของ internal standard จากการสกัดและวิเคราะห์ครั้งเดียวกัน

ค่าไฮโดรคาร์บอน C9-C33 ที่เหลือ หมายถึง การคำนวณโดยใช้พื้นที่ใต้ peak เฉพาะที่เป็นไฮโดรคาร์บอนอิมตัวมีจำนวนคาร์บอน 9-33 อะตอมในโมเลกุล

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อบอกว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยการใช้ one-way analysis of variance (a completely randomized design) และ Student-Newman-Keuls test (all pairwise multiple comparison) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในโปรแกรมสำเร็จรูป SigmaStat (Jandel Corp.)

การแยกและการคัดเลือกเชื้อที่ย่อยสลายน้ำมันดิบ

ตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย (ตารางที่ 3) ถูกเก็บมาในถุงพลาสติกที่สะอาด และแช่ไว้ในกล่องน้ำแข็งระหว่างนำมาที่ห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างเหล่านี้ถูกเก็บไว้ที่ 4°C องศาเซลเซียสระหว่างการแยกหาจุลินทรีย์ที่ต้องการ

ขั้นแรก (primary screening)

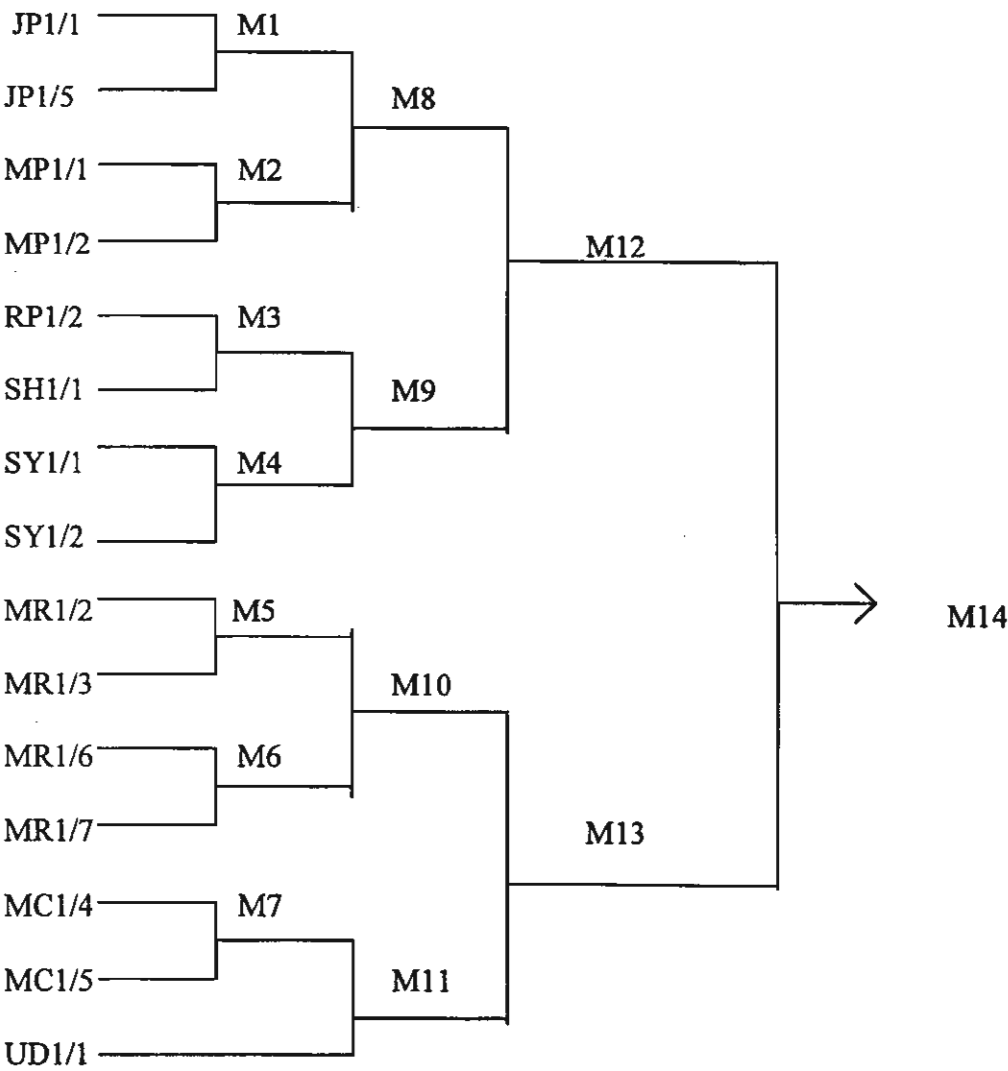
ตัวอย่างที่ปนเปื้อนน้ำมันปริมาณ 1 กรัมหรือ 1 มิลลิลิตร ผ่านการเจือจางที่เหมาะสมด้วยน้ำเกลือ (normal saline) นำ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร nutrient agar (NA) และ BH-oil นำไปเลี้ยงที่ 30°C เป็นเวลา 2 และ 14 วัน ตามลำดับ ทำการนับเชื้อทั้งหมดบนอาหาร NA และนับเชื้อที่คาดว่าจะย่อยสลายน้ำมันดิบบน BH-oil agar ทำการแยกเก็บเชื้อจาก BH-oil agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการเก็บรักษาไว้เพื่อการศึกษาต่อไป

สำหรับตัวอย่างที่ไม่มีน้ำมันปนเปื้อน นำ 1 กรัมหรือ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเหลว BH-oil ปริมาณ 50 มิลลิลิตร

ใน 250 ml Erlenmeyer flask ทำการเขย่าเลี้ยงแบบหมุนวนที่ 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 3 วัน ระหว่างนี้ ทำการนับจำนวนบน NA และแยกหาเชื้อที่คาดว่าจะย่อยสลายน้ำมันดิบบน BH-oil agar ส่วนเชื้อในอาหารเหลวทำการถ่ายลงในอาหารเหลว BH-oil ใหม่ เป็นจำนวน 2 – 3 ครั้ง และทำการนับและแยกหาเชื่อดังกล่าวข้างต้น

ขั้นที่ 2 (secondary screening)

จากเชื้อบริสุทธิ์จากขั้นแรก นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว BH-oil ปริมาณ 50 มิลลิลิตร (250 มิลลิลิตร Erlenmeyer flask) เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C สังเกตการเจริญเติบโตโดยวัด optical density ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร จนได้ log phase นำ 2.5 มิลลิลิตรถ่ายลงในอาหารเหลว BH-oil 50 มิลลิลิตร พร้อมกับเชื้อบริสุทธิ์ในปริมาณเท่ากัน นำไปเขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C จนได้ log phase ของ mixed culture แล้วจึงนำ 2.5 มิลลิลิตร ของ mixed culture หรือเชื้อบริสุทธิ์มาผสมกันทำตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น จนกระทั่งได้กลุ่มของเชื้อที่คาดว่าจะย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะการศึกษา แผนผังของการแยกและคัดเลือกเชื้อขั้นที่ 2 แสดงไว้ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนผังการแยกและคัดเลือกเชื้อย่อยสลายน้ำมันดิบ ขั้นที่ 2 (secondary screening)

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (preculture หรือ seed)

สำหรับเชื้อบริสุทธิ์

ทำการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นโดยนำ 1 โคโลนีของเชื้อใส่ใน อาหารเหลว BH-0.5 % oil ปริมาณ 50 มิลลิลิตรใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 3 วันสำหรับแบคทีเรีย หรือ 5 วันสำหรับยีสต์ หรือตามที่กล่าวเป็นกรณี ๆ

สำหรับเชื้อผสม

นำเชื้อเริ่มต้นของเชื้อบริสุทธิ์มารวมกันในปริมาณเท่ากัน

หมายเหตุ สำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้นของเชื้อผสม M14 เนื่องจากเชื้อ M14-02 ถึง M14-06 ไม่สามารถเจริญใน BH broth ได้ จึงนำ 1 โคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดแยกเลี้ยงใน Nutrient broth หลังจากทำการเลี้ยงจนได้ปริมาณเชื้อมากที่สุด (ประมาณ 10^9 CFU/ml) จึงนำเชื้อทั้ง 7 ชนิดมาผสมกันด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่าๆ กัน จนได้เซลล์เริ่มต้นรวมประมาณ 10^6 CFU/ml สำหรับเชื้อผสมจากโรงกลั่นบางจาก ใช้น้ำในบ่อเติมอากาศเป็นแหล่งเชื้อเริ่มต้น

การศึกษาการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture)

เติม 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้นลงใน BH broth +0.5% oil+0.007 M K_2HPO_4 ปริมาณ 50 มิลลิลิตรใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml บ่มเลี้ยงโดยเขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ เชื้อเริ่มต้นของ MR1/7-011 เตรียมโดยเลี้ยง 1 โคโลนี ของ MR1/7-011 ใน Nutrient broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตรใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml บ่มเลี้ยงโดยเขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-2 วัน (เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถโตได้ดีในอาหาร BH broth+0.5% oil+0.007 M K_2HPO_4)

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบของจุลินทรีย์ผสมหลายสายพันธุ์ (mixed culture)

เติม 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้นของเชื้อผสมลงใน BH broth +0.5% oil+0.007 M K_2HPO_4 ปริมาณ 50 มิลลิลิตรใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml บ่มเลี้ยงโดยเขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ผลของ pH

ทำการศึกษาในอาหารเหลว BH + 0.5 % oil ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่ pH 6,7,8 โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer และที่ pH 8,9 (0.1 M borate buffer) ใช้ 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้น เขย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

ผลของอุณหภูมิ

ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 °C ในอาหารเหลว BH + 0.5 % oil ปริมาณ 50 มิลลิลิตร pH 8 โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer ใช้ 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้น เขย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

ผลของแหล่งคาร์บอน

ผลของชนิด n-alkane

เติมสารละลายไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว (alkane) ซึ่งประกอบด้วย n-Dodecane, n-Tridecane, n-Tetradecane, n-Pentadecane, n-Octadecane และ n-Nonadecane ร้อยละ 13.33 (w/w) และ 2,6,10,14-Tetramethyl Pentadecane (pristane) ร้อยละ 6.67 (w/w) ปริมาณ 0.1 กรัม (0.125 มิลลิลิตร) ในอาหารเหลว BH ปริมาณ 50 มิลลิลิตร pH 8 โดยใช้

0.1 M phosphate ใช้ 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้น (M14-01 & M14-07) เชยาล้างแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

ผลของความเข้มข้นน้ำมันดิบ Tapis

เติมน้ำมันดิบ Tapis ที่มีความเข้มข้น (0.5, 1, 1.5 และ 2 % v/v) ในอาหารเหลว BH ปริมาณ 50 มิลลิลิตร pH 8 โดยใช้ 0.1 M phosphate ใช้ 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้น เชยาล้างแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน ผลของปริมาณไนโตรเจน

เติมแอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) โดยคำนวณให้มีไนโตรเจน ปริมาณ 0 ถึง 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว BH + 0.5 % oil ปริมาณ 50 มิลลิลิตร pH 8 โดยใช้ 0.1 M phosphate ใช้ 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้น เชยาล้างแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน และ Control flask ไม่เติมไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส

หมายเหตุ สูตร BH ได้เปลี่ยนแปลงดังนี้ คือ ไนโตร (NH_4)₂HPO₄ และ KNO₃ เติม K₂HPO₄ ปริมาณ 1.32 กรัม ผลของปริมาณฟอสฟอรัส

เติม dipotassium hydrogenphosphate (K_2HPO_4) โดยคำนวณให้มีฟอสฟอรัส ปริมาณ 0 ถึง 5 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว BH + 0.5 % oil ปริมาณ 50 มิลลิลิตร pH 8 โดยใช้ 0.1 M phosphate ใช้ 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้น เชยาล้างแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน และ Control flask ไม่เติมไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส

หมายเหตุ สูตร BH ได้เปลี่ยนแปลงดังนี้ คือ ไนโตร K₂HPO₄, (NH_4)₂HPO₄ และ KNO₃ เติม NH_4NO_3 ปริมาณ 1 กรัม

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบของ mixed culture (M14-01 และ M14-07) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เติม 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อเริ่มต้นของ mixed culture (M14-01 & M14-07) ในอาหารเหลว BH + 0.5 % oil ปริมาณ 50 มิลลิลิตร pH 8 โดยการตรวจและปรับทุกวันด้วย 0.1 M NaOH หรือ 0.1 M HCl เติมนิโตรเจน ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตรด้วย NH_4NO_3 และเติมฟอสฟอรัส ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรด้วย K₂HPO₄ เชยาล้างแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 4 วัน และ Control flask ใช้ BH สูตรปกติ

การศึกษเปรียบเทียบการบำบัดน้ำเสียจากโรงกลั่นบางจาก

ใช้น้ำเสียจากบ่อเติมอากาศของโรงกลั่นบางจากที่เจือจาง 1 ต่อ 4 ด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการศึกษาการย่อยสลายน้ำมัน ดังนี้ การเติมเชื้อจุลินทรีย์ (seeding) โดยเติม 1 % ของเชื้อเริ่มต้น M14-01 & M14-07 การเติมสารอาหาร N และ P (nutrient addition) โดยเติมนิโตรเจน ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตรด้วย NH_4NO_3 และเติมฟอสฟอรัส ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรด้วย K₂HPO₄ และการเติมทั้งเชื้อและสารอาหาร ทำการเชยาล้างแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 4 วัน

การเก็บ Stock culture ของเชื้อที่แยกได้

Working stock culture

หลังการตรวจสอบว่าเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure culture) เชื้อถูกเก็บบน NA slant และเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 10 °C) และทำการ subculture ทุกเดือนในระหว่างการใช้งาน

Main stock culture

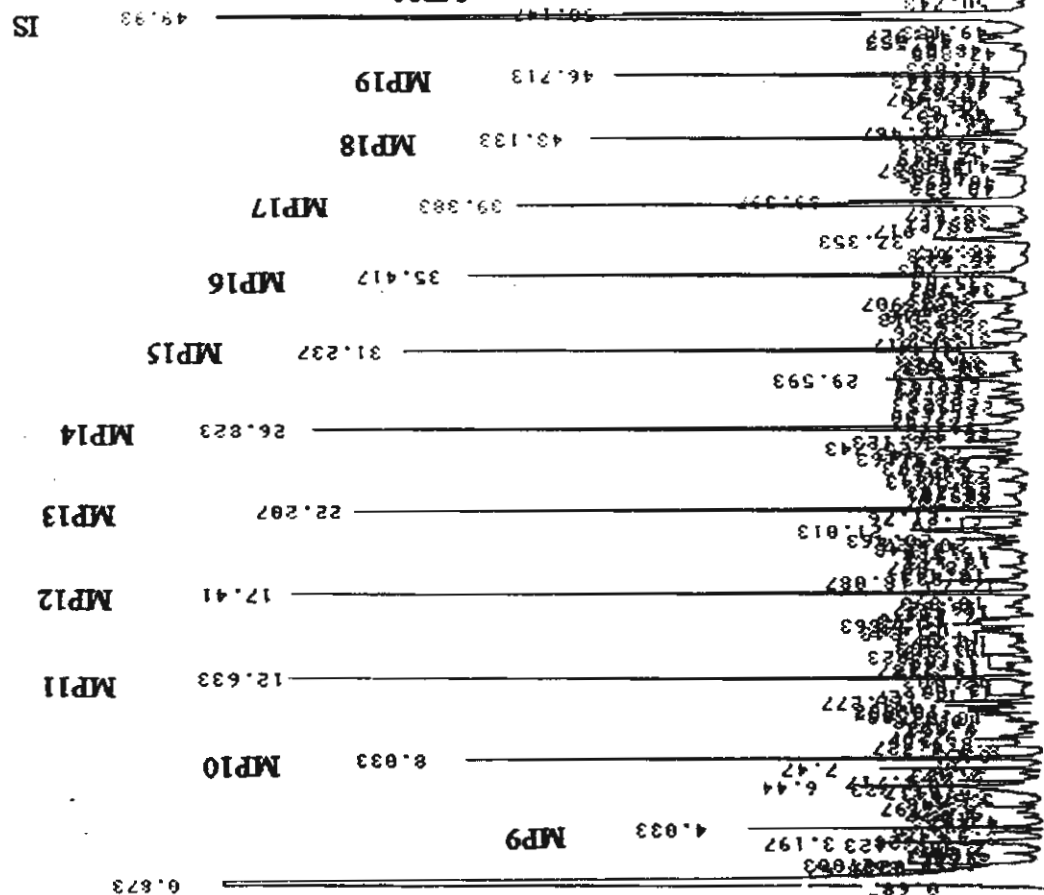
หลังการตรวจสอบว่าเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure culture) เชื้อถูกเก็บใน 15 % glycerol (โดยเลี้ยง pure culture ของเชื้อใน Nutrient Broth (NB) เมื่อเชื้อเจริญเติบโตดีแล้ว ภายใต้สภาพที่เหมาะสม นำ NB culture 2 ส่วนผสมกับ 1 ส่วนของ 45 % glycerol ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใน vial) และเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิประมาณ -80°C) โดยมีอายุใช้งานประมาณ 1 ปี

ผลการทดลองและการวิจารณ์

องค์ประกอบของน้ำมันดิบ Tapis ที่วิเคราะห์โดย GC

รูปที่ 2 แสดง GC chromatogram ของน้ำมันดิบ Tapis ส่วนที่ละลายได้ใน hexane พบว่า ภายใต้สภาวะทดสอบ มีสารแสดงเป็น peak มากกว่า 168 peak สาร straight chain saturated hydrocarbons (n-alkanes, ให้ชื่อ MP9 ถึง MP33 หรือเทียบเท่า C9-C33) สามารถจำแนกโดยใช้การเปรียบเทียบ retention time ของ n-alkane มาตรฐาน คือ n-nonane (C_9H_{20}) ถึง n-hexatriacontane ($C_{36}H_{74}$) ดังแสดงในรูปที่ 3 พื้นที่รวมของ C9-33 เท่ากับ 55.23 ± 5.01 % ของพื้นที่รวมทั้งหมดจาก Tapis chromatogram ตลอดการศึกษาวิจัย ปริมาณของ n-alkane ที่สูงสุด คือ C14 ($C_{14}H_{30}$, 6.67 ± 1.21 %) Pristane (C18 isoprenoid) สามารถตรวจพบว่า ออกตามหลัง C17 มี retention time เท่ากับ 39.771 ± 0.120 นาที อัตราส่วนระหว่าง pristane กับ C17 n-alkane hydrocarbon ของน้ำมันดิบ Tapis มีค่าเท่ากับ 0.42 ± 0.01 เวลาออกของ 1-eicosene (internal standard) เท่ากับ 50.097 ± 0.137 นาที ส่วน hexane ที่ใช้เป็นตัวทำละลายออกที่ 0.853 ± 0.023 นาที จากผลดังกล่าว เป็นการยืนยันว่า Tapis เป็นน้ำมันดิบประเภทเบา (light crude oil) ซึ่งมีค่าความหนาแน่นจำเพาะ API เท่ากับ 46.7 (ข้อมูลโรงกลั่นบางจาก) โดยน้ำมันดิบพวกหนัก (heavy crude oil) มีค่าตั้งแต่ 45.3 API ลงไป

MP9-MP33 : Major peaks corresponding to C9-C33 alkanes
 IS : 1-Eicosene (Internal standard)



รูปที่ 2 แสดง GC chromatogram ของน้ำมันดิบ Tapis ส่วนที่ละลายได้ใน hexane

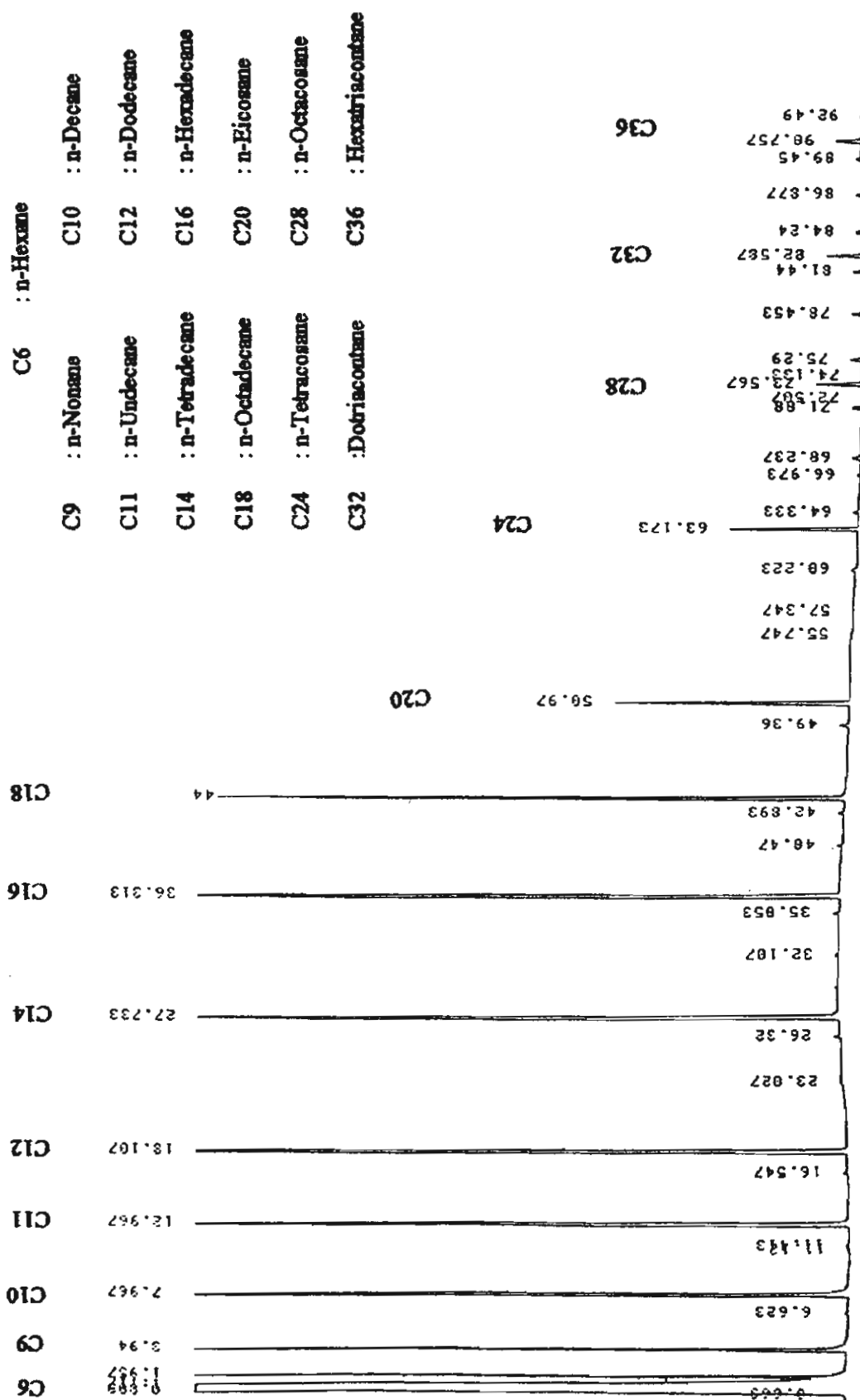


Figure 3 GC chromatogram of standard n-alkane

Abiotic degradation ของ 0.5 % Tapis ในอาหารเหลว BH

การสลายหายไปของ hydrocarbon ในน้ำมันดิบ Tapis ในอาหารเหลว BH ที่ไม่ได้ใส่จุลินทรีย์ (control) แสดงไว้ในรูปที่ 4 C9-C13 ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง C9 และ C10 ลดลงจนหมดภายในวันที่ 3 (ตารางที่ 4) ส่วน hydrocarbon อื่น มีการเปลี่ยนแปลงน้อย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณที่เหลือของ C9-C13 ในอาหารเหลว BH + 0.5 % Tapis (control) ที่อุณหภูมิ 30 °C เซย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที

n-alkane	% hydrocarbon ที่เหลือ*				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
C9	100	0	0	0	0
C10	100	32.19 ± 21.51	0	0	0
C11	100	64.37 ± 21.86	24.23 ± 8.96	7.05 ± 2.00	2.64 ± 1.39
C12	100	89.77 ± 13.93	65.80 ± 8.72	57.60 ± 15.02	26.73 ± 10.65
C13	100	99.29 ± 16.36	93.55 ± 15.37	89.55 ± 12.24	57.93 ± 19.35

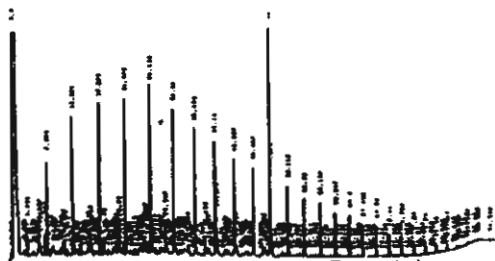
* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณ hydrocarbon ที่เหลือในอาหารเหลว BH + 0.5 % Tapis (control) ที่อุณหภูมิ 30 °C เซย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที

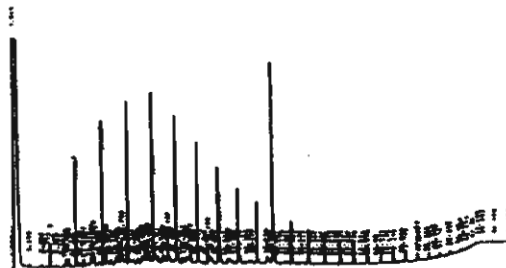
เวลา	% ที่เหลือ*	
	Total hydrocarbon	C9-C-33 hydrocarbon
วันที่ 0	100	55.23 ± 5.01
วันที่ 1	78.28 ± 11.01	52.91 ± 7.47
วันที่ 3	68.93 ± 10.70	49.08 ± 8.31
วันที่ 5	66.57 ± 6.90	47.10 ± 8.23
วันที่ 7	64.42 ± 7.90	40.26 ± 8.96

* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

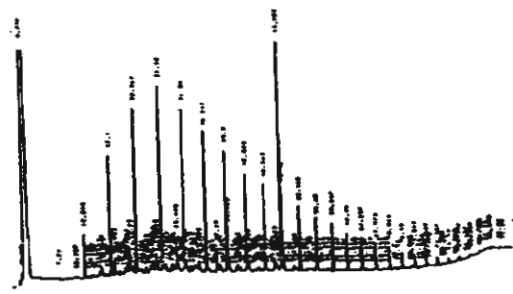
Day 0



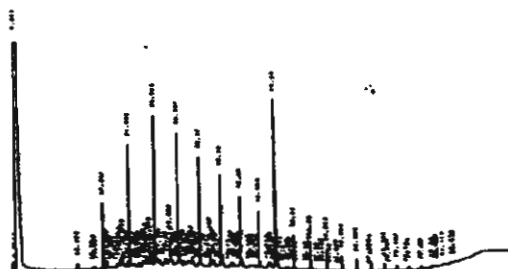
Day 1



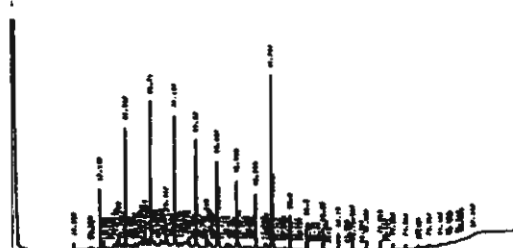
Day 3



Day 5



Day 7



รูปที่ 4 GC chromatogram ของน้ำมันดิบที่เหือดในอาหารเหลว BH ที่ไม่ได้ใส่จุลินทรีย์ (control flask) ที่อุณหภูมิ 30 °C เซ้าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที

การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายน้ำมัน

พบว่า การกระจายของเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ในธรรมชาติ ในบริเวณที่มีประวัติการปนเปื้อนด้วยน้ำมันมาก่อน มีปริมาณของเชื้อสูงกว่าบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนน้ำมัน คือ ร้อยละ 61-67 และ 0.1-26 ตามลำดับ เช่น แม่น้ำเจ้าพระยา ประมาณร้อยละ 0.1 – 13 แหลมแม่พิมพ์ (ร้อยละ 61-67) และหาดคงตาล (ร้อยละ 33) จากแบคทีเรียจำนวน 127 ตัวอย่างที่แยกได้จากการคัดเลือกรอบแรก พบว่า เมื่อทำการคัดเลือกรอบที่ 2 โดยอาศัยหลักการการแข่งขันในการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างเดียวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ กลุ่มแบคทีเรียซึ่งตั้งชื่อว่า M14 ประกอบด้วยแบคทีเรียจำนวน 7 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะของเซลล์และโคโลนีดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีที่เหลืออยู่ในท้ายที่สุด จากการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดโดยการทดสอบทางชีวเคมีและคุณสมบัติต่าง ๆ ทำให้จำแนกได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7 ในระหว่างทำการคัดเลือกรอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็ง พบว่า แบคทีเรีย M14-07 มีจำนวนมากที่ และ M14-01 มีจำนวนมากรองลงไป เมื่อเทียบกับจำนวนแบคทีเรียอื่นในกลุ่ม M14 แบคทีเรียทั้งสองได้ถูกจำแนกชนิด เป็น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumanii* ตามลำดับ

จากการศึกษาในต่างประเทศที่มีมาก่อน ได้รายงานไว้ในบริเวณที่ไม่มีมลภาวะ พบว่ามีปริมาณเชื้อที่ย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนประมาณ น้อยกว่าร้อยละ 0.1 - 1 ของจำนวนเชื้อทั้งหมด และบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันเป็นระยะเวลาดื้อเนื่องนาน เช่น ท่าเรือ มีปริมาณร้อยละ 10 หรือมากกว่า (Atlas, 1981; Cooney, 1990; Venosa *et al.*, 1992) *Pseudomonas* spp. และ *Acinetobacter* spp. เป็นเชื้อที่มีรายงานบ่อยครั้งว่า แยกได้จากธรรมชาติและมีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (Mulkins-Phillips and Stewart, 1974; Buckley *et al.*, 1976; Parekh *et al.*, 1977; Hollaway *et al.*, 1980)

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์และโคโลนีของแบคทีเรีย กลุ่ม M14 ที่เลี้ยงใน BH broth + 1 % Tapis อุณหภูมิ 30 °C เช้าแบบหมวนวน 200 รอบต่อนาที

แบคทีเรีย รหัส	ลักษณะเซลล์		ลักษณะโคโลนี				
	กรัม	รูปร่าง	รูปร่าง	ผิว	สี	Lustrous	Serrate
M14-01	ลบ	แท่ง	กลม	นูน	ครีมโปร่งแสง	Lustrous	เล็กน้อย
M14-02	ลบ	แท่ง	กลม	นูน	ครีมโปร่งแสง	Lustrous	-
M14-03	ลบ	แท่ง	กลม	นูน	ครีมส้ม	Lustrous	-
M14-04	ลบ	แท่ง	กลม	นูน	ครีม	Lustrous	ปานกลาง
M14-05	ลบ	แท่ง	กลม	นูน	ครีมขอบโปร่งแสง	Lustrous	-
M14-06	ลบ	แท่ง	กลม	นูน	ส้มขอบโปร่งแสง	Lustrous	-
M14-07	ลบ	แท่งสั้นเกือบกลม	กลม	นูน	ครีม	Lustrous rough	ปานกลาง

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดลองทางชีวเคมีและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย กลุ่ม M14

การทดสอบทางชีวเคมี	เชื้อรหัส						
	M14-01	M14-02	M14-03	M14-04	M14-05	M14-06	M14-07
McConkey	+	+	-	+	+	-	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	-
TSI	K/K,N	K/N	A/N	K/N	K/N	K/N	K/K
LIA	K/K,N	K/N	K/N	K/N	K/N	K/N	K/N
MOT	+	+	-	+	+	-	-
Citrate	+	+	-	-	+	-	+
Urea	+	+	+	-	-	-	+
OF-Glu	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
OF-Man	+/-	ND	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
OF-Mal	ND	ND	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
OF-Lac	ND	ND	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
Acetate	+	+	-	-	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	-	-	+	+	+	-
Scientific name	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Pseudomonas acidoverans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	<i>Acinetobacter baumanii</i>

หมายเหตุ TSI : Triple Sugar Iron, LIA : Lysine Iron Agar, MOT : Motility test, OF-xxx : Oxidation Fermentation (Glu : Glucose, Man : Mannose, Mal : Maltose, Lac : Lactose)

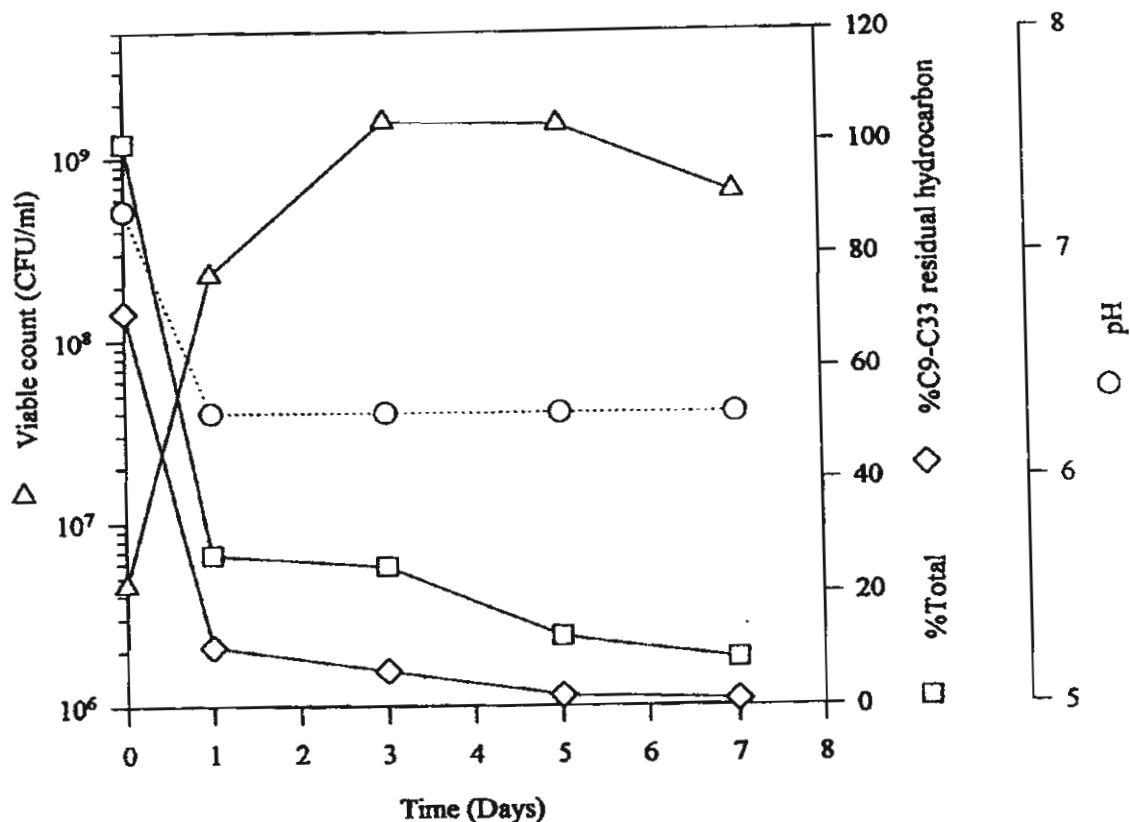
+: มีการเปลี่ยนแปลงของอาหาร - : ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหาร ND : ไม่ได้ตรวจสอบ

+/+ : ทั้ง oxidation และ fermentation +/- : เฉพาะ oxidation -/- : ไม่เกิดทั้ง oxidation และ fermentation

K/K : alkali slant/alkali butt, K/N : alkali slant/no change, N : no change slant nor butt, A/N : acid slant/no change

การศึกษาการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture)

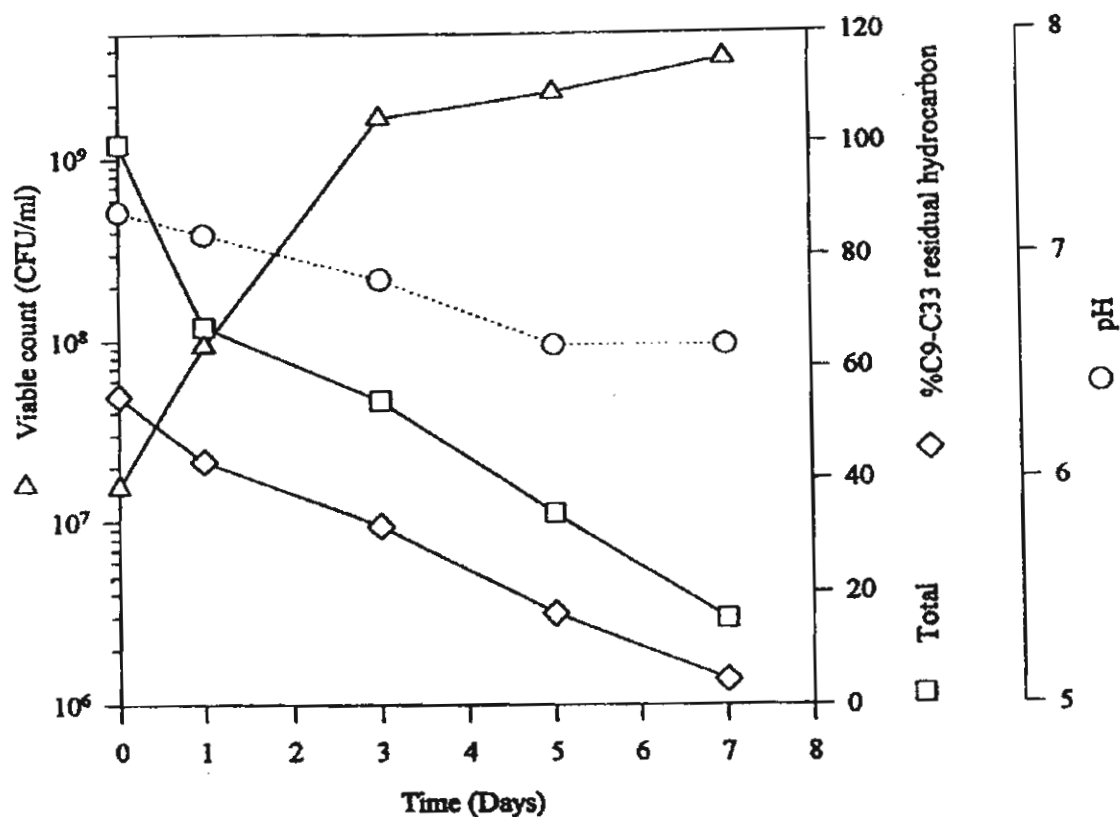
การเจริญเติบโตของเชื้อ M14-07 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีจำนวนมากในการแยกและคัดเลือกขั้นที่ 2 พบว่า viable count เริ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน จาก 5×10^6 CFU/ml เป็น 2×10^8 CFU/ml เป็น 2×10^9 CFU/ml ในวันที่ 3 และค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อย pH ลดลงจาก 7 เป็น 6.1 ภายใน 1 วัน และคงที่จนครบ 7 วันของการศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของ M14-07 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เชื้อแบบหมวนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C

การย่อยสลายน้ำมันดิบของ M14-07 พบว่า ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วจากร้อยละ 100 เป็นร้อยละ 27 ภายใน 1 วัน จากนั้นค่อยๆลดลงเป็นร้อยละ 9 ในวันที่ 7 ของการศึกษา ส่วนไฮโดรคาร์บอน C9-C33 ลดลงแบบเดียวกับไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด เหลืออยู่ร้อยละ 1 ในวันที่ 7

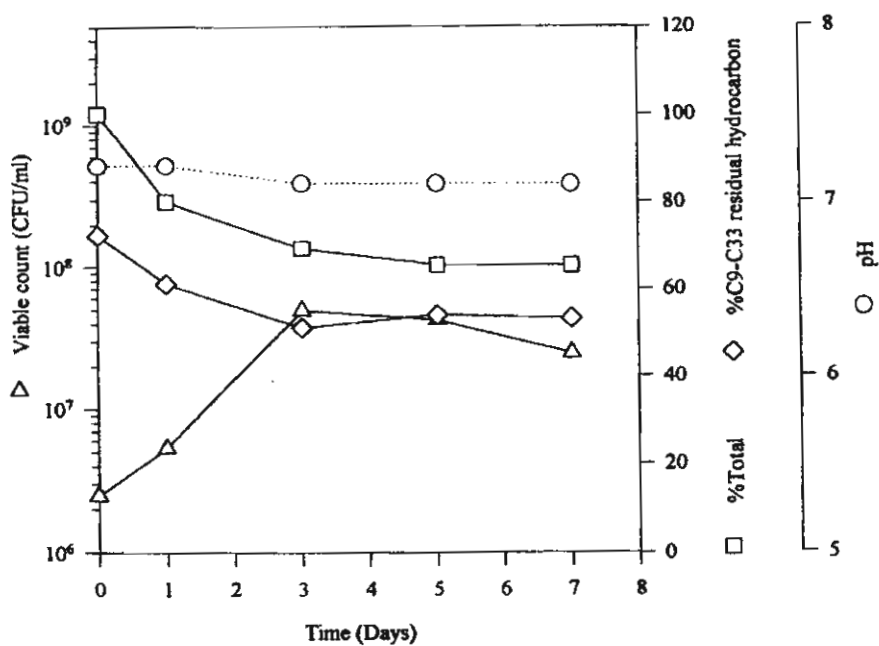
รูปที่ 6 แสดงการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ M14-01 เชื้อเจริญเติบโตได้ดีเช่นเดียวกับ M14-07 มีจำนวน 4×10^9 CFU/ml ในวันที่ 7 ส่วนการย่อยสลายน้ำมันดิบค่อยๆลดลงเรื่อย ๆ โดยเหลือไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดและ C9-C33 เป็นร้อยละ 15 และ 5 ตามลำดับ ในวันที่ 7



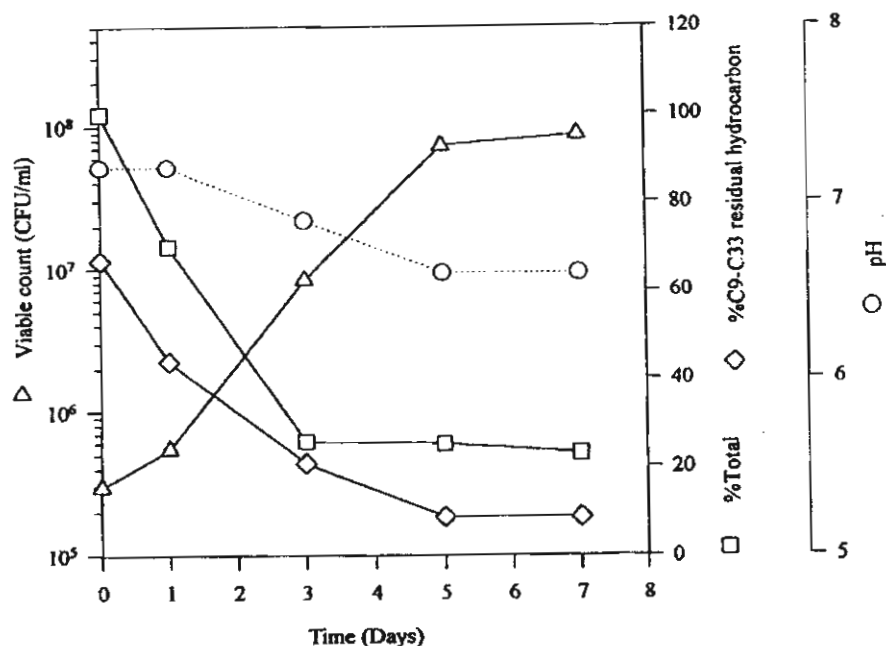
รูปที่ 6 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของ M14-01 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เซลล์แบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C

เชื้อ MR1/7-011 มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ 5×10^7 CFU/ml ในวันที่ 3 โดยมีการย่อยสลายน้ำมันดิบในปริมาณน้อย โดยเหลือไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดและ C9-C33 เป็นร้อยละ 66 และ 45 ตามลำดับ ในวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 7

ยีสต์ MU15Y สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเช่นเดียวกับเชื้ออื่น ๆ แต่อัตราการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบต่ำกว่า โดยมีจำนวนสูงสุด 9×10^7 CFU/ml ในวันที่ 7 ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดและ C9-C33 เหลืออยู่เป็นร้อยละ 23 และ 7 ตามลำดับในวันที่ 7 ดังรูปที่ 8



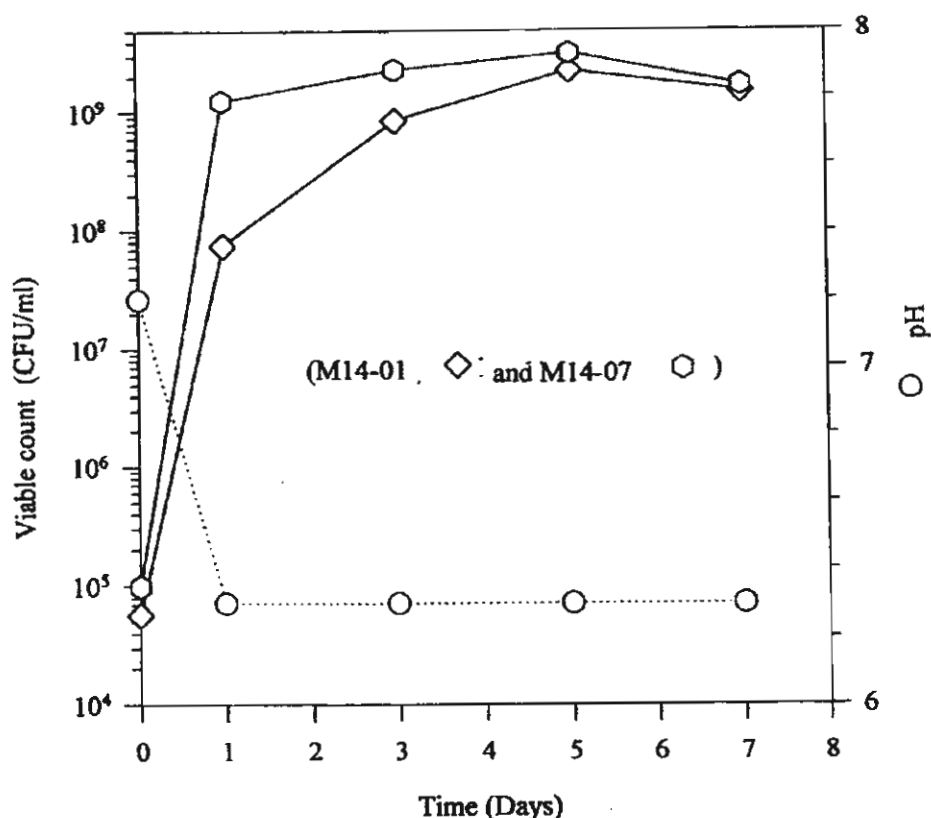
รูปที่ 7 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของ MR1/7-011 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เซลล์แบบหมวนวน 200 รอบต่อนาทีที่ 30 °C



รูปที่ 8 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของยีสต์ MU15Y ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เซลล์แบบหมวนวน 200 รอบต่อนาทีที่ 30 °C

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบของจุลินทรีย์ผสมหลายสายพันธุ์ (mixed culture)

การเจริญเติบโตของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil+0.007 M K_2HPO_4 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 9 จำนวนของ M14-07 ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน ได้ 1×10^9 CFU/ml และเพิ่มอย่างช้าจนได้ปริมาณสูงสุดในวันที่ 5 คือ 3×10^9 CFU/ml และเหลือ 2×10^9 CFU/ml ในวันที่ 7 ในขณะที่ M14-01 มีปริมาณ 8×10^7 , 2×10^9 และ 1.5×10^9 CFU/ml ในวันที่ 1, 5 และ 7 ตามลำดับ



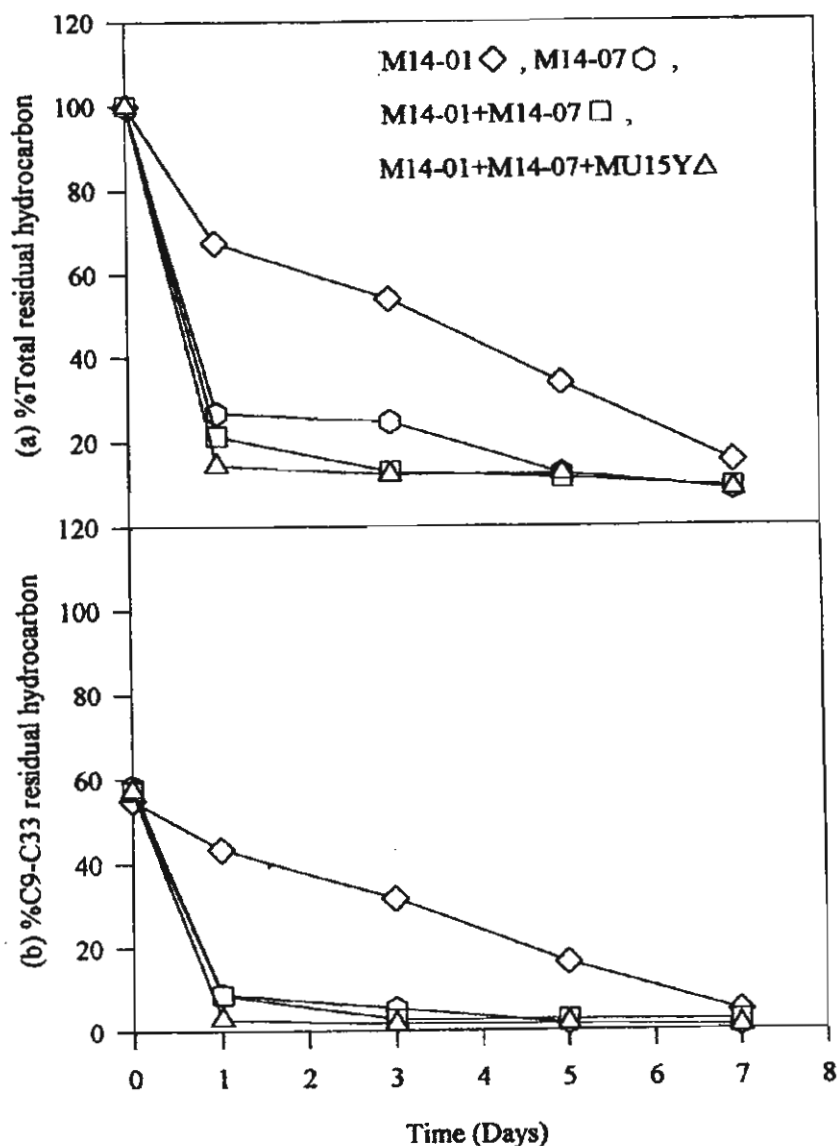
รูปที่ 9 การเจริญเติบโตของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C

ปริมาณการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 แสดงไว้ในรูปที่ 10 ไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วเหลือร้อยละ 21 ภายใน 1 วัน จากนั้นลดลงเรื่อย ๆ จนถึงร้อยละ 9 ในวันที่ 7 (รูปที่ 10a) ส่วนไฮโดรคาร์บอน C9-C33 มีรูปแบบการลดคล้ายของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด โดยลดลงจากร้อยละ 57 ลงเหลือร้อยละ 9 และ 2 ในวันที่ 1 และ 7 ตามลำดับ (รูปที่ 10 b)

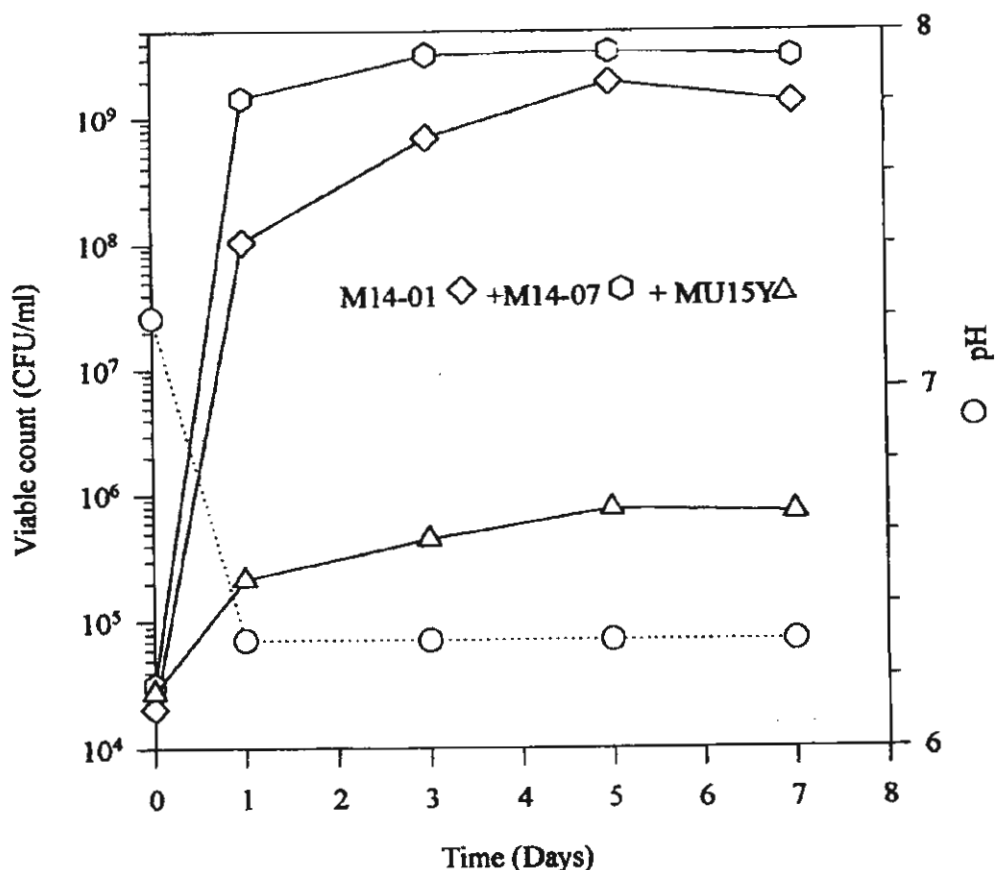
การเจริญเติบโตของเชื้อผสม M14-01, M14-07 และ MU15Y ในอาหารเหลว BH+0.5% oil+0.007 M K_2HPO_4 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 11 เชื้อ M14-01 และ M14-07 ยังคงมีการเจริญเติบโตเหมือนเมื่อก่อนอยู่ด้วยกันเพียง 2 ชนิด คือ จำนวนของ M14-07 ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน ได้ 1×10^9 CFU/ml และเพิ่มอย่างช้าจนได้ปริมาณสูงสุดในวันที่ 5 คือ 3.4×10^9 CFU/ml และเหลือ 3.2×10^9 CFU/ml ในวันที่ 7 ในขณะที่ M14-01 มีปริมาณ 1×10^8 , 2×10^9 และ 1×10^9 CFU/ml ในวันที่ 1, 5 และ 7 ตามลำดับ ส่วนยีสต์ MU15Y มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 3×10^4 CFU/ml เป็น 2×10^5 CFU/ml ใน 1 วัน

เพิ่มขึ้นได้ปริมาณสูงสุด 8×10^5 CFU/ml ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้น ค่อย ๆ ลดลงเหลือ 7×10^5 CFU/ml ในวันที่ 7

ปริมาณการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยเชื้อผสม M14-01, M14-07 และ MU15Y แสดงไว้ในรูปที่ 10 ไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วร้อยละ 14 ภายใน 1 วัน จากนั้นลดลงเรื่อย ๆ จนถึงร้อยละ 8 ในวันที่ 7 (รูปที่ 10a) ส่วนไฮโดรคาร์บอน C9-C33 มีรูปแบบการลดคล้ายของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด โดยลดลงจากร้อยละ 57 ลงเหลือร้อยละ 3 และ 1 ในวันที่ 1 และ 7 ตามลำดับ (รูปที่ 10 b)



รูปที่ 10 การย่อยสลายน้ำมันดิบ Tapis ของเชื้อผสมกลุ่มต่าง ๆ เทียบกับเชื้อบริสุทธิ์ M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เซ้าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C



รูปที่ 11 การเจริญเติบโตของเชื้อผสม M14-01, M14-07 และ MU15Y ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เขย่าแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C

การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil+0.007 M K_2HPO_4 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 12 เชื้อ M14-01 และ M14-07 พบว่า จำนวนของ M14 ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน จาก 7×10^6 CFU/ml เป็น 2×10^9 CFU/ml จากนั้น ลดลงอย่างช้า ๆ เหลือ 1×10^9 CFU/ml ในวันที่ 7

ปริมาณการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยเชื้อผสม M14 พบว่า ไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วเหลือร้อยละ 17 ภายใน 1 วัน จากนั้นลดลงเรื่อย ๆ จนถึงร้อยละ 13 ในวันที่ 7 ส่วนไฮโดรคาร์บอน C9-C33 มีรูปแบบการลดคล้ายของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด โดยลดลงจากร้อยละ 57 ลงเหลือร้อยละ 2 และ 1 ในวันที่ 1 และ 7 ตามลำดับ

การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสมในตัวอย่างน้ำจากบ่อเดิมอากาศของโรงกลั่นน้ำมันบางจากในอาหารเหลว BH+0.5% oil+0.007 M K_2HPO_4 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 13 จำนวนเชื้อได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน จาก 7×10^6 CFU/ml เป็น 3×10^9 CFU/ml และลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 4×10^8 CFU/ml ในวันที่ 3 จนกระทั่งเหลือ 2×10^8 CFU/ml ในวันที่ 7

ปริมาณการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยเชื้อผสมในตัวอย่างน้ำจากบ่อเดิมอากาศของโรงกลั่นน้ำมันบางจาก พบว่า ไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วเหลือร้อยละ 13 ภายใน 1 วัน จากนั้นลดลงเรื่อย ๆ จนถึงร้อยละ 7 ในวันที่ 7 ส่วนไฮโดรคาร์บอน C9-C33 มีรูปแบบการลดคล้ายของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด โดยลดลงจากร้อยละ 57 ลงเหลือร้อยละ 3 และ

1 ในวันที่ 1 และ 7 ตามลำดับ

ผลเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่า MR1/7-011 มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันดิบได้ต่ำมาก เปรียบเทียบได้จากปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับเชื้อผสม M14-01+M14-07 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เชื้อ MR1/7-011 เป็นเชื้อที่สร้าง Biosurfactant ที่มีโครงสร้างคล้าย Surfactin ในอาหารชนิด Nutrient agar หรือ broth (ภูมินาถ ชื่นชมรัตน์ 2541 นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล - ข้อมูลภายใน) แต่ไม่ได้เป็นเชื้อที่ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดี

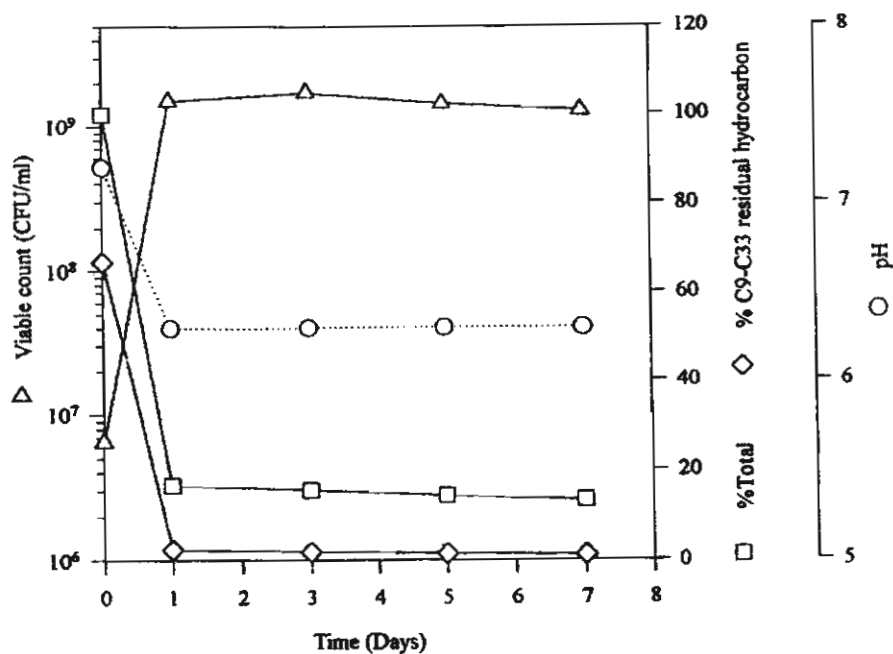
ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือจากการย่อยในวันที่ 1 โดยยีสต์ MU15Y เปรียบเทียบกับการย่อยโดยใช้เชื้อผสม M14-01+M14-07 มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แม้ว่าวันที่ 7 ผลที่ได้จากการย่อยจะไม่ต่างกันทางสถิติก็ตาม ผลที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะการเจริญเติบโตช้ากว่าของยีสต์ในอาหารเหลว BH ซึ่งเป็น minimum

➢ M14 สามารถย่อยน้ำมันดิบได้ โดยปริมาณน้ำมันที่เหลือมีปริมาณใกล้เคียงกับ M14-01+M14-07 และกลุ่มเชื้อในน้ำจากบ่อน้ำมันของโรงกลั่นบางจาก โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ มีกระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถคัดเลือกและฝึกให้ย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีเท่า ๆ กับเชื้อที่มีความคุ้นเคยอยู่ก่อนแล้ว เช่น ในบ่อน้ำมันของโรงกลั่นน้ำมัน

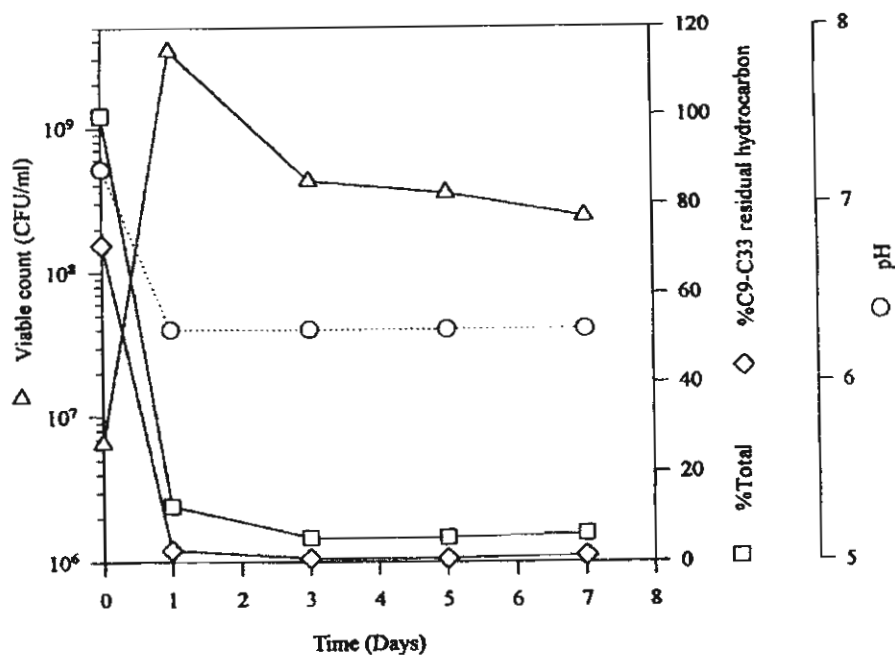
ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันดิบของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และจุลินทรีย์ผสม

Culture	% residual total hydrocarbon*			% residual C9-C33 hydrocarbon*		
	day0	day1	day7	day0	day1	day7
M14-01	100 ^a	67.59 ^c	15.36 ^{de}	57.34 ^f	43.30 ^h	4.55 ^k
M14-07	100 ^a	26.82 ^d	8.51 ^e	57.34 ^f	8.79 ^g	0.93 ^k
MR1/7-011	100 ^a	79.90 ^b	65.50 ^c	57.34 ^f	50.94 ^g	44.51 ^h
MU15Y	100 ^a	70.05 ^{bc}	23.08 ^{de}	57.34 ^f	36.60 ⁱ	7.26 ^j
M14-01+07	100 ^a	21.36 ^{de}	9.15 ^e	57.34 ^f	8.55 ^j	2.48 ^k
M14	100 ^a	16.67 ^{de}	13.31 ^{de}	57.34 ^f	1.97 ^k	0.93 ^k
Bangchak	100 ^a	12.56 ^{de}	6.92 ^e	57.34 ^f	2.68 ^k	1.21 ^k
M14-01+07+MU15Y	100 ^a	14.40 ^{de}	8.38 ^e	57.34 ^f	2.82 ^k	0.85 ^k

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 12 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม กลุ่ม M14 ในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เซลล์แบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C



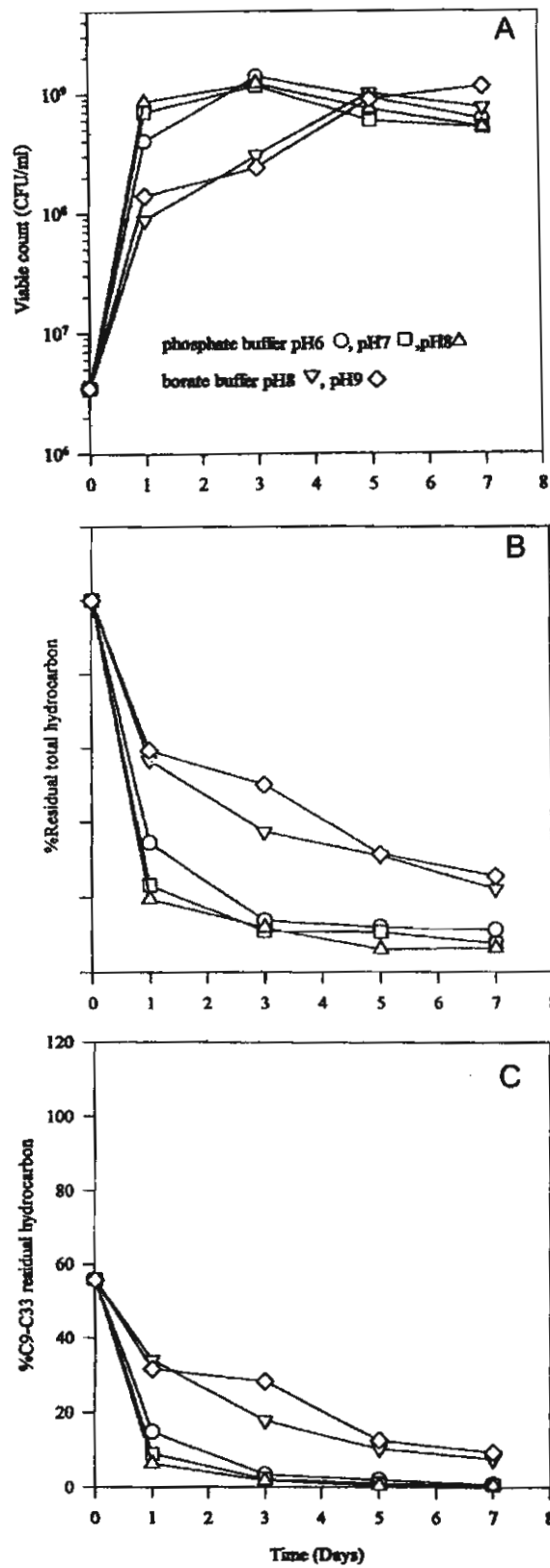
รูปที่ 13 การเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสมในตัวอย่างน้ำจากบ่อเดิมอากาศของโรงกลั่น น้ำมันบางจากในอาหารเหลว BH+0.5% oil + 0.007 M K_2HPO_4 เซลล์แบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการย่อยสลายน้ำมันดิบ

ผลของ pH

การเลี้ยงเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และปรับ pH เป็น 6, 7, 8 และ 9 ด้วย 0.1 M phosphate และ borate buffer พบว่า มีการเจริญเติบโตได้ดีตลอดช่วง pH ที่ศึกษา ปริมาณของเชื้อที่ได้ในวันที่ 7 ของการศึกษา คือ ประมาณ 8×10^8 CFU/ml แม้ว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีใน phosphate buffer (8×10^8 CFU/ml) ในวันที่ 1 ดีกว่าใน borate buffer (1×10^8 CFU/ml) (รูปที่ 14A) การย่อยสลายน้ำมันดิบทั้งไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (รูปที่ 14B) และไฮโดรคาร์บอน C9-C33 (รูปที่ 14C) ใน phosphate buffer ทุกค่า pH เป็นไปได้ดีกว่าใน borate buffer โดยในวันที่ 1 การย่อยสลายของไฮโดรคาร์บอนทั้ง 2 ชนิดได้มากที่สุด (เหลือร้อยละ 20 สำหรับไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด และร้อยละ 9 สำหรับไฮโดรคาร์บอน C9-C33) ในอาหารที่มี pH 8 (phosphate buffer) และยังคงลดลงอย่างช้า ๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง (7 วัน) แต่ค่าการย่อยสลายไม่แตกต่างกันมากนัก ผลเช่นเดียวกันใน borate buffer ทั้ง 2 ค่า pH คือ อัตราการลดลงของไฮโดรคาร์บอนทั้งสองชนิดมีมากในวันแรก และค่อยลดลงอย่างช้าไปจนตลอดการทดลอง โดยมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือมากกว่าที่มีอยู่ในอาหารที่มี phosphate buffer ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

pH ของน้ำภายในบ่อน้ำบาดของโรงกลั่นบางจาก มีค่าระหว่าง pH 6-9 (จงโปรด ศษภูมิ 2537 ติดต่อกับการภายใน) และ pH ของน้ำที่มีน้ำมันปนเปื้อนจากถังเก็บ มีค่าระหว่าง 7.2 – 8.1 (Malley *et al.*, 1993)



รูปที่ 14 ผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และมี 0.1 M phosphate หรือ borate buffer เขย่าด้วยแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 9 ผลของ pH ต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบ โดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis + 0.1M ของ buffer ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).

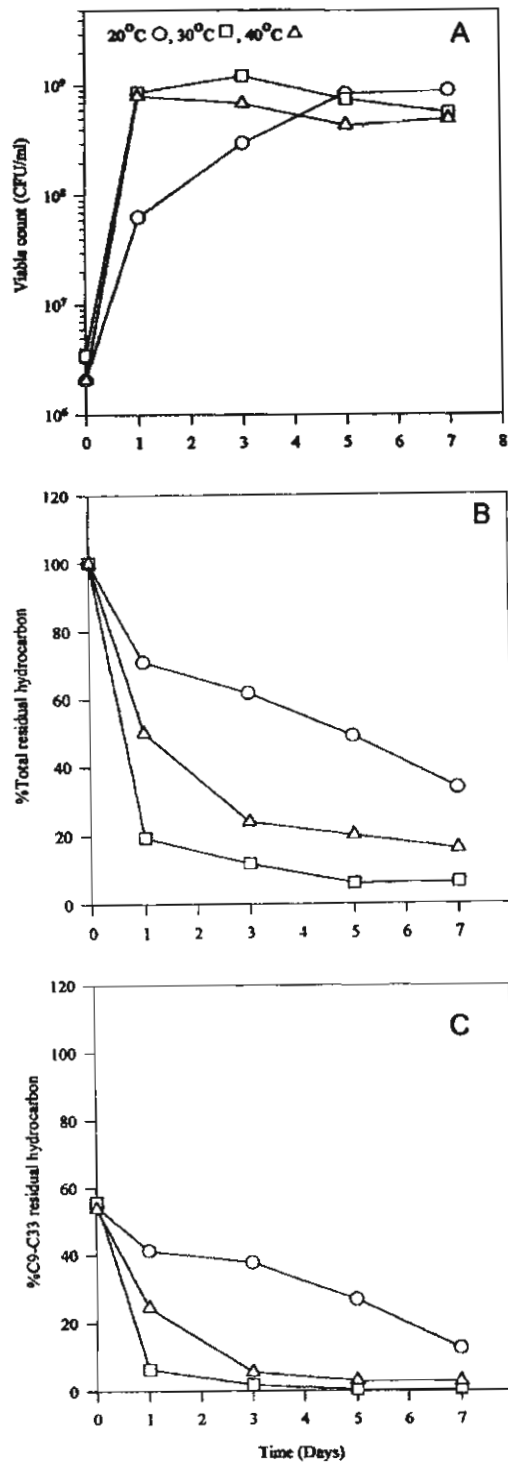
pH-buffer	% residual total hydrocarbon*			% residual C9-C33 hydrocarbon*		
	day0	day1	day7	day0	day1	day7
6-phosphate	100 ^a	34.55 ^c	11.25 ^{cd}	55.83 ^e	15.01 ^g	0.82 ⁱ
7-phosphate	100 ^a	23.22 ^{cd}	7.56 ^d	55.83 ^e	9.00 ^h	0.63 ⁱ
8-phosphate	100 ^a	19.51 ^{cd}	6.33 ^d	55.83 ^e	6.30 ^h	0.51 ⁱ
8-borate	100 ^a	56.90 ^b	22.22 ^{cd}	55.83 ^e	34.01 ^f	7.54 ^h
9-borate	100 ^a	59.54 ^b	25.68 ^{cd}	55.83 ^e	31.59 ^f	9.43 ^h

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

ผลของอุณหภูมิ

การทดลองเพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ณ อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 °C พบว่า เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °C (รูปที่ 15A) ได้ปริมาณเชื้อสูงสุด 8×10^8 CFU/ml ส่วนการย่อยสลายน้ำมันดิบ พบว่า ทั้งไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (รูปที่ 15B) และ C9-C33 (รูปที่ 15C) ถูกย่อยสลายได้ดีที่อุณหภูมิ 30 °C ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10

ณ อุณหภูมิต่ำ ไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำอยู่ได้นานขึ้นในอาหาร เนื่องจากการระเหยลดน้อยลง (Atlas and Bartha, 1972a) ซึ่งอาจมีผลเป็นอันตรายต่อเซลล์ของเชื้อได้ นอกจากนี้ ไฮโดรคาร์บอนที่มีโมเลกุลใหญ่อาจเปลี่ยนแปลงสภาพกลายเป็นของแข็ง ทำให้ยากต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (Wong and Goldsmith, 1988) ทำให้น้ำมันดิบมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น มีผลต่อการละลายที่น้อยลง (Atlas, 1981) มีรายงานว่า pristane ซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดแขนงที่ยากต่อการย่อยสลายของเชื้อ ถูกย่อยได้ยากขึ้นอีก ถ้าอยู่ในสภาพที่เย็น (Wilson and Bradley, 1996)



รูปที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และมี 0.1 M phosphate pH 8 เซ้าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis + 0.1M phosphate buffer pH8 เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).

อุณหภูมิ	% residual total hydrocarbon*			% residual C9-C33 hydrocarbon*		
	day0	day1	day7	day0	day1	day7
20	100 ^a	70.91 ^c	33.68 ^f	54.55 ⁱ	41.23 ^k	12.49 ⁿ
30	100 ^a	19.51 ^g	6.33 ^h	55.83 ⁱ	6.30 ^o	0.51 ^p
40	100 ^a	50.07 ^e	16.11 ^g	53.83 ⁱ	24.51 ^m	2.74 ^{op}
Abiotic loss at 40 °C	100 ^a	79.61 ^b	58.21 ^d	55.83 ⁱ	47.79 ^j	36.35 ^l

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

ผลของแหล่งคาร์บอน

ผลของชนิด n-alkane

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 11) แสดงให้เห็นได้ถึงปริมาณน้ำมันที่ลดลงไปเรื่อยๆ ในแต่ละวัน และเมื่อศึกษาผลการย่อย พบว่า alkane โมเลกุลเล็ก จะถูกย่อยได้เร็วที่สุดในวันแรกๆ และ alkane โมเลกุลใหญ่กว่า จะถูกย่อยเป็นลำดับถัดมา นอกจากนั้นยังพบว่า pristane ซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีแขนง ได้มีรายงานว่าย่อยได้ยาก สามารถถูกย่อยได้เช่นเดียวกัน แต่ย่อยได้ช้าที่สุดในจำนวนไฮโดรคาร์บอนที่ทดสอบ

การทดลองในขั้นตอนนี้ จึงสรุปได้ว่าการย่อยไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดเกิดขึ้นพร้อมๆ กันแต่อัตราเร็วในการย่อย hydrocarbon นั้นพบว่า straight alkane ย่อยได้เร็วกว่า branched alkane นอกจากนั้น straight alkane โมเลกุลเล็ก ถูกย่อยได้เร็วกว่า straight alkane โมเลกุลใหญ่อีกด้วย ซึ่งอัตราเร็วในการย่อยน่าจะขึ้นกับขนาดและรูปร่างของโมเลกุล hydrocarbon นั้นเอง

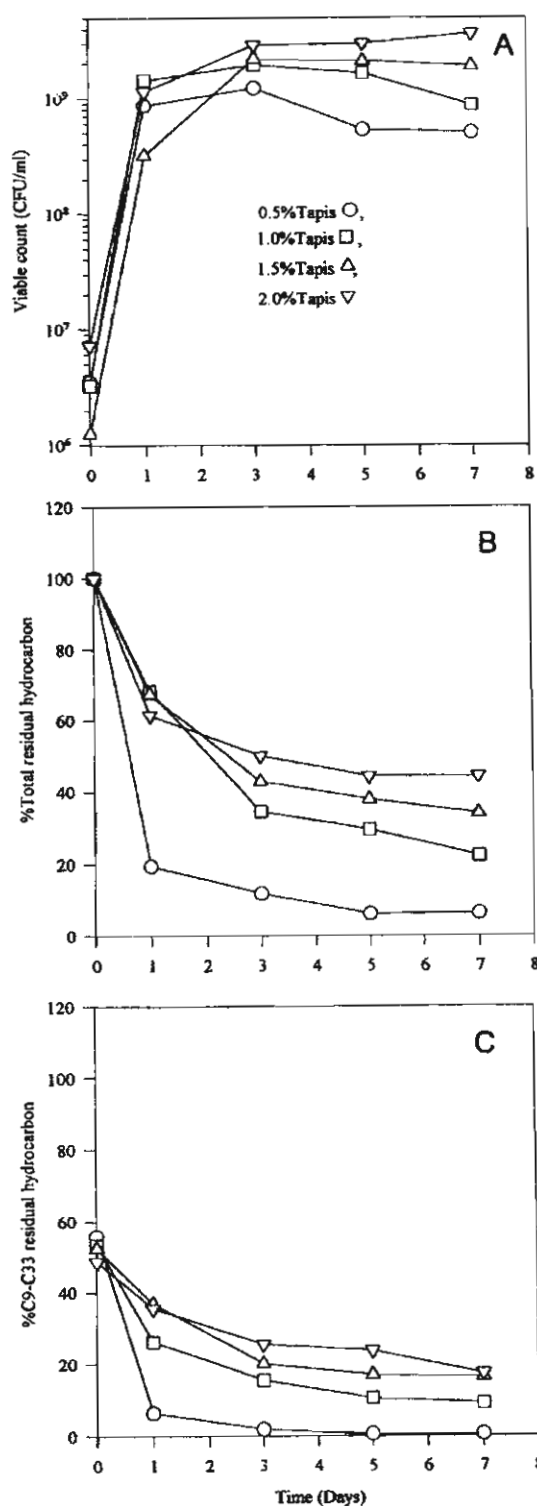
ตารางที่ 11 การย่อยสลายของ alkane ชนิดต่าง ๆ (0.1 g total weight) โดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH ซึ่งมี 0.1M phosphate buffer pH8 ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).

Hydrocarbon	% abiotic loss					% biodegradation			
	day0	day1	day3	day5	day7	day1	day3	day5	day7
n-Dodecane	100	89.86	73.78	61.54	24.48	2.4	1.04	0.96	0.84
n-Tridecane	100	94.08	92.11	84.54	58.22	4.49	1.68	1.65	1.52
n-Tetradecane	100	99.66	98.31	93.56	76.61	7	2.62	2.24	2.23
n-Pentadecane	100	100	99.32	96.27	83.05	9.08	3.45	2.87	2.69
n-Hexadecane	100	100	100	97.62	86.73	11.2	4.47	3.63	3.26
Pristane	100	100	100	98	88.67	53.67	48.26	38.01	25.64
n-Octadecane	100	100	100	99.65	90.21	14.81	6.94	5.28	4.36
n-Nonadecane	100	100	100	100	91.13	16.07	7.8	5.74	4.64

ผลของความเข้มข้นน้ำมันดิบ Tapis

พบว่า อัตราในการเจริญเติบโตของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 เท่า ๆ กัน ในทุกปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันดิบ Tapis ที่ใช้ ภายใต้สภาพการทดสอบ ปริมาณเชื้อที่ได้แตกต่างกันบ้างเล็กน้อยตามปริมาณน้ำมันที่มีอยู่ (รูปที่ 16A) ส่วนการย่อยสลายน้ำมันดิบ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 พบว่า ปริมาณที่เหลืออยู่ทั้งของไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดและ C9-C33 มีน้อยที่สุด (รูปที่ 16B และ C) และแสดงไว้ในตารางที่ 12

ปริมาณของน้ำมันดิบที่น้อยสามารถละลายในน้ำได้ดีกว่าปริมาณที่มาก นอกจากนี้ ปริมาณน้ำมันที่มาก รวมทั้งสารที่ปนเปื้อนมากับน้ำมันมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ โดยทำให้อาหารชนิดอื่นที่ต้องการไม่เพียงพอหรือปิดกั้นปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้ (Brown *et al.*, 1983; Leathy and Colwell, 1990)



รูปที่ 16 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดิบต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มี 0.1 M phosphate pH 8 เซย่าเลี้ยงแบบหมวนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 12 ผลของปริมาณน้ำมันดิบต่อการย่อยสลายน้ำมันโดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis + 0.1M phosphate buffer, pH 8 ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบ ต่อนาที).

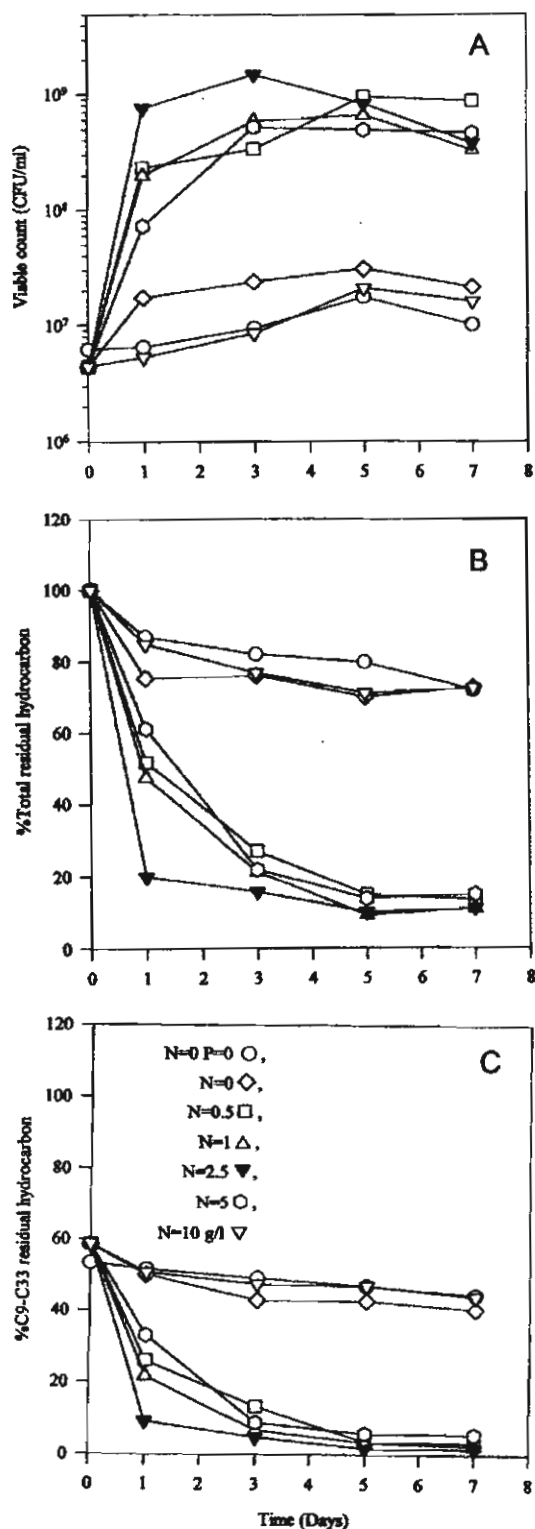
Crude oil concentration %	% residual total hydrocarbon*			% residual C9-C33 hydrocarbon*		
	day0	day1	day7	day0	day1	day7
0.5	100 ^a	19.51 ^e	6.33 ^f	55.83 ^g	6.30 ^k	0.51 ^k
1.0	100 ^a	68.25 ^b	22.26 ^e	53.42 ^g	2.61 ^{hi}	8.99 ^k
1.5	100 ^a	67.32 ^b	33.95 ^d	52.43 ^g	36.82 ^h	18.19 ^g
2.0	100 ^a	67.45 ^b	44.50 ^c	48.66 ^g	35.45 ^h	17.25 ^g

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

ผลของปริมาณไนโตรเจน

พบว่า ที่ปริมาณไนโตรเจน 2.5 กรัมต่อลิตร เชื้อผสม M14-01 และ M14-07 มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด และย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากที่สุด ในช่วงปริมาณไนโตรเจน ภายใต้สภาพการทดสอบที่ใช้ (รูปที่ 17) ปริมาณไนโตรเจนที่สูงกว่า (5 และ 10 กรัมต่อลิตร) แสดงผลรบกวนหรือยับยั้งการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ ซึ่งเห็นได้ชัดที่ปริมาณไนโตรเจน 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 13

ความต้องการไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบแตกต่างกันไปตามชนิด ความเข้มข้น และแหล่งสภาพแวดล้อม (Floodgate, 1979 – 4 nmol nitrogen for 1 ng Kuwait crude oil 14 °C; Bridie and Bos, 1971 – 3.2 mg/l ammonium nitrogen for 70 mg/l Kuwait crude, seawater; Atlas and Bartha, 1972b – 1 mg/l nitrogen for 8 g/l Sweden crude, New Jersey coastal seawater; Reisfile et al., 1972 – 11 mg/l nitrogen for 1 g/l Iranian crude, Mediterranean seawater)



รูปที่ 17 ผลของปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และมี 0.1 M phosphate pH 8 เซย่าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 13 ผลของปริมาณไนโตรเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis + 0.1M phosphate buffer, pH8 ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).

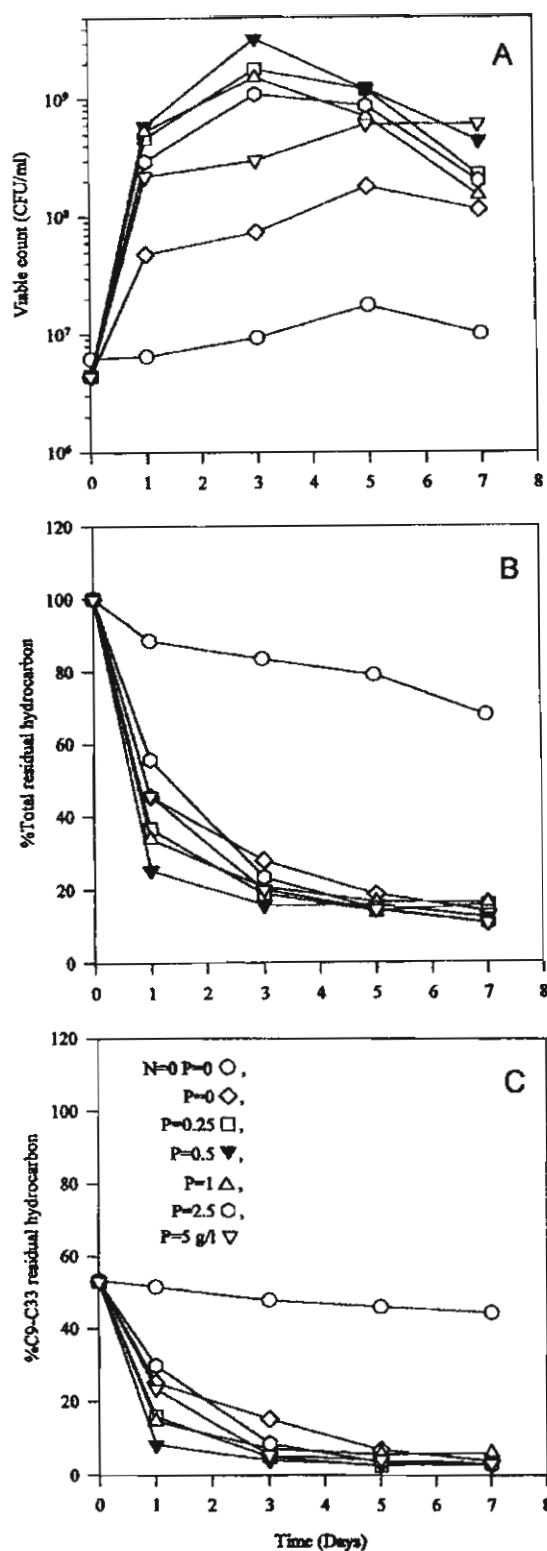
Nitrogen concentration (g/l)	% residual total hydrocarbon*			% residual C9-C33 hydrocarbon*		
	day0	day1	day7	day0	day1	day7
control (no N & P)	100 ^a	87 ^b	71.85 ^c	53.40 ^a	51.52 ^{hi}	44.46 ⁱ
0.0	100 ^a	75.35 ^c	72.67 ^c	58.75 ^g	44.97 ^j	40.46 ^j
0.5	100 ^a	51.75 ^e	13.41 ^f	58.75 ^g	25.91 ^k	3.37 ⁿ
1.0	100 ^a	47.40 ^e	11.02 ^f	58.75 ^g	21.64 ^j	2.46 ⁿ
2.5	100 ^a	20.03 ^f	11.01 ^f	58.75 ^g	9.21 ^m	1.66 ⁿ
5.0	100 ^a	61.21 ^d	14.93 ^f	58.75 ^g	33.05 ^j	5.72 ^{mn}
10.0	100 ^a	84.93 ^b	72.42 ^c	58.75 ^g	50.61 ^h	44.09 ^j

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

ผลของปริมาณฟอสฟอรัส

พบว่า ที่ปริมาณฟอสฟอรัส 0.5 กรัมต่อลิตร เชื้อผสม M14-01 และ M14-07 มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด และย่อยสลายน้ำมันดิบได้มากที่สุด ในช่วงปริมาณฟอสฟอรัส ภายใต้สภาพการทดสอบที่ใช้ (รูปที่ 18) แต่อย่างไรก็ดี ทั้งการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบในปริมาณฟอสฟอรัสอื่น ๆ ไม่ได้แตกต่างมากนัก ซึ่งแตกต่างจากผลของปริมาณไนโตรเจนที่เห็นได้ชัดเจนกว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่สูง (5 กรัมต่อลิตร) แสดงผลรบกวนหรือยับยั้งการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ ส่วนการทดลองที่ไม่ได้เติมฟอสฟอรัส เห็นได้ว่าการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ค่อนข้างดี อาจเนื่องมาจากมีฟอสฟอรัสปนเปื้อนมากับน้ำมันดิบในปริมาณเพียงพอ หรือเชื้อต้องการใช้ฟอสฟอรัสในปริมาณไม่มากนัก เมื่อเทียบกับปริมาณไนโตรเจน ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลืออยู่ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 14

ปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมในการย่อยสลายชีวภาพ ได้มีการศึกษาพบว่า อยู่ระหว่าง 2×10^{-4} ถึง 8×10^{-4} M สำหรับในน้ำทะเล และระหว่าง 1.5×10^{-3} ถึง 3×10^{-3} M สำหรับน้ำทะเลใกล้ชายฝั่งที่มีปริมาณน้ำจืดผสมอยู่มากพอควร แต่ถ้าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (LePetit and N'Guyen, 1976)



รูปที่ 18 ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อผสม M14-01 และ M14-07 ในอาหารเหลว BH ที่มีน้ำมันดิบ Tapis ร้อยละ 0.5 และมี 0.1 M phosphate pH 8 เซ้าเลี้ยงแบบหมุนวน 200 รอบต่อนาที 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

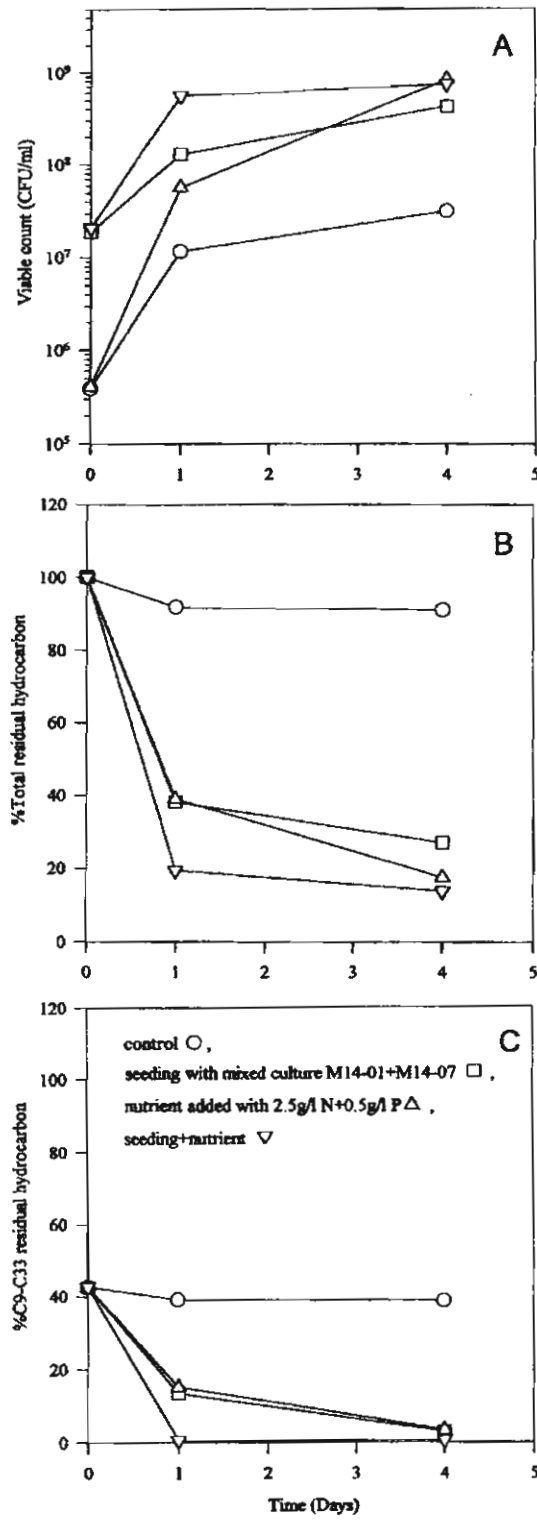
ตารางที่ 14 ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดย mixed culture (M14-01 and M14-07) ใน 50 ml ของ BH broth + 0.5% Tapis ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).

Phosphorus concentration (g/l)	% residual total hydrocarbon*			% residual C9-C33 hydrocarbon*		
	day0	day1	day7	day0	day1	day7
control (no N & P)	100 ^a	87 ^b	71.85 ^c	53.4 ^l	51.52 ^k	44.46 ⁱ
0.0	100 ^a	45.52 ^{de}	13.88 ⁱ	53.01 ^j	25.23 ⁿ	3.94 ^q
0.25	100 ^a	36.63 ^{ef}	15.75 ⁱ	53.01 ^j	15.88 ^o	3.3 ^q
0.5	100 ^a	25.4 ^{gh}	12.18 ⁱ	53.01 ^j	8.39 ^p	2.9 ^q
1.0	100 ^a	33.79 ^{fg}	16.35 ^{hi}	53.01 ^j	14.64 ^o	6.23 ^p
2.5	100 ^a	55.66 ^d	10.71 ⁱ	53.01 ^j	29.89 ^m	2.74 ^q
5.0	100 ^a	45.7 ^{de}	10.59 ⁱ	53.01 ^j	23.5 ⁿ	3.22 ^q

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

การศึกษาเปรียบเทียบการบำบัดน้ำเสียจากโรงกลั่นบางจาก

รูปที่ 19 แสดงผลที่ได้จากวิธีการต่าง ๆ ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันปนเปื้อน พบว่า การเติมสารอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (nutrient addition) ช่วยทำให้เชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติและเชื้อที่เติม (M14-01 และ M14-07) มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และมีการย่อยสลายน้ำมันได้ดีขึ้นด้วย การย่อยสลายน้ำมันเป็นไปได้ดีที่สุดภายใต้สภาพการทดลอง เมื่อมีการเติมเชื้อลงไปช่วยและเติมสารอาหารลงไปด้วย (seeding & nutrient addition) ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือได้แสดงไว้ในตารางที่ 15



รูปที่ 19 สภาวะต่าง ๆ ในการบำบัดน้ำเสียโรงกลั่นบางจาก

ตารางที่ 15 การบำบัดน้ำเสียจากบ่อแยกน้ำมันของโรงกลั่นบางจาก (เจือจาง 1/4 เท่า ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วันใน rotary shaker (200 รอบต่อนาที).

Condition	% residual total hydrocarbon*			% residual C9-C33 hydrocarbon*		
	day0	day1	day4	day0	day1	day4
control (no addition)	100 ^a	91.75 ^a	91.12 ^a	42.66 ^d	39.06 ^e	38.81 ^e
M14-01+M14-07 seeding	100 ^a	38.22 ^b	27.12 ^{bc}	42.66 ^d	13.39 ^f	2.91 ^g
N + P (2.5 + 0.5 g/l) nutrient addition	100 ^a	39.08 ^b	17.67 ^{bc}	42.66 ^d	15.18 ^f	3.41 ^g
Seeding+Nutrient addition	100 ^a	19.45 ^{bc}	14.10 ^c	42.66 ^d	0.57 ^g	0.51 ^g

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

หนังสืออ้างอิง

- Atlas, R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180-209.
- Atlas, R.M. (1984) *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing, New York
- Atlas, R.M. and Bartha, R. (1972a) Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. *Can. J. Microbiol.* 18, 1851-1855.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. (1972b) Degradation and mineralization of petroleum in seawater: Limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 309-317.
- Bridie, A.L. and Bos, J. (1971) Biological degradation of mineral oil in seawater. *J. Inst. Pet. London* 57, 270-277.
- Brown, K.W., Donnelly, K.C. and Deuel, L.E. (1983) Effects of mineral nutrient sludge application rate, and application frequency on biodegradation of two oily sludges. *Microb. Ecol.* 9, 363-373.
- Buckley, E.N., Janas, R.B. and Pfaender, F. K. (1976) Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: Relationship of hydrocarbon utilization to ambient hydrocarbon concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 232-237
- Cheremisinolf, P.N., Patel, Y.B. and Shah, M.K. (1990) Detecting leaks in underground storage tanks. *Pollut. Eng.* 22, 74-78
- Cooney, J.J. (1990) Microbial Ecology and Hydrocarbon Degradation. Paper presented at the Alaska story Symposium. Cincinnati, OH. Sept 17-18, p. 2.
- Floodgate, G.D. (1979) Nutrient limitation, pp. 107-118. In Bourquin, A.W. and Pritchard, P.H. (eds.), *Proceedings of workshop, Microbial degradation of pollutants in marine environments*. EPA-660/19-79-012. Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, Fla.
- Floodgate, G.D. (1984) The Fate of Petroleum in Marine Environments, In Atlas, R.M. (ed.) *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Co., New York, p. 373.
- Green, J. and Trett, M.W. (1989) The Fate and Effects of Oil in Freshwater, Chapter 4, pp. 81-171, Elsevier Science Publishers Ltd.
- Gutnick, D.L. and Rosenberg, E. (1977) Oil tankers and pollution: A microbiological approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 31, 379-396.
- Hoeppel, R.E., Hincee, R.E. and Arthur, M.F. (1991) Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons. *J. Ind. Microbiol.* 8, 141-146
- Hollaway, S.L., Faw, R.M. and Sizemore, R.K. (1980) The bacterial community composition of an active oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 11, 153-156.
- Leathy, J.G. and Colwell, R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbon in the environment. *Microbiol. Rev.* 54, 305-315.

- LePetit, J. and N'Guyen, M.H. (1976) Besoius en phosphore des bacteries metabolisant les hydrocarbures en mer. Can. J. Microbiol. 22,1364-1373.
- Lindstrom, J.E., Prince, R.C., Clark, J.C., Grossman, M.J., Yeager, T.R., Braddock, J.F. and Brown, E.J. (1991) Microbial Populations and Hydrocarbon Biodegradation Potentials in Fertilized Shoreline Sediments Affected by the T/V Exxon Valdez Oil Spill. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2514-2522.
- Malley, J.P., Eliason, P.A. and Wagler, J. (1993) Point-of-entry treatment of petroleum contaminated water supplies. Wat. Environ. Res. 65, 119-128.
- Mueller, J.G., Resnick, S.M., Shelton, M.E. and Pritchard, P.H. (1992) Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe bay crude oil. J. Ind. Microbiol. 10, 95-102.
- Mulkins-Phipps, G.J. and Stewart, J.E. (1974) Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil. Appl. Microbiol. 28,547-552.
- Parekh, V.R., Traxler, R.W. and Sobek, J.M. (1977) n-Alkane oxidation enzyme of a Pseudomonad. Appl. Environ. Microbiol. 33, 881-884.
- Reid, G.W. and Streebin, L.E. (1972) Evaluation of waste waters from petroleum and coal processing prepared for Office of Research and Monitoring, US Environmental Protection Agency, EPA-R2-72-001, December, Washington, D.C.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E. and Ron, E.Z. (1992) Petroleum bioremediation - a multiphase problem. Biodegradation 3, 337-350.
- Singleton, I. (1994) Microbial Metabolism of Xenobiotics: Fundamental and Applied Research. J. Chem. Tech. Biotechnol. 59, 9-23.
- Sorkhoh, N.A., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Stretton, R.J. and Radwan, S.S. (1990) Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environment in Kuwait. Environ. Pollut. 65, 1-7.
- Southern Seaboard แผนงานพัฒนาพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคใต้: แนวคิดเชิงยุทธศาสตร์สู่ยุคใหม่ของการพัฒนาในทศวรรษหน้า (พฤศจิกายน 2532) สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคใต้ สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ
- Venosa, A.D., Haines, J.R., Nisamanpong, W., Govind, R., Pradhan, S. and Siddique, B. (1992) Efficacy of commercial products in enhancing oil biodegradation in closed laboratory reactors. J. Ind. Microbiol. 10, 13-23.
- U.S. Congress, Office of Technology Assessment, Bioremediation for Marine Oil Spills - Background Paper, OTA-BP-O-70 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, May 1991).
- Wade, R. (1990) The Exxon Valdez Oil Spill - The environmental health response to man-made disasters. J. Environ Health 52, 213-215.
- Wilson, N.G. and Bradley, G. (1996) Enhanced degradation of petrol (solvent diesel) in an aqueous system by immobilized *Pseudomonas fluorescens*. J. Appl Bacteriol. 80, 99-104.

- Wong, A.D. and Goldsmith, C.D. (1988) The impact of a chemostat discharge containing oil degrading bacteria on the biological kinetics of a refinery activated sludge process. *Wat. Sci. Technol.* 20, 131-136.
- Zobell, C.E. (1946) Action of Microorganisms on hydrocarbon. *Bacteriol. Rev.* 10, 1-49.

ผลที่ได้ (Output)

ผลที่ได้จากการวิจัย นอกเหนือจากความรู้ ประสบการณ์ในการวิจัย ยังได้

1. ผลิตบุคลากร ระดับปริญญาโท จำนวน ๑ คน คือ นางสาวกุลวดี ทองภูเบศร์ อาจารย์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า วิทยาเขตลาดกระบัง
2. วิทยานิพนธ์ของนางสาวกุลวดี ทองภูเบศร์ เรื่อง Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria in Thailand 1998 ISBN 974-661-454-1 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
3. ผลิตผู้ช่วยวิจัย จำนวน ๒ คน คือ นายเลิศศักดิ์ คำคงศักดิ์ และ นางสาวพุดตาน ไสริย์