



การเร่งการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินสภาพของเหลวเปี้ยก

โดยการเติมกลุ่มจุลินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

**Enhancement of Used Lubricating Oil Degradation in Soil Slurry with the
Addition of Microbial Consortia and Biosurfactant**

นฤมล มีบุญ

Naruemon Meeboon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเร่งการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินสภาพของเหลวเปือก
โดยการเติมกลุ่มจุลินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ผู้เขียน นางสาวนฤมล มีบุญ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลา ปี่ มณีรัตน์)

.....ประธานกรรมการ
(ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลา ปี่ มณีรัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นฤกุล อินทร์สังขา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเร่งการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินสภาพของเหลวเปือก
โดยการเติมกลุ่มจุลินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ผู้เขียน นางสาวนฤมล มีบุญ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (ULO) ในอาหาร Mineral Salt Medium (MSM) โดยใช้จุลินทรีย์เดี่ยวจำนวน 4 สายพันธุ์ ดังนี้ A คือ *Chryseobacterium* sp., B คือ *Sphingobacterium multivorum*, C คือ *Bacillus cereus* และ D คือ *Agrobacterium tumefaciens* จุลินทรีย์ผสมระหว่าง 4 สายพันธุ์ และกลุ่มเชื้อ SC9 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์และกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อน ULO ทำการทดสอบการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว 4 สายพันธุ์ (A, B, C, D), 2 สายพันธุ์ (AB, AC, AD, BC, BD, CD), 3 สายพันธุ์ (ABC, ABD, ACD, BCD), 4 สายพันธุ์ (ABCD) และกลุ่มเชื้อ SC9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ หลังจากทำการทดลอง 7 วัน พบว่า กลุ่มเชื้อ SC9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO สูงกว่าเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม ซึ่งสามารถย่อยสลาย ULO ได้ 44.5% และเมื่อศึกษาปัจจัยของปริมาณดิน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ค่าพีเอชเริ่มต้นของดินในสภาพของเหลวเปือกและแหล่งสารอาหารที่มีผลต่อการย่อยสลาย ULO โดยกลุ่มเชื้อ SC9 ในดินสภาพของเหลวเปือก หลังจากทำการทดลอง 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร MSM มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ที่เดิมดิน 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เชื้อเริ่มต้น 15% (ปริมาตรต่อปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลาย ULO ได้ 61.2% หลังจากนั้นศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย ULO โดยการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในดินสภาพของเหลวเปือกที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในดินสภาพของเหลวเปือกที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO สูงที่สุดถึง 88.6% ภายใน 30 วันที่ทำการทดลอง และสามารถลดปริมาณสารประกอบ aliphatic hydrocarbon และสารประกอบ aromatic hydrocarbon ที่เป็นองค์ประกอบใน ULO จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่ากลุ่มเชื้อ SC9 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินในสภาพของเหลวเปือกที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้

Thesis Title	Enhancement of Used Lubricating Oil Degradation in Soil Slurry with the Addition of Microbial Consortia and Biosurfactant
Author	Miss Naruemon Meeboon
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2008

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the biodegradability of used lubricating oil (ULO) in Mineral Salt Medium (MSM) using a pure and mixed bacterial culture and SC9 consortia of bacterial culture were isolated from oil contaminated soil. Four bacterial strains including *Chryseobacterium* sp., *Sphingobacterium multivorum*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens* were used as inoculum for ULO degradation in MSM medium in comparison with their mixtures and SC9 consortia. After 7 days of incubation, SC9 consortia was the most effective starter as evidenced by 44.5% degradation of ULO. Factors affecting ULO degradation by SC9 consortia in soil slurry including soil concentration, inoculum size, initial pH of soil slurry and nutrients source as well as with and without sterilization were studied. Maximal degradation rate of ULO (61.2%) was obtained when SC9 consortia was incubated in MSM medium at initial pH 8.0 supplemented with 10% (w/v) soil concentration, 15% (v/v) inoculum size, 40 g/L (NH₄)₂SO₄, 1.8 g/L K₂HPO₄ and 0.6 g/L KH₂PO₄ for 7 days. It was found that the maximum degradation up to 88.6% and aliphatic fraction and aromatic fraction of ULO was degraded within 30 days of experiment was obtained from unsterilized soil slurry supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant produced from *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. These results suggested that biosurfactant produced from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 and SC9 consortia have potential for apply in soil slurry bioremediation of ULO-contaminated soil.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลาณี มณีรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางการทำวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นฤกุล อินทร์สังขา กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่าอย่างยิ่งในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้โอกาสและกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณคุณณรรธิป ชูสุวรรณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรมทุกท่านสำหรับกำลังใจ และความอบอุ่นในการทำวิจัยในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนทุก ๆ ท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นฤมล มีบุญ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(6)
LIST OF TABLES.....	(7)
LIST OF FIGURES.....	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์.....	(12)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
บทนำตั้งเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	42
2. วิธีการวิจัย.....	43
วัสดุและอุปกรณ์.....	43
วิธีการวิเคราะห์.....	45
วิธีการทดลอง.....	47
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	54
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดิน.....	54
การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว, เชื้อผสมและกลุ่มเชื้อ ที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	55
ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อที่คัดเลือกได้ในดิน สภาพของเหลวเปียก.....	60
การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย ULO โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในดินสภาพของเหลวเปียกที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	77
4. บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	92
เอกสารอ้างอิง.....	94
ภาคผนวก.....	111
ประวัติผู้เขียน.....	114

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Components of car engine base oil.....	3
2. Properties of ULO.....	6
3. Microorganisms that have been reported to be able to use PAHs as their carbon and energy source.....	15
4. Type and microbial origin of biosurfactants.....	38
5. GC-MS conditions	46
6. Overview of microcosms set-up.....	52
7. Physical and chemical characteristics of soil sample.....	55
8. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the addition of single, mixed and consortium microorganisms in 50 mL MSM and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	57
9. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the addition of soil in 50 mL MSM and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	60
10. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the addition of various SC9 inoculum size in 50 mL MSM containing 10% soil and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	63
11. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the various initial pH in 50 mL MSM containing 10% soil and 15% SC9 consortia (2) inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	67
12. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the various nitrogen sources in 50 mL MSM with initial pH 8.0, containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	70
13. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the various ammonium sulphate concentrations in 50 mL MSM with initial pH 8.0, containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	73

LIST OF TABLES (cont.)

Table	Page
14. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the 4 g/L ammonium sulphate and various potassium source in 50 mL MSM with initial pH 8.0, containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	76
15. Effect of SC9 consortia on the degradation of low molecular weight aromatic hydrocarbon.....	91

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Peripheral pathways of alkane degradation.....	17
2. The two alternative pathways of aerobic degradation of aromatic compounds: <i>o</i> - and <i>m</i> - cleavage.....	20
3. Structure of surfactant.....	34
4. Structure of rhamnolipid different pH by <i>Pseudomonas</i> BOP 100 (a) 7.35 and (b) 8.5.....	35
5. Structure of sophorolipid.....	35
6. Structure of lichenysin (a) and surfactin (b)	35
7. Structure of (a) rubiwettin R1 (b) rubiwettin RG1.....	36
8. Structure of phosphatidylinositol.....	36
9. Structure of emulsan.....	37
10. Involvement of biosurfactants in hydrocarbons uptake	40
11. Degradation rate of ULO (1%) (A) and pH changes (B) with the addition of single, mixed and consortium microorganisms in 50 mL MSM and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	56
12. Effect of soil concentration on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM by SC9 consortia after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	61
13. Effect of SC9 consortia inoculum size on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM containing 10% soil after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	64
14. Effect of initial pH on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	66
15. Effect of nitrogen source on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM initial pH 8.0 containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	69

LIST OF FIGURES (cont.)

Figure	Page
16. Effect of ammonium sulphate concentration on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM initial pH 8.0 containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days....	72
17. Effect of phosphorus source on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM initial pH 8.0 containing 10% soil, 15% SC9 consortia inoculum size and 4g/L ammonium sulphate after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	75
18. Effect of crude biosurfactant produced from <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> subsp. <i>anitratus</i> SM7 on the degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM initial pH 8.0 containing 10% soil, 15% SC9 consortia inoculum size, 4 g/L ammonium sulphate, 1.8 g/L dipotassium hydrogenphosphate and 0.6 g/L potassium dihydrogenphosphate in sterilized and non-sterilized conditions after incubated at room temperature, 200 rpm for 0, 7 and 30 days.....	79
19. Total viable count after 30 days of degradation of ULO (1%) with the 4 g/L ammonium sulphate, 1.8 g/L dipotassium hydrogenphosphate and 0.6 g/L potassium dihydrogenphosphate in 50 mL MSM initial pH 8.0, containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.....	80
20. TLC-FID chromatogram of ULO extracted from ULO (1%) contaminated soil slurry sterilization and incubated at room temperature, 200 rpm for 30 days.....	85
21. TLC-FID chromatogram of ULO extracted from ULO (1%) contaminated soil slurry sterilization supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant and incubated at room temperature, 200 rpm for 30 days.....	86
22. TLC-FID chromatogram of ULO extracted from ULO (1%) contaminated soil slurry without sterilization and incubated at room temperature, 200 rpm for 30 days.....	87

LIST OF FIGURES (cont.)

Figure	Page
23. TLC-FID chromatogram of ULO extracted from ULO (1%) contaminated soil slurry without sterilization supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant and incubated at room temperature, 200 rpm for 30 days.....	88
24. GC-MS chromatogram of hydrocarbon fraction from ULO contaminated soil slurry sterilization and soil slurry sterilization supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant produced from <i>A. calcoaceticus</i> subsp. <i>anitratu</i> s SM7.....	89
25. GC-MS chromatogram of hydrocarbon fraction from ULO contaminated soil slurry without sterilization and soil slurry without sterilization supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant produced from <i>A. calcoaceticus</i> subsp. <i>anitratu</i> s SM7.....	90

ตัวย่อและสัญลักษณ์

DI	Deionized water
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
LO	น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ (Lubricating Oil)
MSM	Mineral Salt Medium
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
TLC-FID	Thin Layer Chromatography-Flame Ionization Detector
ULO	น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Used Lubricating Oil)

บทที่ 1

บทนำ

บทนำสั้นเรื่อง

ในปัจจุบันปิโตรเลียมคือแหล่งพลังงานหลักของประเทศซึ่งคิดเป็นประมาณ 56% ของพลังงานทั้งหมด ได้มีการนำปิโตรเลียมมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติได้จัดให้ของเสียจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และ LO เป็นของเสียอันตราย (วิภา ดันแพง, 2546) LO ประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ระเหยง่ายมีผลก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันแก่สิ่งมีชีวิต ส่วน ULO ยังประกอบด้วยโลหะหนัก เช่น Va, Pb, Al, Ni, Fe, Cr และ Zn เป็นต้น และสารประกอบ PAHs โดยสารเหล่านี้จะก่อให้เกิดความเป็นพิษเรื้อรัง เช่น การผ่าเหล่าและก่อให้เกิดมะเร็ง เป็นต้น (Boonchan *et al.*, 2000) การปนเปื้อนของ LO ในดินหรือแหล่งน้ำเป็นปัญหาหนึ่งที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Mercadé *et al.*, 1996) เพราะสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้มีความสามารถในการยึดเกาะกับอนุภาคตะกอนดินในสิ่งแวดล้อมได้ดีทำให้สารดังกล่าวมีความคงทนสูง ดังนั้นเมื่อสารเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจึงเกิดการตกค้างหรือสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน (Rockne *et al.*, 2002) การนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้บำบัดสารเคมีอันตรายมีข้อดี คือราคาถูก เป็นกระบวนการทางธรรมชาติ มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย และสามารถบำบัดในพื้นที่ได้โดยตรง (เอกวิธ ลือพร้อมชัย, 2546)

โดยทั่วไปการย่อยสลายน้ำมันในธรรมชาติมีความสลับซับซ้อนและเกิดขึ้นช้ามาก (Regina *et al.*, 2006) กลไกการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์นั้นเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยจุลินทรีย์จะออกซิไดซ์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมัน แล้วให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เช่น กรดอินทรีย์, แอลกอฮอล์, aldehyde และ ketone เป็นต้น อัตราการย่อยสลายของจุลินทรีย์จะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของน้ำมัน ซึ่งจะมีปริมาณและชนิดของสารไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกัน ปริมาณออกซิเจน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังมีการเติมสารที่ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายของจุลินทรีย์โดยการใส่ปุ๋ย ซึ่งอยู่ในรูปไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำมันกับน้ำ ทำให้น้ำมันกระจายตัวเป็นอนุภาคเล็ก ๆ เป็น

การเพิ่มพื้นที่ผิวของน้ำมันทำให้จุลินทรีย์มาเกาะที่พื้นผิวของน้ำมันได้มากขึ้นจึงย่อยสลายน้ำมันได้เร็วขึ้น (Kosaric, 2001; Ron and Rosenberg, 2002)

ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับปัญหาการปนเปื้อนของ ULO โดยเฉพาะที่ปนเปื้อนในดินสภาพของเหลวเปียกนั้นมีน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของ ULO ในดินสภาพของเหลวเปียกและศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO โดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่แยกได้จากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันจากทะเลสาบสงขลา โดยใช้ *n*-heptadecane เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ NH_4HCO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน แล้วตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทานอล 95% เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาและเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดดินที่ปนเปื้อน ULO ในสิ่งแวดล้อมต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. น้ำมันหล่อลื่น (Lubricating oil)

โดยทั่วไปน้ำมันหล่อลื่นมีหน้าที่หล่อลื่นชิ้นส่วนของเครื่องยนต์ และมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มช่วยไม่ให้เกิดการเสียดสีโดยตรง โดยเฉพาะถ้าเครื่องยนต์ยังเร่งยิ่งเกิดการเสียดสีและสึกหรอมากขึ้น การมีน้ำมันหล่อลื่นทำให้เครื่องยนต์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังมีผลต่อเนื่องช่วยให้ประหยัดเชื้อเพลิงอีกด้วย นอกจากนี้การที่น้ำมันหล่อลื่นสามารถไหลผ่านหมุนเวียนไปตามจุดต่าง ๆ ของเครื่องยนต์ยังเป็นการช่วยระบายความร้อน ช่วยทำความสะอาดชิ้นส่วนของเครื่องยนต์ และยังสามารถอุดช่องว่างระหว่างชิ้นส่วนต่าง ๆ ป้องกันการรั่วซึมของก๊าซไม่ให้ความดันรั่วไหล ทำให้เครื่องยนต์มีกำลังเต็มที่

การเสื่อมสภาพของน้ำมันหล่อลื่นมาจากสาเหตุของความสกปรกที่มารวมอยู่ในตัวน้ำมัน เช่น ฝุ่นละอองที่เล็ดลอดที่เข้าไปในเครื่องทางหม้อกรองอากาศ ท่อไอดี รวมทั้งฝ้าคิม น้ำมันหล่อลื่น เขม่าจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ ไอ้น้ำจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง กรดซึ่งเกิดจากการรวมตัวของก๊าซบางชนิดและน้ำ น้ำมันเชื้อเพลิงที่เผาไหม้ไม่หมด เศษโลหะที่เกิดจากการสึกหรอ อยางเหนียวที่เกิดจากการรวมตัวของน้ำมันกับออกซิเจนในอากาศที่อุณหภูมิสูง ๆ สิ่งต่าง ๆ เหล่านี้สะสมรวมกันในอ่างน้ำมันเครื่อง เมื่อการสะสมมากขึ้นก็ทำให้น้ำมันหล่อลื่นเสื่อมคุณภาพลงจนไม่สามารถหล่อลื่นได้ดีพอ อาจก่อให้เกิดปัญหาการสึกหรอและทำให้เครื่องยนต์เสียหายได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนถ่ายน้ำมันหล่อลื่นเพื่อเอาสิ่งสกปรกออกและเป็นการกำจัดสิ่งสกปรก

ออกจากเครื่องยนต์ไปในตัว เพื่อช่วยปกป้องรักษาเครื่องยนต์ และยืดอายุการทำงานของเครื่องยนต์ให้ยาวนานขึ้น (กรมธุรกิจพลังงาน, 2550)

Table 1. Components of car engine base oil.

Component	Ratio (%)
Saturated fraction	90.9
Normal paraffin	15.5
Cyclic paraffin	75.4
Aromatic fraction	9.1
Naphthalene	1.7
Fluorene	1.2
Benzene	1.1
Dibenzofuran	1.0
Dinaphthenebenzene	0.8
Dibenzanthracene	0.6
Naphthobenzothiophene	0.3
Perylene	0.2
Benzothiophene	0.2
Chrysene	0.1
Unknown	1.9

ที่มา : Koma และคณะ (2001)

น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (base oil) ส่วนใหญ่ได้มาจากน้ำมันปิโตรเลียม เรียกโดยทั่วไปว่า น้ำมันแร่ สามารถจำแนกประเภทได้ตามประเภทของไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ paraffins ทั้งแบบโซ่ตรง ประเภท aliphatic และแบบสาขา ประเภท aromatic เช่น naphthenes หรือ naphthanics ซึ่งมีโครงสร้างแบบวงแหวนเป็น cycloparaffins นอกจากนี้สถาบันปิโตรเลียมแห่งสหรัฐอเมริกา (American Petroleum Institute : API) ยังแบ่งกลุ่มน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานประเภทน้ำมันแร่ตามคุณสมบัติค่าดัชนีความหนืด ค่ากำมะถัน และปริมาณสารไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว (กรมธุรกิจพลังงาน, 2550) สารหล่อลื่นแบ่งตามสถานะแบ่งออกได้เป็นสี่ชนิด คือ ก๊าซ ของเหลว

สารกึ่งแข็ง (semi - solid) และของแข็ง สารหล่อลื่นที่เป็นของเหลวจะใช้กันมากที่สุด และรองลงมาคือ สารกึ่งแข็งได้แก่ จาระบี ซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานที่ได้มาจากน้ำมันปิโตรเลียมแสดงใน Table 1

การที่สารหล่อลื่นที่เป็นของเหลวนิยมใช้กันแพร่หลายมากนั้นเพราะสามารถแยกผิววัตถุทั้งสองได้อย่างสมบูรณ์และสามารถรับแรงที่กระทำได้มาก ของเหลวที่ใช้เป็นสารหล่อลื่นมีน้ำ สารละลายที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (aqueous solution), mineral oil และน้ำมันสังเคราะห์ (synthetic oil) ในบรรดาสารหล่อลื่นที่เป็นของเหลวนี้น้ำจะมีการใช้งานค่อนข้างจำกัด เช่น ใช้ในการหล่อลื่น แบริ่งไม้ หรือแบริ่งยางของกังหันวิดน้ำ หรือเครื่องสูบน้ำบางประเภท ส่วนสารละลายที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะใช้เฉพาะในการหล่อลื่นชิ้นงานของเครื่องกลึง เครื่องเจียรไนและเครื่องไสเป็นหลัก สำหรับสารหล่อลื่นที่เป็นของเหลวที่ใช้กันมากที่สุดคือ น้ำมันหล่อลื่นซึ่งจะมีอยู่ 2 ชนิดได้แก่ น้ำมันแร่และน้ำมันสังเคราะห์ (วิระศักดิ์ กรีวิชัย, 2550)

1.1 น้ำมันแร่

น้ำมันแร่เป็นน้ำมันหล่อลื่นที่ได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ น้ำมันหล่อลื่นได้มาจากส่วนที่หนักของน้ำมันดิบที่เหลือจากการกลั่นเอาส่วนที่เบา ได้แก่ ก๊าซ น้ำมันเบนซิน น้ำมันก๊าดและน้ำมันดีเซลออกไปโดยหอกลั่นลำดับส่วน กระบวนการผลิตน้ำมันหล่อลื่นจากน้ำมันดิบเริ่มต้นจากการนำเอาส่วนที่เหลือจากหอกลั่นลำดับส่วนเข้าไปกลั่นอีกครั้งหนึ่งในหอกลั่นสุญญากาศ (vacuum tower) เพื่อแยกส่วนที่เหลือจากหอกลั่นลำดับส่วนออกเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่มีจุดเดือด (boiling point) เหมือนกัน โดยความดันในหอกลั่นสุญญากาศจะมีค่าต่ำกว่าหนึ่งส่วนสิบของความดันบรรยากาศ ทั้งนี้เพื่อไม่ให้เกิดการแยกสลาย (cracking) ที่อุณหภูมิสูง คุณสมบัติสำคัญที่ถูกควบคุมโดยการกลั่นสุญญากาศก็คือความหนืด (viscosity) จุดวาบไฟ (flash point) และกากคาร์บอน (carbon residue) ซึ่งก็จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความหนืดต่าง ๆ กันออกมา หลังจากที้ออกจากหอกลั่นสุญญากาศแล้วก็จะนำไปผ่านกระบวนการต่าง ๆ เพื่อแยกส่วนที่ไม่ต้องการออกให้เหลือผลิตภัณฑ์หรือน้ำมันหล่อลื่นที่มีคุณสมบัติตามต้องการ ตัวอย่างของกระบวนการเหล่านี้ได้แก่ กระบวนการแยกยางมะตอยออกโดยการใช้โพรเพนเป็นสารละลาย (propane deasphalting) กระบวนการแยกเอาสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compounds) ออกจากพวกที่ไม่ใช่อะโรมาติก (non-aromatic compound) ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณสมบัติของน้ำมันหล่อลื่นได้แก่ การเพิ่มเสถียรภาพในด้านความร้อนและการรวมตัวกับออกซิเจน และเพิ่มดัชนีความหนืด (viscosity index) กระบวนการต่อไปก็คือ กระบวนการแยกเอาไขออก (dewaxing) เพื่อลดจุดไหลเทให้ต่ำลง ให้สามารถใช้งานได้ที่อุณหภูมิต่ำ ส่วนกระบวนการสุดท้ายก็คือ การเติมไฮโดรเจน

(hydro-finishing) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลของสารที่ทำให้เกิดสีและสารที่ไม่เสถียรทำให้น้ำมันหล่อลื่นมีสีจางลง และช่วยเพิ่มคุณสมบัติบางประการ

1.2 น้ำมันสังเคราะห์

น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานประเภทน้ำมันแร่ที่ได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบนั้น แม้ว่าจะผ่านกระบวนการมากมายที่ใช้กำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออกไป แต่น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานที่ได้ออกมานั้นยังคงเป็นของผสมของสารประกอบหลายตัว ซึ่งไม่มีทางที่จะเลือกเอาเฉพาะสารที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดได้ หรือถ้ามีก็จะได้ผลผลิตต่ำทำให้การผลิตไม่คุ้มค่า ดังนั้นน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานประเภทน้ำมันแร่จึงมีคุณสมบัติเฉลี่ยของของผสมซึ่งประกอบด้วยสารประกอบที่เหมาะสมมากที่สุด เป็นผลให้น้ำมันแร่มีข้อจำกัดในการนำไปใช้งาน

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีการพัฒนาน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานประเภทน้ำมันสังเคราะห์ขึ้นมา น้ำมันสังเคราะห์เป็นน้ำมันพื้นฐานที่ได้จากกระบวนการทางเคมี ซึ่งเป็นการรวมตัวของสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำให้ได้น้ำมันที่มีความหนืดเพียงพอที่จะใช้เป็นสารหล่อลื่น โดยสารประกอบเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตน้ำมันสังเคราะห์มักได้มาจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และเนื่องจากน้ำมันสังเคราะห์เป็นน้ำมันที่ทำขึ้นจากกระบวนการเคมีจึงสามารถควบคุมให้มีโครงสร้างโมเลกุลตามที่ต้องการและมีคุณสมบัติตามที่คาดหวังไว้ได้ แม้ว่าน้ำมันสังเคราะห์จะมีคุณสมบัติโดยทั่วไปดีกว่าน้ำมันแร่ก็ตาม แต่สำหรับการนำไปใช้งานบางประเภท น้ำมันสังเคราะห์ก็อาจจะยังไม่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมทุกด้าน จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันสังเคราะห์ โดยการใส่สารเพิ่มคุณภาพเข้าไปเช่นเดียวกับการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันแร่

สารเพิ่มคุณภาพที่ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานโดยทั่วไปเป็นสารประกอบทางเคมีซึ่งที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีอยู่หลายตัว สารเพิ่มคุณภาพแต่ละตัวจะมีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานเฉพาะอย่าง โดยแบ่งตามผลที่มีต่อน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะเป็นสารเพิ่มคุณภาพที่ให้คุณสมบัติใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน กลุ่มที่สองเป็นสารเพิ่มคุณภาพที่ปรับปรุงคุณสมบัติที่มีอยู่แล้วให้ดีขึ้น และพวกสุดท้ายเป็นสารเพิ่มคุณภาพที่ทำหน้าที่ในการลดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ต้องการ

การที่จะเติมสารเพิ่มคุณภาพตัวใดและจำนวนเท่าใดลงไปนน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานนั้นจะขึ้นอยู่กับลักษณะของการนำไปใช้งาน โดยจะต้องคำนึงถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นด้วย เนื่องจากสารเพิ่มคุณภาพบางตัวแม้ว่าจะทำให้คุณสมบัติประการใดประการหนึ่งดีขึ้น แต่ก็อาจจะทำให้คุณสมบัติประการอื่นเสื่อมลงไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใส่เข้าไปมากเกินไปหรือถ้าสารเพิ่ม

คุณภาพนั้นไปทำปฏิกิริยากับสารเพิ่มคุณภาพแต่ละตัวจึงต้องมีสัดส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้ น้ำมันหล่อลื่นทำงานได้อย่างดีที่สุด และจะต้องมีการทดสอบให้แน่ใจว่าจะไม่มีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น ซึ่งในกรณีทั่ว ๆ ไปจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องเติมสารเพิ่มคุณภาพเข้าไปอีก

น้ำมันหล่อลื่นมีองค์ประกอบเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมเลกุลตั้งแต่ C_{12} - C_{25} มีประมาณ 16.58% และ $>C_{25}$ มีประมาณ 83.42% (Kim *et al.*, 2003a) น้ำมันหล่อลื่นมีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีขั้ว (polar fraction) มีประมาณ 4-8% คุณสมบัติของการมีขั้วนี้เกิดจากสารประกอบ aromatic hydrocarbon ซึ่งมีธาตุชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ (Rafael, 1988) คุณสมบัติของ ULO แสดงใน Table 2

Table 2. Properties of ULO.

Characteristic	Values
<i>Elemental (wt.%)</i>	
C	81.50
H	11.95
N	0.12
S	0.19
Ash	0.63
Dynamic viscosity ($m^2 s^{-1}$)	0.50
Density (20°C, $g cm^{-3}$)	0.8797
Gravity (15.6/4)	0.8833
Paraffin (wt.%)	58
Naphtha (wt.%)	42

ที่มา : Kim และคณะ (2003b)

การปรับปรุงคุณภาพน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วให้มีคุณสมบัติที่สามารถนำไปใช้ใหม่ได้โดยผ่านกรรมวิธี 2 วิธี คือ (สิริพร แก่นสียา, 2546)

กรรมวิธีที่หนึ่ง น้ำมันใช้แล้วผ่านการบำบัดทางกายภาพและทางเคมี โดยใช้กรดซัลฟิวริกและ fuller earth ในปริมาณ 10% โดยปริมาตรและ 10% โดยน้ำหนักตามลำดับ เป็นการ

ฟอกสีและกำจัดองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ไม่เสถียร ตลอดจนสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่ทำให้น้ำมันเสื่อมคุณภาพ

กรรมวิธีที่สอง เป็นวิธีการบำบัดด้วยไฮโดรเจน ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ ตัวเร่งปฏิกิริยา raney-nickel, nickeloxide molybdenumtrioxide บนตัวรองรับอลูมินา และ ตัวเร่งปฏิกิริยา nickeloxide tungstentrioxide บนตัวรองรับอลูมินา ตัวเร่งปฏิกิริยา raney-nickel มีราคาถูกสามารถใช้บำบัดน้ำมัน ได้ดีและสามารถแยกออกจากน้ำมันได้ง่าย ความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการบำบัด คือ 4% น้ำมันที่ได้จากกรรมวิธีดังกล่าวมีคุณสมบัติที่ดี โดยมีปริมาณซัลเฟอร์ลดลงและดัชนีความหนืดของน้ำมันมีค่าเพิ่มขึ้น

2. การปนเปื้อนของ LO

การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมีเพิ่มขึ้น ทำให้การปนเปื้อนของน้ำมันดีเซลและ LO ในดินกลายเป็นปัญหาใหญ่ในสิ่งแวดล้อม (Mandri and Lin, 2007) การใช้น้ำมันหล่อลื่นทั้งที่ใช้ในยานพาหนะ อุตสาหกรรมและกิจกรรมอื่น ๆ ทำให้เกิดน้ำมันที่ใช้แล้วเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก โดยมีปริมาณ 1.7-8.8 ล้านตันแกลลอนต่อปี (Nikolopoulou *et al.*, 2007)

ลักษณะการแพร่กระจายสู่บริเวณหรือพื้นที่ข้างเคียงของ LO นั้นเกิดได้อย่างรวดเร็ว เพราะน้ำมันมีลักษณะเป็นของเหลว ซึ่งการแพร่กระจายนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัย (ชรรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์, 2533)

2.1 ประเภทของการรั่วไหล (type of spill) และอัตราการไหล (flow rate)

ประเภทของการรั่วไหลและอัตราการไหลของน้ำมันจะเป็นตัวกำหนดการแพร่กระจายของน้ำมันในสิ่งแวดล้อม โดยการรั่วไหลอย่างต่อเนื่องจะทำให้คราบน้ำมันมีโอกาสแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้าง บางส่วนจะซึมลงตามช่องว่างของดินและบางส่วนจะซึมออกตามด้านข้างของชั้นดินตามช่องว่างหรือรอยแตกแยกของเนื้อดิน

การปนเปื้อนของ ULO หรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอื่น ๆ เมื่อหกหรือรั่วไหลลงบนพื้นดิน บางส่วนจะซึมลงตามช่องว่างของดิน (permeable soil) ลงตามแนวตั้งตามแรงโน้มถ่วงของโลก และบางส่วนจะซึมออกด้านข้างของชั้นดินตามช่องว่างหรือรอยแตก ในกระบวนการไหลซึมของน้ำมันลงสู่ดินจะสามารถซึมผ่านได้ในช่วงแรกเท่านั้นและเมื่อระยะเวลาผ่านไปช่วงระยะหนึ่งดินจะไม่ยอมให้น้ำมันซึมผ่าน เนื่องจากดินบริเวณนั้นเกิดการอิ่มตัวด้วยน้ำมันขึ้น ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของดิน เช่น เนื้อดิน (soil texture) ความหนาแน่น

ของดิน (soil density) ความพรุนของดิน (soil porosity) เป็นต้น รวมทั้งชนิดและปริมาณของน้ำมันที่ซึมลงดิน โดยดินที่มีการยอมให้ผ่านของดิน (soil permeability) สูง จะมีรูปแบบของน้ำมันที่ซึมลงในดินคล้ายทรงกระบอก ส่วนดินที่มีช่องว่างในดินน้อยจะมีรูปแบบคล้ายทรงกรวย (ชรัตัน รุ่งเรืองศิลป์, 2533)

อัตราการแทรกซึม (rate of penetration) ของน้ำมันลงในดินจะสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของน้ำมัน และคุณสมบัติทางกายภาพของดินนั้น ๆ เช่น ชนิดของดิน ซึ่งดินแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามขนาดของอนุภาคต่าง ๆ ที่รวมตัวกันเป็นเม็ดดิน (กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม) ดังนี้

2.1.1 ดินเหนียว (< 5 ไมโครเมตร) เป็นดินที่มีขนาดของอนุภาคเล็กที่สุด มีดินเหนียวประกอบอยู่ตั้งแต่ 40% ขึ้นไป โดยทั่วไปเป็นดินที่มีลักษณะเม็ดเล็ก ละเอียด และมีช่องว่างในเนื้อดินน้อย ลื่นมืออุ้มน้ำได้ดีทำให้การระบายน้ำและอากาศได้ไม่ดี

2.1.3 ดินร่วน (5-75 ไมโครเมตร) มีเนื้อดินค่อนข้างละเอียด ดินที่มีส่วนประกอบดินทรายโคลนตม และดินเหนียวโดยปริมาณดินเหนียวและดินทรายไม่มากนัก เม็ดดินขนาดพอเหมาะจะให้น้ำและอากาศจึงไหลผ่านดินร่วนได้ดีกว่าดินเหนียว มีการระบายน้ำได้ดีปานกลาง เป็นเนื้อดินที่มีความอุดมสมบูรณ์

2.1.2 ดินทราย (>75 ไมโครเมตร) เป็นดินที่มีอนุภาคของทรายมาก มีทรายประกอบอยู่ตั้งแต่ 70% ขึ้นไปโดยน้ำหนัก ดินมีลักษณะเป็นเม็ดใหญ่ และมีอากาศในเนื้อดินมาก น้ำซึมผ่านได้ง่ายจึงมีความชื้นในดินน้อย ทำให้มีการระบายน้ำและอากาศดี อุ้มน้ำได้น้อย

ดังนั้นดินที่มีกรวดหรืออนุภาคทรายหยาบ (gravel or coarse sand) สูง น้ำมันสามารถแทรกซึมผ่านในอัตราที่สูงกว่าดินที่มีอนุภาคดินเหนียว (clay) สูง

LO ที่แพร่กระจายสู่บริเวณข้างเคียงนั้นจะเกิดการระเหยขึ้น ซึ่งน้ำมันจะเริ่มตันระเหยทันทีที่รั่วไหลออกจากภาชนะที่เก็บ โดยน้ำมันชนิด light oil จะมีอัตราการระเหยได้เร็วกว่าน้ำมันชนิด heavy oil ซึ่งอัตราการระเหยของน้ำมันจะเร็วในช่วงแรกเนื่องจากสารระเหย (volatile) จะระเหยออกจากมวลน้ำมัน จนเหลือสารที่ไม่ระเหย (non-volatile) ซึ่งน้ำมันส่วนนี้ เรียกว่า Mousse เป็นน้ำมันที่มีความถ่วงจำเพาะสูง และความหนืดสูง

2.2 ประเภทของน้ำมัน (type of oil)

คุณสมบัติเฉพาะตัวของน้ำมันแต่ละชนิดทำให้ขนาดของพื้นที่ที่แพร่กระจายไม่เท่ากัน แม้ว่าจะมีการรั่วไหลในปริมาณที่เท่ากัน เช่น น้ำมันดิบ และผลิตภัณฑ์น้ำมัน (Petroleum products) เช่น น้ำมันเบนซิน ดีเซล น้ำมันเตา เป็นต้น เมื่อรั่วไหลในปริมาณที่เท่ากัน ขนาดพื้นที่ที่

แพร่กระจายจะไม่เท่ากัน ทั้งนี้เพราะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะด้านความหนืด (Kinematic viscosity) กล่าวคือ น้ำมันเตา (Fuel oil) ที่มีความหนืดสูงกว่าน้ำมันชนิดอื่น ๆ จะมีแรงต้านการไหลสูงกว่าน้ำมันชนิดที่มีความหนืดต่ำจึงทำให้แพร่กระจายในบริเวณแคบ ๆ แต่จะมีอัตราการแทรกซึมของน้ำมันลงในชั้นดินจะสูง

2.3 ลักษณะของสภาพพื้นที่ (type of location)

ลักษณะของสภาพพื้นที่จะมีอิทธิพลสำคัญต่อการแพร่กระจายของน้ำมันเป็นอย่างมาก กล่าวคือพื้นที่ที่มีความลาดชันจะมีผลทำให้น้ำมันแพร่กระจายได้เร็วกว่าในสภาพพื้นที่ที่เป็นที่ราบ

2.4 ระยะเวลาที่เกิด (time of occurrence)

การแพร่กระจายของน้ำมันครอบคลุมพื้นที่กว้างไกลมากน้อยเพียงใดนั้น ระยะเวลาที่เกิดการรั่วไหลจะเป็นตัวชี้วัดอย่างหนึ่งที่จะช่วยให้คาดการณ์เป็นไปอย่างถูกต้อง เช่น พื้นที่แพร่กระจายของน้ำมันในชั้นดินใน 24 ชั่วโมงแรกจะมีขนาดพื้นที่ระหว่าง 40-70% ของพื้นที่แพร่กระจายในชั้นสุดท้าย และใน 7 วัน จะมีขนาดพื้นที่ระหว่าง 60-90% ของพื้นที่แพร่กระจายในชั้นสุดท้าย

3. การกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

การเกิดน้ำมันรั่วไหลลงสู่สภาพแวดล้อมทั้งทางบกและทางน้ำ ลักษณะและความรุนแรงของผลกระทบย่อมจะแตกต่างกัน ดังนั้นในการควบคุมหรือกำจัดน้ำมันที่รั่วไหลสู่สภาพแวดล้อม จำเป็นต้องทราบถึงคุณสมบัติของน้ำมันแต่ละชนิดเสียก่อน (ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์, 2533) การกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้อุณหภูมิและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในดินได้ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในธรรมชาติ (Fry *et al.*, 1993)

การกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้หลายวิธีตามความเหมาะสมของแต่ละพื้นที่ แต่ปกติแล้วสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลักคือ

3.1 วิธีการทางกายภาพ (physical method)

เป็นวิธีการควบคุม กำจัด และเก็บกวาดคราบน้ำมันด้วยวิธีการหรืออุปกรณ์เครื่องมือ อุปกรณ์แต่ละชนิดมีหลักการและประสิทธิภาพในการทำงานแตกต่างกัน และในบางพื้นที่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือมากกว่า 1 ชนิด ทำงานร่วมกันในลักษณะผสมผสานกัน วิธีการ

กายภาพ เช่น soil vapor extraction เป็นวิธีการบำบัดโดยการดูดสารไฮโดรคาร์บอนที่ระเหยได้ออกจากดิน ซึ่งการบำบัดจะได้ผลดีในดินที่มีความพรุนสูง ดังนั้นดินที่มีความพรุนต่ำหรือแน่นทึบสามารถเพิ่มความพรุนและรอยแตกร้าวด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น การใช้น้ำหรืออากาศความดันสูงอัดลงในชั้นดินเพื่อทำให้เกิดรอยร้าว เป็นต้น (Hoier *et al.*, 2009)

3.2 วิธีการทางเคมี (chemical method)

สารเคมีกำจัดคราบน้ำมัน (oil dispersant) มีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และตัวทำละลาย บางชนิดยังมีส่วนผสมของสารที่สามารถควบคุมการแผ่กระจายของคราบน้ำมันที่แตกตัวในน้ำ โดยสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันจะทำให้ความแตกต่างของแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันลดลงจนแรงตึงผิวของน้ำมันใกล้เคียงกับน้ำ การนำสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันไปใช้โดยการฉีดพ่นลงบนคราบน้ำมันทำให้น้ำมันเกิดการแตกตัวเป็นหยดเล็ก ๆ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายและนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีและมีตัวทำละลายเป็นองค์ประกอบซึ่งย่อยสลายยากและเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (Healy *et al.*, 1996) วิธีการเคมีที่ใช้ในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่

3.2.1 การใช้ตัวทำละลายเคมี เป็นวิธีการดึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกมาจากดินหรือน้ำที่ปนเปื้อน เช่น hydroxypropyl[β]cyclodextrin (HPCD) (Oleszczuk, 2009), *n*-butanol (Kelsey *et al.*, 1997) และ การใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (surfactant extraction) (Volkering *et al.*, 1997) เช่น Triton X-100, Brij 30 และ Tween 80 (Kim *et al.*, 2001) เป็นต้น

3.2.2 การใช้ตัวดูดซับที่เป็นของแข็ง เป็นวิธีการดูดซับกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินหรือน้ำที่ปนเปื้อน เช่น วิธี solid phase extraction (Cuyper *et al.*, 2002) ชนิดของตัวดูดซับ เช่น silica sorbents, polymeric, carbon-based และ Tenax TA (Cornelissen *et al.*, 1998) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการใช้โอโซนในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Javorská *et al.*, 2009) โดยโอโซนจัดเป็นสารออกซิแดนท์ (oxidant) ที่แรง เมื่อละลายอยู่ในน้ำจะเกิดการแพร่เข้าไปยังผิวและในรูพรุนของดินทำให้เกิดการออกซิไดส์ของ PAHs ได้สารตัวกลาง หรือผลิตภัณฑ์ ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันของกรดคาร์บอกซิลิก phenyl, aldehyde และ ketone ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และผลิตภัณฑ์ หรือสารตัวกลางที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาต่อเนืองกับ โอโซนเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้หลายชนิดซึ่งสารผลิตภัณฑ์เหล่านี้สามารถย่อยสลายต่อโดยทางชีวภาพ (Hong *et al.*, 2008)

3.3 วิธีการทางชีวภาพ (biological method)

วิธีนี้เป็นการใช้สิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่ายในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Lindstrom and Braddock, 2002; Gorda *et al.*, 2007) โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในกระบวนการเมแทบอลิซึมซึ่งต้องใช้เวลาในการย่อยสลายค่อนข้างนาน ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายให้เร็วไปอย่างรวดเร็วจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิ ออกซิเจน ธาตุอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสให้เหมาะสม โดยจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะช่วยให้การย่อยสลายสามารถดำเนินไปได้อย่างรวดเร็ว (Boopathy, 2000)

การย่อยสลายโดยชีววิธี (bioremediation) เป็นวิธีการใช้สิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ในการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นอันตรายในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินที่ปนเปื้อนด้วยสารประกอบอินทรีย์ รวมถึงสารประกอบไฮโดรคาร์บอนให้มีความเป็นพิษน้อยลง หรืออันตรายน้อยลง เช่น ทำให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ (Wilson and Jones, 1993)

3.3.1 วิธีการบำบัดสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพ

วิธีการบำบัดสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้นประกอบด้วย 2 วิธีการหลัก (Suthersan, 1999) คือ

3.3.1.1 Biostimulation เป็นการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินนั้นมีการเจริญ และมีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษได้ดีขึ้น ได้แก่ การเติมสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส การให้ออกซิเจนลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อน รวมถึงการเติมสารลดแรงตึงผิว จะช่วยเพิ่มการละลายสารไฮโดรคาร์บอนทำให้แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Haigh, 1996) ในบางกรณีการเติมเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือมูลสัตว์ จะเป็นการเพิ่มปริมาณสารอาหารและปริมาณออกซิเจน ทำให้เกิดการถ่ายเทอากาศ ปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตบริเวณนั้น อีกทั้งยังช่วยลดความสามารถของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการเข้าจับกับอนุภาคดิน ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเคลื่อนที่แทรกเข้าสู่อนุภาคดินได้ช้าลง จุลินทรีย์จึงนำไปใช้ประโยชน์ได้รวดเร็ว (Kästner and Mshro, 1996) และการปนเปื้อนของสารเคมีในดินเป็นระยะเวลาานานจะทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารปนเปื้อนนั้น ๆ ได้หากมีระบบการจัดการที่ดี (Vidali, 2001)

3.3.1.2 Bioaugmentation เป็นวิธีที่ช่วยส่งเสริม หรือเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนโครงสร้าง (biotransformation) หรือย่อยสลายสารพิษ (biodegradation) ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารนั้น ๆ ซึ่งบริเวณดังกล่าวอาจไม่พบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ หรือจุลินทรีย์ที่ได้รับ

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม (genetically engineered microorganism, GEM) ในการย่อยสลายสารในบริเวณพื้นที่บำบัดจึงจำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างถิ่น (exogenous microorganisms) เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย (Watanabe, 2001) โดยวิธีการนี้มีปัจจัยหรือข้อจำกัดที่ควรคำนึงถึงสำหรับการนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปใช้ในสิ่งแวดล้อมจริง ได้แก่ จุลินทรีย์ที่จะนำไปใช้นั้นอาจไม่ใช่จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในบริเวณที่ต้องการกำจัดสารพิษ ทำให้เกิดภาวะการแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ต่างถิ่นกับจุลินทรีย์ที่อยู่ประจำถิ่น (indigenous microorganisms) ดังนั้นจุลินทรีย์ต่างถิ่นจะต้องสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ (Vidali, 2001)

Straube และคณะ (2003) ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* strain 64 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนร่วมกับการเติมสารอาหาร (biostimulation/bioaugmentation) เพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน พบว่า สารประกอบไฮโดรคาร์บอนลดลง 87% และ benzo[a]pyrene ลดลง 67% และเมื่อขยายขนาดการทดลอง พบว่า สารประกอบไฮโดรคาร์บอนลดลง 86% และ benzo[a]pyrene ลดลง 87% ในเวลา 16 เดือน

3.3.2 การบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

3.3.2.1 In-situ treatment เป็นการบำบัดโดยการขุดบ่อ หลุมผ่านตลอดแนวที่ปนเปื้อนแล้วฉีดพ่นสารละลายที่มีสารอาหารพร้อมจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนให้ซึมผ่านตามชั้นดิน แต่มีข้อจำกัด คือ ทำการควบคุมอุณหภูมิได้ยาก และมีข้อจำกัดเรื่องชนิดของดิน (Boopathy, 2000)

3.3.2.2 Ex-situ treatment เป็นการบำบัดดินที่ปนเปื้อนด้วยการนำดินที่ปนเปื้อนออกมาบำบัดนอกแหล่งที่ปนเปื้อน ด้วยการเติมสารอาหาร หรือจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ (Boopathy, 2000)

3.3.2.3 Bioreactor เป็นการบำบัดดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนด้วยการนำดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนออกมาบำบัดในถังปฏิกรณ์ (bioreactor) โดยวิธีนี้สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ผลดีกว่าการย่อยสลายในดินแห้ง เนื่องจาก slurry phase จะส่งเสริมการขนถ่ายมวลโมเลกุล จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารและมีการกระจายตัวของออกซิเจนได้ดีกว่าในดินแห้ง ทำให้อัตราการย่อยสลายในดินสภาพของเหลวเปียกเร็วและใช้ระยะเวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ (Shailaja et al., 2007; Prasanna et al., 2008) อีกทั้งสามารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย เช่น กำหนดให้เป็นสภาวะที่มีอากาศ (Pour et al., 2005; Prasanna et al., 2008) หรือสภาวะที่ไม่มีอากาศในการย่อยสลาย (Mohan et al., 2009; Morris et al., 2009) และสามารถผสมดินที่มีการเติม

สารอาหารที่จำเป็นและสารลดแรงตึงผิวให้เข้ากับจุลินทรีย์ที่ใช้ย่อยสลายได้ดีในถังปฏิกรณ์ แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงกว่าสองวิธีแรกและต้องควบคุมอุณหภูมิ สำหรับถังปฏิกรณ์ที่ใช้ เช่น trickling filter reactor, upflow fixed-film reactor และ fluidized bed reactor (Langwaldt and Puhakka, 2000) แต่ที่นิยมใช้ คือ แบบ slurry-phase drum หรือ แบบ airlift (Pour *et al.*, 2005)

Kuyukinaa และคณะ (2003) ศึกษาการกำจัดน้ำมันดิบในดิน พบว่า ในดินมีน้ำมันปนเปื้อนอยู่ 200 กรัมต่อกิโลกรัมของ total recoverable petroleum hydrocarbons (TRPH) มีส่วนประกอบของ aliphatics 64%, aromatics 25%, heterocyclics 8% และ tars/asphaltenes 3% และทำการบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนด้วยวิธี *ex-situ* bioremediation โดยใช้ bioslurry reactor แบบเติมอากาศ และเติมเชื้อ *Rhodococcus* พบว่า สามารถบำบัดดินที่ปนเปื้อนได้ 88% หลังจาก 2 เดือน ที่ทำการทดลอง อัตราการลดลงของน้ำมัน คือ 300-600 ppm ต่อวัน และปริมาณของน้ำมันที่ปนเปื้อนในดินลดลงเหลือ 1.0-1.5 กรัมต่อกิโลกรัมของ TRPH หลังจาก 5-7 สัปดาห์ของการทดลอง

Shailaja และคณะ (2007) ศึกษาความแตกต่างของความเข้มข้นของ di-*n*-butyl phthalate ที่ปนเปื้อนในดินต่อความสามารถในการย่อยสลายโดยใช้ bioslurry reactor แบบเติมอากาศและเติมเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* อัตราส่วนระหว่างดินต่อน้ำ 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการย่อยสลายสาร di-*n*-butyl phthalate พบว่า ในชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสาร di-*n*-butyl phthalate 1 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน เติมเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และไม่มีการฆ่าเชื้อในดินให้อัตราการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 99.31% หลังจาก 72 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง

Katamai (2008) ศึกษาการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปือกโดยเติมดินที่ปนเปื้อน ULO ในอัตราส่วนระหว่างดินต่อน้ำ 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วเติม ULO เป็นแหล่งคาร์บอน 12.5 กรัม ไม่ฆ่าเชื้อและส่งเสริมการย่อยสลายด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ *Issatchenkia orientalis* SR4 พบว่า สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพช่วยส่งเสริมการย่อยสลาย ULO โดยเชื้อประจำถิ่น ซึ่งให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายเท่ากับ 66.94% ใน 30 วันที่ทำการทดลอง

Biswal และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันในกากตะกอนน้ำมันซึ่งประกอบด้วยน้ำ LO และกากของเสียอื่น ๆ ที่ประกอบด้วยโลหะหนัก โดยเติมดินตะกอนน้ำมัน 15% ในอาหาร mineral medium 100 มิลลิลิตร แล้วเติมกลุ่มเชื้อ BS และ MS ที่คัดแยกได้จากตะกอนน้ำมัน 2 แหล่ง เมื่อทำการทดสอบยืนยันเชื้อ พบว่า กลุ่มเชื้อ BS ประกอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus circulans* และ *Ochrobactrum intermedium* ส่วนกลุ่มเชื้อ MS มีเพียงเชื้อสายพันธุ์เดียว คือ

Sphingomonas sp. พบว่า ทั้งสองกลุ่มเชื้อให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายใกล้เคียงกันเท่ากับ 25-27% และ 40-45% หลังจาก 7 และ 15 วันทำการทดลองตามลำดับ

Mohan และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลายสาร PAHs ชนิด chrysene ที่ปนเปื้อนในดิน โดยการส่งเสริมการย่อยสลายโดยชีววิธีในดินสภาพของเหลวเปือกที่มีอัตราส่วนของดินต่อน้ำเท่ากับ 3:25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีการเติม chrysene 1 กรัมต่อกิโลกรัมดิน พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อที่ไม่ชอบอากาศที่คัดแยกจากของเสียและไม่มาเชื้อ ซึ่งทดลองในสภาพที่มีอากาศสามารถลดปริมาณของ chrysene ได้เท่ากับ 0.896 กรัมต่อกิโลกรัมดิน ภายใน 9 วันทำการทดลอง

4. การย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

การย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ นั้นพบในจุลินทรีย์ทุกกลุ่ม จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิด ในขณะที่จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการปรับตัวและการพัฒนาระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย (สมศักดิ์ วังใน, 2528) สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มักจะพบอยู่ในธรรมชาติจะเกิดการเปลี่ยนแปลง (transformation) ได้โดยกระบวนการต่าง ๆ เช่น การดูดซับกับดินหรือตะกอน การสลายตัวโดยแสง การระเหย การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิต เป็นต้น (Li *et al.*, 2008a; Perfumo *et al.*, 2007) กระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นบางกระบวนการเหล่านี้อาจทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนหายไปจากสิ่งแวดล้อมได้ส่วนหนึ่งโดยเฉพาะในกลุ่มของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แต่ในส่วนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ส่วนใหญ่แล้วมักจะถูกดูดซับไว้กับอนุภาคของดินหรือตะกอน ทำให้เกิดการสะสมและเพิ่มความคงทนในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (Mohan *et al.*, 2009) อีกกระบวนการหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจศึกษาเป็นอย่างมากก็คือการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ (biodegradation) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน ในขณะที่บางชนิดมีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทำให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบชนิดต่าง ๆ ที่มีความเป็นพิษน้อยลง (วิภา ต้นแพง, 2546)

Table 3. Microorganisms that have been reported to be able to use PAHs as their carbon and energy source.

PAHs	Microorganism	References
Anthracene	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cheung <i>et al.</i> , (2007)
Phenanthrene	<i>Alteromonas</i> sp., <i>Alternaria tenuis</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas cepacea</i> , <i>Ralstonia</i> <i>pickettii</i> , <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Trichoderma viride</i>	Avramova <i>et al.</i> , 2008; Gómez <i>et al.</i> , (2003); Herwijnen <i>et al.</i> , (2003); Hwang <i>et al.</i> , (2002); Syakti <i>et al.</i> , (2004); Tao <i>et</i> <i>al.</i> , (2007); Zaidi and Imam, (1999); Providenti <i>et al.</i> , (1999)
Fluorene	<i>Absidia cylindrospora</i>	Garon <i>et al.</i> , (2004)
Fluoranthene	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Bjerkandera adusta</i>	Herwijnen <i>et al.</i> , (2003); Jones and Hunter, (1997); Valentín <i>et</i> <i>al.</i> , (2007)
Pyrene	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> PYR-1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Nereis</i> <i>diversicolor</i>	Giessing and Johnsen, (2005); Hwang <i>et al.</i> , (2002); Jones and Hunter, (1997); Ramirez <i>et</i> <i>al.</i> , 2001; Valentín <i>et al.</i> , (2007)
Naphthalene	<i>Rhodococcus opacus</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>	Collina <i>et al.</i> , (2005); Uz <i>et al.</i> , (2000)
Chrysene	<i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Polyporus</i> sp. S133	Valentín <i>et al.</i> , (2007); Hadibarata <i>et al.</i> , (2009)
Benzo[a]pyrene*	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Zoogloea</i> sp.	Zang <i>et al.</i> , (2007)
Dibenzothiophene	<i>Bjerkandera adusta</i>	Valentín <i>et al.</i> , (2007)

หมายเหตุ * แบคทีเรียไม่สามารถใช้ PAH ชนิดนั้น ๆ เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานเพียงแหล่งเดียวได้ การย่อยสลายเกิดขึ้นโดยกระบวนการ co-metabolism

4.1 กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนน้ำหนักโมเลกุลสูง PAHs

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs พบในจุลินทรีย์ทุกกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) และสาหร่ายเซลล์เดียว ดังแสดงใน Table 3

4.2 กลไกการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติเกิดขึ้นได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Boopathy, 2000) ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยนสารโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงและได้พลังงานออกมาสำหรับนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ (Morgan and Watkinson, 1992; Fritsche และ Hofrichter, 2000) สารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สารประกอบ aliphatic hydrocarbon และสารประกอบ aromatic hydrocarbon ซึ่งมีวิธีการย่อยสลายดังนี้

4.2.1 การย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon

การย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon จุลินทรีย์นั้น aliphatic hydrocarbon บางชนิดที่ปลายไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่จะถูกย่อยโดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันลงไปเป็นกรดไขมัน ซึ่งจะถูกลดสลายต่อโดยกลไกการเกิด β -oxidation (Atlas, 1991) ในกรณีของการย่อยสลาย cyclohexane เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน โดยมีเอนไซม์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา alicyclic alcohol จะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันและออกซิเดชันได้เป็นสารประกอบ dicarboxylic acid ซึ่งเข้าสู่กลไกการเกิด β -oxidation (Juhász, 1997) ปฏิกิริยา β -oxidation ในการตัดหมู่คาร์บอนอะตอมโดยใช้เอนไซม์ออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์เริ่มต้นในการเปลี่ยนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนให้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสจะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็น aldehyde และกรดไขมัน ตามลำดับ ซึ่งสารตัวกลางที่ได้ก่อนเข้าสู่กระบวนการ Tricarboxylic acid cycle คือ acetyl-CoA และจะถูกใช้เป็น building blocks สำหรับสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ (Figure 1)

สมศักดิ์ วังโน (2528) พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ได้ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีสายสั้นหรือยาวก็ได้ เช่น *Mycobacterium* สามารถใช้ ethane (C_2H_6) จนถึง paraffin จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ ethane เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้มีหลายกลุ่มด้วยกัน เช่น *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* และ *Flavobacterium* แบคทีเรียที่มีรูปร่างทรงกลมหลายชนิดรวมทั้ง

เราก็สามารถใช้ ethane ได้ อย่างไรก็ตาม พบว่า แบคทีเรียกลุ่ม Mycobacteria มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ethane ได้ดีที่สุด สำหรับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่านี้ พบว่า จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ดี คือ พวก acid-fast, Mycobacteria, Nocardia, Pseudomonas, Streptomyces, Desulfovibrio และ Corynebacterium และพวกแบคทีเรียที่มีรูปร่างทรงกลมและเชื้อราบางชนิด

วิภา ตันแพง (2546) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน โดยมีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงแหล่งเดียวโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. ALIP S34 โดยใช้เครื่อง GC ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. ALIP S34 สามารถย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบได้ 44.6% ในระยะเวลา 3 วันที่ทำการทดลอง และในวันที่ 5-7 ของการทดลอง พบว่า มีปริมาณสารประกอบ aliphatic hydrocarbon น้อยมากจนตรวจไม่พบปริมาณสาร

Zinjarde และ Pant (2002) ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์จากตัวอย่างโคลนและน้ำจากทะเลรอบ ๆ ท่าเรือ Mumbai จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ได้ 17 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์ให้ผลการย่อยสลายน้ำมันมากกว่า 10% ยีสต์ที่พบอยู่ในจีนัส *Candida* มีความสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบ เมื่อทดสอบทางด้านชีวเคมีสามารถจำแนกได้คือ *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *Y. lipolytica*, *C. tropicalis* และ *C. intermedia* สายพันธุ์ *Y. lipolytica* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบได้ดีที่สุดโดยสามารถย่อยได้สูงถึง 78% และไม่มีสายพันธุ์ใดสามารถย่อยสลายสารประกอบ aromatic hydrocarbon และสารประกอบ asphaltenes ได้ ทุกสายพันธุ์ต้องการอากาศ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในการย่อยสลาย และ 4 ใน 6 สายพันธุ์เป็นเชื้อก่อโรคในคน

Gouda และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันก๊าดในอาหารเหลวโดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันก๊าด 46 สายพันธุ์ และจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล 9 สายพันธุ์ พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันก๊าด 2 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp. AP และ *Pseudomonas* sp. CK และจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล 1 สายพันธุ์ คือ *Gordonia* sp. DM ให้อัตราการย่อยสลายสูงที่สุดเท่ากับ 89%, 75% และ 95% ตามลำดับ ภายใน 21 วันทำการทดลอง และเมื่อทำการศึกษาการย่อยสลายด้วยเครื่อง GC-FID พบว่า *n*-alkane ถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า naphtene และสารประกอบ aromatic hydrocarbon ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกันกับ *n*-alkane

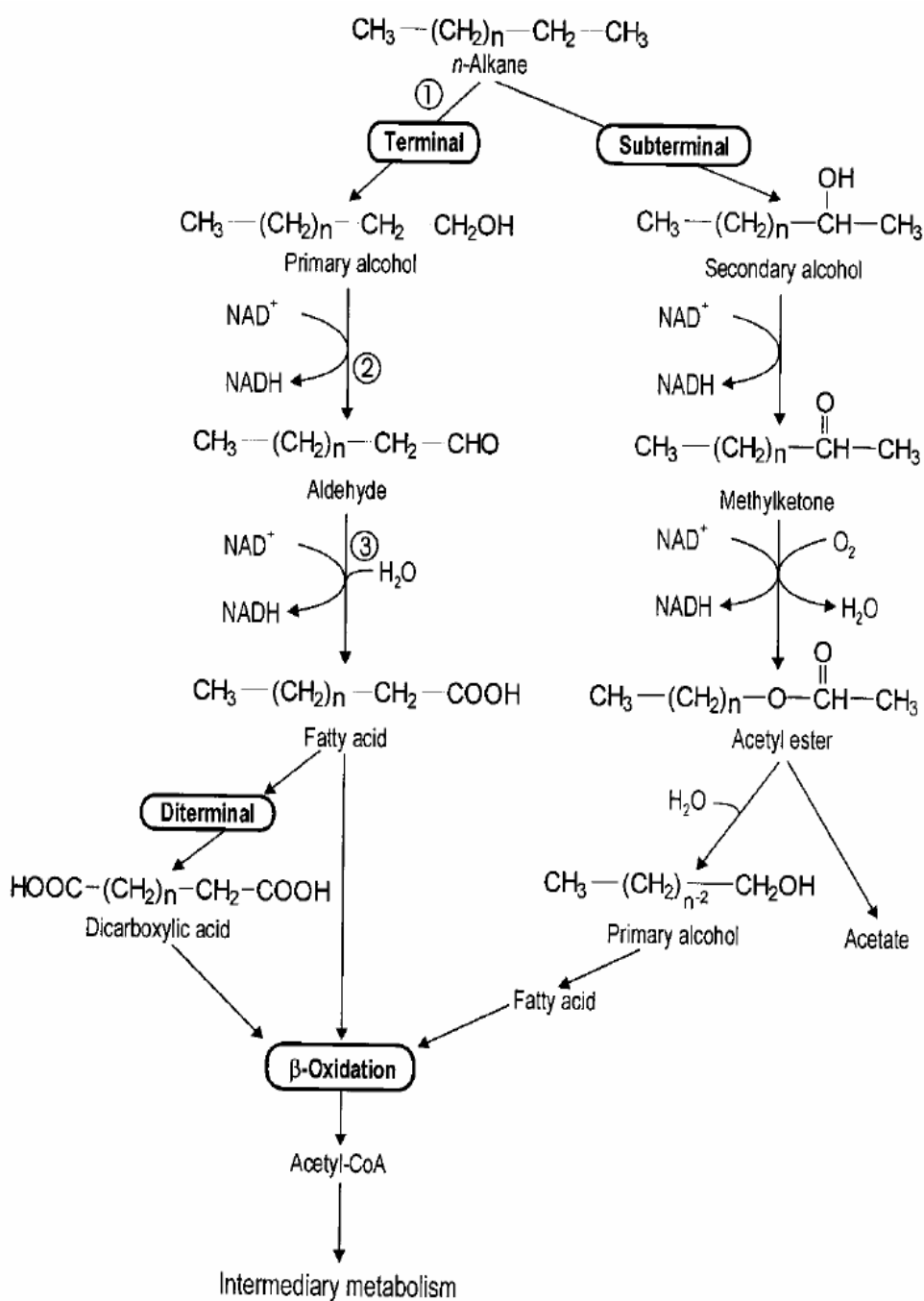


Figure 1. Peripheral pathways of alkane degradation. The main pathway is the terminal oxidation to fatty acids catalyzed by ① = *n*-alkane monooxygenase, ② = alcohol dehydrogenase and ③ = aldehyde dehydrogenase

ที่มา : Fritsche และ Hofrichter (2000)

Nikolopoulou และ Kalogerakis (2008) ศึกษาการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบในทะเลโดยการเติมปุ๋ยที่ละลายยากที่ประกอบด้วย uric acid และ lecithin ร่วมกับ rhamnolipid และกากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งวิตามิน พบว่า สามารถลดปริมาณสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบชนิด *n*-alkanes ตั้งแต่ C₁₉-C₃₄ ได้ 96% ใน 18 วันทำการทดลอง

Lee และคณะ (2008) ศึกษาการย่อยสลาย heavy mineral oil ที่ปนเปื้อนในดินนาน 35 ปี โดยการเติมสารอินทรีย์ เช่น จี๊เลื้อย, ฟางข้าว และมูลสุกร ในดินที่มีการปนเปื้อนพบว่าสามารถย่อยสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ได้ 29-51% ในชุดการทดลองที่เติมสารอินทรีย์ ส่วนในชุดการทดลองที่ไม่เติมสารอินทรีย์ให้การย่อยสลายเพียง 16% ใน 105 วันทำการทดลอง ซึ่งการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon จะย่อยสลายง่ายกว่าสารประกอบ aromatic hydrocarbon

4.2.2 การย่อยสลายสารประกอบ aromatic hydrocarbon

ขั้นตอนของกระบวนการเริ่มด้วยการย่อยสลายส่วนที่เป็น side chain แล้วจึงย่อยส่วนของวงแหวนเบนซีน (สมศักดิ์ วัจโน, 2528) การย่อยสลายสารประกอบ aromatic hydrocarbon จะอาศัยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน และดีไฮโดรจีเนชัน ในการเติมออกซิเจนเข้าไปในวงเบนซีน โดยเอนไซม์ออกซิจีเนสให้อยู่ในรูปของ diol จากนั้นเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสจะเปลี่ยน diol ให้อยู่ในรูปของสารที่ไม่เสถียรหรือที่เรียกว่า catechol ซึ่งการย่อยสลายโดยการแตกวงเบนซีนจะเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ ortho หรือ meta cleavage ดังแสดงใน Figure 2 ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่จะนำสารตัวกลางไปใช้สังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ซึ่งตัวกลางที่ได้จากการแตกวงเบนซีนแบบ ortho cleavage คือ succinate และ acetyl-CoA ส่วนการแตกวงแบบ meta cleavage คือ acetaldehyde และ pyruvate นอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งมีโครงสร้างของโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน จำเป็นต้องอาศัยกลุ่มจุลินทรีย์หลาย ๆ สายพันธุ์เพื่อสร้างเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายให้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จนได้ผลผลิตสุดท้าย คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ

Cerniglia (1993) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบใน aromatic hydrocarbon พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าสารประกอบในกลุ่มนี้ที่มีโครงสร้างง่าย ๆ หรือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือมีโครงสร้างซับซ้อน สารประกอบ aromatic ที่มีวงแหวนเบนซีนหนึ่ง สอง หรือสามวงอยู่ในโมเลกุล เช่น phenol, naphthalene และ anthracene จะถูกย่อยสลายได้ง่าย แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ดี เช่น *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp. และ *Nocardia* spp. สำหรับสารประกอบ aromatic hydrocarbon ที่ประกอบด้วยวง

แหวนเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป จัดเป็นสารที่ย่อยสลายได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับอินทรีย์สารชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในดิน

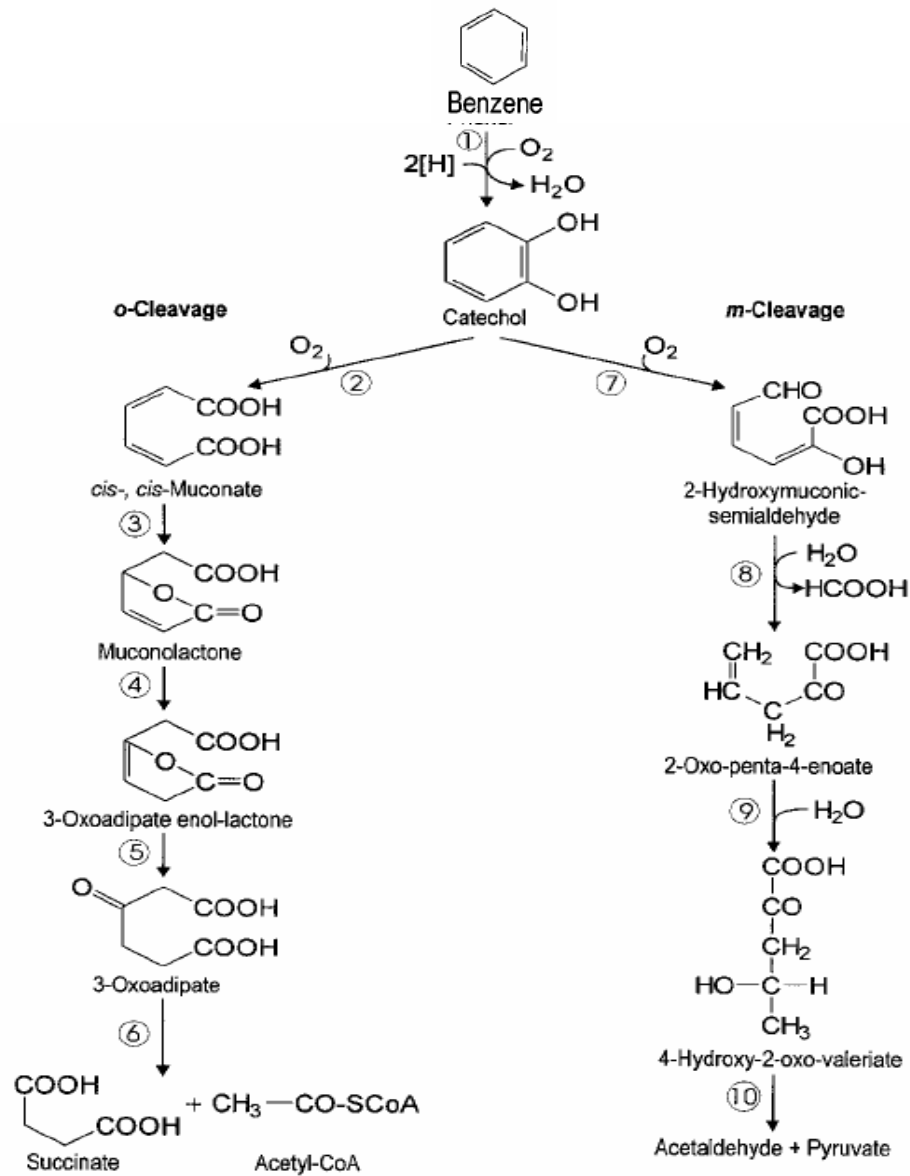


Figure 2. The two alternative pathways of aerobic degradation of aromatic compounds: o- and m-cleavage, ① = benzene monooxygenase, ② = catechol 1,2-dioxygenase, ③ = muconate lactonizing enzyme, ④ = mucono lactone isomerase, ⑤ = oxadipate enol-lactone hydrolase, ⑥ = oxadipate succinyl-CoA transferase, ⑦ = catechol 2,3-dioxygenase, ⑧ = hydroxymuconic semi-aldehyde hydrolase, ⑨ = 2-oxopent-4-enoic acid hydrolase and ⑩ = 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase

ที่มา : ดัดแปลงจาก Fritsche และ Hofrichter (2000)

Jin และคณะ (2006) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันเชื้อเพลิง, น้ำมันดีเซล และ BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, ethylbenzene) ของเชื้อเดี่ยว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. และ *Rhodococcus* sp. และเชื้อผสมโดยผสมเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์เข้าด้วยกัน หลังจากทำการศึกษาเป็นเวลา 10 วัน พบว่า เชื้อผสมมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ สูงกว่าเชื้อเดี่ยวทุกชุดการทดลอง ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุด คือ ethylbenzene สูงถึง 91.5% ส่วน benzene, toluene, gasoline, *o*-ethylbenzene และ diesel oil มีประสิทธิภาพการย่อยสลายเท่ากับ 91.6%, 84.5%, 82.2%, 70.1% และ 62.4% ตามลำดับ

Hadibarata และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลาย chrysene ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Polyporus* sp. S133 ในอาหาร mineral salt broth (MSB) เปรียบเทียบระหว่างการเติม tween 20 และ tween 80 พบว่า การเติม tween 80 สามารถให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย chrysene สูงกว่าการเติม tween 20 เท่ากับ 49% ภายใน 30 วันทำการทดลอง

Lee และคณะ (2008) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ aromatic hydrocarbon ใน heavy mineral oil ที่ปนเปื้อนในดินนาน 35 ปี โดยการเติมสารอินทรีย์ เช่น จีเลื้อย, ฟางข้าว และมูลสุกร ในดินที่มีการปนเปื้อน พบว่า สามารถย่อยสลายสารประกอบ aromatic hydrocarbon ได้ 50% ในชุดการทดลองที่เติมมูลสุกร ส่วนในชุดการทดลองที่เติมฟางข้าวให้การย่อยสลายเพียง 25% ใน 105 วันที่ทำการทดลอง

4.3 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์นั้นมีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนน้ำหนักโมเลกุลสูง รูปแบบของการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์แบ่งออกได้ 3 แบบใหญ่ ๆ ที่สำคัญ (Boopathy, 2000) คือ การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (hydrocarbons assimilation) การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยเกิดกระบวนการ co-metabolism (หรือ co-oxidation ถ้าเกิดมีการออกซิเดชันเกิดขึ้น) และการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยอาศัยการย่อยสลายแบบส่งเสริมกันของกิจกรรมของจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิด (synergism)

4.3.1 กระบวนการ PAHs assimilation หมายถึง แบคทีเรียมีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อนำมาใช้ในการเจริญของเซลล์ สามารถอธิบายได้ด้วยสมการดังนี้



การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์เป็นกระบวนการสำคัญเพราะมีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์และกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากสิ่งแวดล้อมได้อย่างสมบูรณ์ การย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (mineralization) ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นได้ดีกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งประกอบไปด้วย *n*-alkane สายสั้น ๆ และวงเบนซีน 2-3 วง (Rahman *et al.*, 2003a) โดยที่จุลินทรีย์นำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ทำให้มีการเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้น สำหรับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คือ *n*-alkane สายยาว และโมเลกุลประกอบด้วยเบนซีนตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป จะมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย มีความคงตัวมาก ยากต่อการย่อยสลาย (Ron and Rosenberg, 2002) สารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงบางชนิดโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 4 วง เช่น pyrene แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถนำมาใช้ในการเจริญได้ (Cerniglia, 1992)

Garon และคณะ (2004) ศึกษาการย่อยสลาย fluorene ในดินสภาพของเหลวเปี้ยก โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Absidia cylindrospora* และเติม maltosyl-cyclodextrins ช่วยในการชะ fluorene ออกจากอนุภาคดิน พบว่า *A. cylindrospora* สามารถย่อยสลาย fluorene มากกว่า 90% ภายใน 288 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง

Tao และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลาย phenanthrene ที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้ *Sphingomonas* sp. GY2B ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อน PAHs ในอาหาร mineral salts medium ที่มี phenanthrene 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Sphingomonas* sp. GY2B สามารถย่อยสลาย phenanthrene ได้ 99.8% ที่พีเอช 7.4 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจาก 2 วันที่ทำการทดลอง

4.3.2 กระบวนการ co-metabolism หมายถึง การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียบนสับสเตรทชนิดหนึ่ง และมีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทอีกชนิดหนึ่งได้ โดยไม่มีการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (ไม่มีการเจริญบนสับสเตรทชนิดที่ 2) (Samanta *et al.*, 2002) กระบวนการนี้มักเกิดกับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งยากต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีวงเบนซีน 4 วงหรือมากกว่า 4 วงขึ้นไป (Sims and Overcash, 1983) สับสเตรทที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญอาจเป็นสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่อยู่บริเวณนั้นหรืออาจเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งจุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นแล้วเข้าไปย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

Zang และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลายสาร Benzo[a]pyrene และสารเมแทบอลิท์ของ Benzo[a]pyrene ได้แก่ Benzo[a]pyrene-1,6-quinone และ 3-hydroxybenzo[a]pyrene โดย

เติม hydrogen peroxide-zinc, *Aspergillus niger* และ *Zoogloea* sp. ควบคุมสถานะให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า เมื่อเติมรา แบคทีเรีย และ hydrogen peroxide-zinc ร่วมกันสามารถย่อยสลาย Benzo[a]pyrene ได้มากกว่า 20% และสามารถย่อยสลาย Benzo[a]pyrene-1,6-quinone และ 3-hydroxybenzo[a]pyrene ได้ประมาณ 10% ภายในระยะเวลา 20 วัน

Hadibarata และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลาย chrysene ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs โดยการเติมกลูโคส และ polypeptone เป็น co-substrates ลงในอาหาร mineral salt broth (MSB) พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ *polyporus* sp. S133 สามารถย่อยสลาย chrysene ได้ 56% และ 65% เมื่อเติมกลูโคส 10% และ polypeptone 10% ตามลำดับ ภายใน 30 วันทำการทดลอง

4.3.3 กระบวนการ synergism เป็นการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิดช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้อาจไม่ใช่จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่มีการเจริญร่วมกันได้โดยที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้แบบส่งเสริมกัน (Ghazali *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008a)

Gómez และคณะ (2003) เลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ และ รา 4 สายพันธุ์ ใน 16 ชุดการทดลอง บนขานอ้อยเพื่อทดสอบการย่อยสลาย phenanthrene ที่ปนเปื้อนในดิน ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacea* และ *Ralstonia pickettii* และรา 4 สายพันธุ์ คือ *Penicillium* sp., *Trichoderma viride*, *Alternaria tenuis* และ *Aspergillus terreus* เชื้อทั้งหมดนี้แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่า เรามีความสามารถในการย่อยสลาย phenanthrene มากกว่าแบคทีเรีย ซึ่งย่อยได้ในช่วง 35-50% ส่วนแบคทีเรียย่อยได้เพียง 20% เท่านั้น การเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *P. cepacea*-*Penicillium* sp., *R. pickettii*-*Penicillium* sp. และ *P. aeruginosa*-*Penicillium* sp. สามารถย่อยสลาย phenanthrene ได้ถึง 72.84±3.85%, 73.61±6.38% และ 69.74±4.91% ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 18 วัน

Adebusoye และคณะ (2006) ศึกษาการลดปริมาณน้ำมัน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์และเชื้อผสม ได้แก่ *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. พบว่า เมื่อใช้เชื้อรวมกัน 9 สายพันธุ์ สามารถลดปริมาณสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันดิบ น้ำมันดีเซล และ kerosene ได้ 88%, 85% และ 78% ตามลำดับ ภายใน 14 วัน และสามารถลดปริมาณปิโตรเลียมได้ 67% ภายใน 20 วัน

Mandri และ Lin (2007) แยกจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อน LO สามารถแยกแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ คือ *Flavobacterium* sp., *Acinetobacterium calcoaceticum* และ *Pseudomonas aeruginosa* และศึกษาการลดปริมาณ LO โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้ พบว่า การใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *A. calcoaceticum* และใช้แบคทีเรียร่วมกัน 3 สายพันธุ์ สามารถลดปริมาณ LO ได้ 80% และ 90% ตามลำดับ ภายใน 4 สัปดาห์ และแบคทีเรียที่เลี้ยงร่วมกัน 3 สายพันธุ์ ยังสามารถลดปริมาณ *n-paraffin* ได้ถึง 80% ในเวลา 2 สัปดาห์

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์

ประสิทธิภาพของการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ทั้งปัจจัยภายใน เช่น การปรับตัวของจุลินทรีย์ พิเศษ ปริมาณออกซิเจน การมีอยู่ของสารปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ รวมทั้งปริมาณสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในบริเวณนั้นด้วย (วิภา ต้นแพง, 2546)

5.1 การปรับตัวของจุลินทรีย์

การย่อยสลายสารประกอบที่มีความคงทนต่อการถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์นั้น พบว่าไม่สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าสารประกอบนั้นมีโครงสร้างที่จุลินทรีย์ไม่เคยพบในธรรมชาติมาก่อน หรือถ้าจุลินทรีย์เหล่านั้นไม่เคยพบมาก่อนก็จะต้องมีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดและเพื่อให้ความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวได้ (Ashok and Sexena, 1995) เนื่องจากไฮโดรคาร์บอนได้มีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมมาเป็นเวลานาน จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณแหล่งที่มีการปนเปื้อนได้นั้นจะต้องมีการปรับตัวเพื่อที่จะใช้ไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนให้เป็นประโยชน์ต่อการเจริญหรือมีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อลดความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้น โดยกระบวนการชักนำให้มีการสร้างวิถีเมแทบอลิซึมขึ้นมาใหม่เพื่อย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จุลินทรีย์ที่ปรับตัวได้ก็สามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมบริเวณนั้นได้ จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิด ในขณะที่จุลินทรีย์บางชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การปรับตัว และการพัฒนาระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์เอง (Cerniglia, 1992)

การนำเอาจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาใช้ จะพบว่าช่วงระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ในการปรับตัวต่อสภาวะใหม่และยังเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถ

ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เลี้ยงไว้มาใส่ลงในบริเวณที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม พบว่าเกิดการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว (Wilson and Jones, 1993) อย่างไรก็ตามในการย่อยสลายตามธรรมชาติมักเกิดได้ค่อนข้างช้า

Jirasripongpun (2002) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย LO ที่ปนเปื้อนในดิน โดยคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อน LO พบว่า สามารถแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลาย LO ได้ 26 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 6 สายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพการลดลงของ LO สูง และเมื่อนำเชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย LO พบว่า เชื้อสายพันธุ์ *Nocardia simplex* W9 เพียงสายพันธุ์เดียวที่ให้ประสิทธิภาพการลดลงของ LO สูงที่สุด เท่ากับ 34.31% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี weight loss

Perfumo และคณะ (2007) ศึกษาการส่งเสริมการย่อยสลาย hexadecane ที่ปนเปื้อนในดินที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้เชื้อประจำถิ่นและเชื้อสายพันธุ์ *Geobacillus thermolevorans* T80 ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อน alkane ที่อุณหภูมิสูง พบว่า ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อประจำถิ่นและเชื้อสายพันธุ์ *Geobacillus thermolevorans* T80 และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 70% ส่วนชุดการทดลองที่ใช้เชื้อประจำถิ่นและเชื้อสายพันธุ์ *Geobacillus thermolevorans* T80 และบ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 38% หลังจาก 40 วันทำการทดลอง

5.2 โครงสร้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

สิ่งที่สำคัญเป็นอย่างมากต่อการย่อยสลาย คือ คุณสมบัติในการเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น โครงสร้างของแต่ละสารประกอบ ขนาดของโมเลกุล ความสามารถในการละลายน้ำ การระเหย ความเข้มข้น และการจับตัวกันของสารไฮโดรคาร์บอน ความคงทนของสารประกอบซึ่งจะส่งผลต่อการย่อยสลายได้ยากด้วย (Ashok and Saxena, 1995)

ชนิดและปริมาณของสารไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่สำหรับกระบวนการย่อยสลาย bioavailability มีความสำคัญต่อการเกิดกระบวนการย่อยสลาย สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินส่วนใหญ่จะถูกดูดซับไว้กับอนุภาคของดิน สารประกอบอินทรีย์ และตะกอน ดังนั้นจึงยากที่จุลินทรีย์จะเข้าย่อยสลาย (Boopathy, 2000)

จิตติมา แก้วเรือง (2551) แยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย ULO จากดินที่ปนเปื้อน ULO พบว่า กลุ่มเชื้อ SC9 มีความสามารถในการย่อยสลาย ULO ได้สูงที่สุด เมื่อศึกษาปริมาณสูงสุดของ ULO ที่กลุ่มเชื้อ SC9 สามารถย่อยสลายได้ โดยใช้ความเข้มข้นของ ULO ที่ 1%, 3%, 5%, 7%, และ 10% พบว่า กลุ่มเชื้อ SC9 ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ

40.46% เมื่อใช้ ULO 1% ภายใน 30 วันที่ทำการทดลอง และประสิทธิภาพในการย่อยสลายจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ULO

Zinjarde และ Pant (2002) ศึกษาผลของชนิดและปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันดิบต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ โดยใช้ น้ำมันดิบ 3 ชนิด คือ Bombay High Assam crude และ Gujarat crude พบว่า น้ำมันดิบชนิด Bombay High มีอัตราการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบมากที่สุดถึง 82% ส่วนสารประกอบ aromatic hydrocarbon และสารประกอบ asphaltenes มีการย่อยสลายเพียงเล็กน้อย และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันดิบชนิด Bombay High พบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันดิบมากกว่า 2% จะทำให้ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบของยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* ลดลง

Ijah และ Antai (2003) ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยใช้ น้ำมันดิบ Nigerian light ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10%, 20%, 30% และ 40% เป็นเวลา 1 ปี พบว่าจุลินทรีย์กลุ่ม aerobic heterotrophs และจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันมีจำนวนลดลงที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบสูงขึ้น

Arulazhagan และ Vasudevan (2009) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยใช้กลุ่มแบคทีเรียที่ทนเกลือซึ่งคัดแยกจากน้ำทะเล พบว่า กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำในน้ำมันดิบเช่น phenanthrene และ fluoranthene ได้ใกล้เคียงกันที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ppm คือสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 95% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 และ 100 ppm ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลาย phenanthrene ลดลงเหลือ 89% และ 74% ตามลำดับ และ fluoranthene ลดลงเหลือ 89% และ 78% ตามลำดับ ใน 4 วันที่ทำการทดลอง ส่วนสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงในน้ำมันดิบเช่น pyrene กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้มากกว่า 80% ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ppm ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 และ 100 ppm ความสามารถของกลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลาย pyrene ลดลงเหลือ 74% และ 52% ตามลำดับ ใน 4 วันที่ทำการทดลอง และสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงในน้ำมันดิบเช่น benzo(e)pyrene ที่ความเข้มข้น 1 ppm กลุ่มแบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ 70% และมีอัตราการย่อยสลายลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 2 และ 5 ppm เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย สามารถจำแนกได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ochrobactrum* sp., *Enterobacter cloacae* และ *Stenotrophomonas maltophilia*

5.3 ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมทั่วไป

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น โครงสร้างของดิน พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ความสามารถในการละลายน้ำ สารอาหารที่เป็นสารอนินทรีย์ น้ำที่มีความจำเป็นต่อกิจกรรมของ จุลินทรีย์ในดิน จุลินทรีย์ประจำถิ่น และจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลาย สารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้สำเร็จ (Ashok and Saxena, 1995; Boopathy, 2000; Semple *et al.*, 2004)

5.3.1 โครงสร้างของดิน โครงสร้างของดินมีผลต่อระบบนิเวศน์ของจุลินทรีย์และ กระบวนการย่อยสลายที่เกิดขึ้นในดิน สารอาหารที่เป็นประโยชน์ องค์ประกอบของดิน อนุภาค ของดิน และช่องว่างในดินจะมีผลต่อประชากรของจุลินทรีย์ประจำถิ่นและยังมีผลต่อกิจกรรมของ จุลินทรีย์ด้วย องค์ประกอบของดินนั้นจะมีความแตกต่างกันทางส่วนประกอบทางเคมี ช่องว่างของ อากาศ สี ลักษณะเนื้อดินและน้ำที่เป็นองค์ประกอบของดิน ดังนั้นประชากรของจุลินทรีย์ในดินจึง แตกต่างกันทั้งขนาดและชนิดของประชากร ดินทรายจะมีช่องว่างทำให้มีจุลินทรีย์มากกว่าดินร่วน และดินเหนียว ขนาดของช่องว่างในดินมีความจำเป็นต่อน้ำ และอากาศที่ผ่านเข้าออกในดินได้ (Ashok and Saxena, 1995) มีการใช้เทคนิคทางชีววิธีในการบำบัดดินทรายที่มีการปนเปื้อน น้ำมันดิบซึ่งประสบความสำเร็จในการบำบัด (Shabir *et al.*, 2008)

Lertthamrongsak (2003) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในดินที่ ปนเปื้อนสารปิโตรเลียม ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม 2 แห่ง คือ ดินที่ ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมจากบริเวณป้อมพระจุลจอมเกล้าซึ่งดินบริเวณนี้มีลักษณะเป็นดินทราย (ดินทราย 95%) มีสารอาหารน้อย (อัตราส่วนของ C:N:P เท่ากับ 31,200:150:1) และดินที่ปนเปื้อน น้ำมันปิโตรเลียมจากบริเวณสถานีรถไฟบางกอกน้อยซึ่งดินบริเวณนี้มีลักษณะเป็นดินร่วนปนทราย (ดินทราย 82%) มีสารอาหารมาก (อัตราส่วนของ C:N:P เท่ากับ 221:22:1) พบว่า เมื่อนำตัวอย่างดิน ที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมจากบริเวณป้อมพระจุลจอมเกล้าผสมกับไบโมะขามในอัตราส่วนดินต่อ ไบโมะขามเท่ากับ 9:1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) มีอัตราการย่อยสลายดีที่สุดในวันที่ 49 ของการทดลอง คือมีปริมาณ phenanthrene, fluoranthene และ pyrene ถูกย่อยสลาย 13%, 20% และ 8% ตามลำดับ

Shin และ Kim (2004) ศึกษาการย่อยสลาย phenanthrene และน้ำมันดีเซลที่ ปนเปื้อนในดินทราย โดยใช้ rhamnolipid ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า สามารถย่อย สลาย phenanthrene และน้ำมันดีเซลได้ 70% และ 60% ตามลำดับ

Whang และคณะ (2008) ศึกษาการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อน ในดินร่วนปนทราย (ดินทราย 84%) โดยใช้เชื้อที่คัดแยกได้จากบริเวณที่ปนเปื้อนและสารลดแรงตึง ผิวชีวภาพชนิด surfactin ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 และ rhamnolipid ที่ผลิตจาก

Pseudomonas aeruginosa J4 พบว่า ชุดการทดลองที่เติม rhamnolipid 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดปริมาณสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันดีเซลได้ 97% หลังจาก 88 วันทำการทดลอง ส่วนในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำมันดีเซลได้ 47% หลังจาก 88 วันทำการทดลอง

5.3.2 นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ จะเกิดอย่างสมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มหลัก ๆ คือ แบคทีเรียและรา จำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในดินมีประมาณ 10^6 - 10^9 เซลล์ต่อกรัม แต่มีเพียงส่วนหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Mohan *et al.*, 2006) ปัจจัยที่มีผลต่อการจำกัดประสิทธิภาพและจำนวนของจุลินทรีย์ คือ อุณหภูมิ, พีเอช, water activity, ปริมาณออกซิเจน, โครงสร้างของดินและความเป็นพิษของสารไฮโดรคาร์บอน การปนเปื้อนของไฮโดรคาร์บอนจะทำให้จุลินทรีย์มีการปรับตัวเพื่อมีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวได้ แต่ในกระบวนการนี้จุลินทรีย์จะต้องใช้ระยะเวลาอันยาวนาน ได้มีการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพเข้ามาใช้ในการเร่งการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์มีจุดมุ่งหมายที่จะช่วยลดช่วงระยะเวลาเหล่านี้ และทำให้กระบวนการย่อยสลายมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Ashok and Saxena, 1995)

Saul และคณะ (2004) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนบริเวณชายฝั่งเกาะ Ross, Antarctica พบว่า ดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีความหลากหลายของแบคทีเรียน้อยกว่าดินที่ไม่มีการปนเปื้อน แต่ดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่าดินที่ไม่มีการปนเปื้อน ซึ่งแบคทีเรียที่พบในดินที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ *Fibrobacter*, *Acidobacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Bacteroides*, *Deinococcus* และ *Thermus* ส่วนแบคทีเรียที่พบในดินที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ *Pseudomonas*, *Sphingomonas* และ *Variovorax* แต่สามารถพบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Actinobacteria* ได้ในดินทั้งที่มีและไม่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

Kao และคณะ (2008) ศึกษาการย่อยสลายปิโตรเลียมในบริเวณที่มีการปนเปื้อนโดยการย่อยสลายด้วยชีววิธีแบบ *In-situ* bioremediation โดยวิธี biosparging ซึ่งเป็นวิธีการที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อประจำถิ่นให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากเกิดการลดปริมาณลงเมื่อเกิดการปนเปื้อนของสารปิโตรเลียมชนิด benzene, toluene, ethylbenzene และ xylene (BTEX) ในชั้นน้ำใต้ดิน เมื่อทำการหาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในบริเวณที่ปนเปื้อนโดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) พบว่า ในพื้นที่ SB1 มีความหลากหลายของจุลินทรีย์มาก

ที่สุด ซึ่งในวันแรกของการทดลองมีจุลินทรีย์ 13 สายพันธุ์ คือ Uncultured bacterium (AJ133615), *Salfurihydrogenibium* sp. (DQ906006), *Boylliae praeputiale* (AY1011388), *Pseudomonas saccharophila* (AF368755), *Variovorax paradoxus* (AF451851), Uncultured bacterium (AJ289998), *Rubrivivax gelatinosus* (AF487435), *Methylobacterium* sp. (AY436812), Sulphate reducing bacterium (AJ300515), Green non-sulfur bacterium (AF027032), *Rhodothermus marinus* (AF217499), *Candida magnetobacterium bavaricum* (X71838) และ *Aquificales* str. (AF255597) แต่เมื่อทำการส่งเสริมการเจริญโดยวิธี biosparging หลังจาก 10 เดือนที่ทำการทดลองพบว่า มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นจากเดิม 8 สายพันธุ์ คือ *Ensifer* sp. (AF229863), *Geitlerinema* sp. (AF132780), Uncultured bacterium (AY917343), Uncultured bacterium (AB195911), Uncultured green non-sulfur bacterium (AJ441228), β -Proteobacterium (U46748), Bacterium Ellin6089 (AY234741) และ Uncultured bacterium (AJ441230) หลังจากนั้นทำการศึกษาถึงชนิดของ Uncultured bacterium แต่ละสายพันธุ์ พบว่า Uncultured bacterium (AB195911) คือ *Flavobacteriales bacterium*, Uncultured bacterium (AJ289998) คือ *Bacteroidetes bacterium* ส่วน Uncultured bacterium (AY917343), Uncultured bacterium (AB195911), Uncultured bacterium (AJ133615), Uncultured green non-sulfur bacterium (AJ441228) และ Uncultured bacterium (AJ441230) คือ *Candida magnetobacterium* ส่วนประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ BTEX ของจุลินทรีย์ใน 10 เดือนที่ทำการทดลองให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ BTEX มากกว่า 70%

5.3.3 อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิต่ำลงอัตราการย่อยสลายจะต่ำหรือไม่มีการย่อยสลายเกิดขึ้น (Lee *et al.*, 2008) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Ashok and Saxena, 1995; Jin *et al.*, 2006) การเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นกับปฏิกิริยาทางเคมีของการสร้าง (anabolism) และสลายสาร (catabolism)

Antai (1992) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. พบว่า เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนสูงสุดที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 24 วัน และประสิทธิภาพการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. จะลดลงต่ำสุดที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Perfumo และคณะ (2007) ศึกษาการส่งเสริมการย่อยสลาย hexadecane ที่ปนเปื้อนในดินโดยการเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายของเชื้อประจำถิ่นระหว่างอุณหภูมิ 60 องศา

เซลเซียส กับอุณหภูมิห้อง 18 องศาเซลเซียส พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมสารอาหารชนิดไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม บ่มที่อุณหภูมิสูงที่ 60 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสูงกว่าหลังชุดการทดลองที่มีการเติมสารอาหารทั้ง 3 ชนิด และบ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เท่ากับ 65% ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมสารอาหารทั้ง 3 ชนิด และบ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 41% หลังจาก 40 วันทำการทดลอง

5.3.4 พีเอช พีเอชของดินจะพบอยู่ในช่วง 2.5-11 ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและแร่ธาตุต่าง ๆ ที่อยู่ในดิน (Dibble and Bartha, 1979) ค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียจะอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง พีเอชที่สูงมากเกินไปจะทำให้ความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ลดต่ำลง พีเอชที่มีความเหมาะสมในการย่อยสลาย คือ พีเอช 7.0 (Ashok and Saxena, 1995) ในเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ phenanthrene โดยใช้ rhamnolipid พบว่าช่วงพีเอช 4.5-5.5 สามารถเพิ่มการละลายน้ำของ phenanthrene ที่พีเอช 5.5 สามารถเพิ่มการละลายน้ำของ phenanthrene ได้ดีกว่าที่พีเอช 7 เมื่อใช้ rhamnolipid 240 ppm (Shin and Kim, 2004)

Rahman และคณะ (2002) ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินในบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ 130 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 5 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงประกอบด้วย *Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 และ *Pseudomonas* sp. DS10-129 โดยเลี้ยงเชื้อ 1% ในอาหาร mineral salt medium ที่มีน้ำมันดิบ 1% เป็นแหล่งคาร์บอน และปรับพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีค่าเท่ากับ 6.5, 7.5 และ 8.5 ตามลำดับ พบว่า ที่พีเอช 7.5 จุลินทรีย์ผสม 5 สายพันธุ์ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 78% ภายในเวลา 20 วันทำการทดลอง ส่วนที่พีเอช 8.5 จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Flavobacterium* sp. DS5-73 ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ 43% ภายในเวลา 20 วันทำการทดลอง

Zang และ Lian (2008) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต่อการย่อยสลาย 2-naphthol โดยเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium proliferatum* และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ในน้ำเสีย ซึ่งพีเอชเริ่มต้นที่ใช้ คือ 6.6, 7.0 และ 7.4 พบว่า ที่พีเอชเริ่มต้น 6.6 ให้อัตราการย่อยสลาย 2-naphthol สูงกว่าพีเอชเริ่มต้นค่าอื่น ๆ ประมาณ 50% ภายใน 4 วันทำการทดลอง แต่เมื่อทำการทดลองจนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 10 พบว่า ที่พีเอชเริ่มต้น 7.0 ให้อัตราการย่อยสลาย 2-naphthol สูงกว่าพีเอชเริ่มต้นค่าอื่น ๆ ซึ่งมีการย่อยสลายประมาณ 63%

5.3.5 ออกซิเจน กระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีออกซิเจน แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนกระบวนการย่อยสลายจะเกิดได้เร็ว

และสมมุติฐานว่า โดยปริมาณออกซิเจนในดินจะขึ้นกับความพรุนของดินและปริมาณน้ำในดินที่อยู่ตามรูพรุนซึ่งจะทำให้ ออกซิเจนในดินน้อยลง การเติมออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่จะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายและช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ใน Bioslurry reactor (Mohan *et al.*, 2006)

Rhykerd และคณะ (1999) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยใช้วิธีการเติมฟางและการให้อากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนและช่องว่างภายในดิน พบว่า การเติมฟางแล้วทำการไถพรวน การเติมฟางแล้วทำการอัดอากาศ และชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพดิน ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนลดลงเท่ากับ 82%, 50% และ 33% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์ และ 90%, 90% และ 77% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 30 สัปดาห์

Zinjarde และ Pant (2002) ศึกษาผลของอัตราการให้อากาศโดยการเขย่าต่อการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบ โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* และมีอัตราการให้อากาศที่แตกต่างกัน คือ 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที พบว่า อัตราการให้อากาศที่ 200 rpm เป็นอัตราที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบ ซึ่งสามารถย่อยสลายได้สูงถึง 78%

Shailaja และคณะ (2007) ศึกษาผลการย่อยสลาย di-n-butyl phthalate ใน Bioslurry reactor ที่ความแตกต่างของความเข้มข้นของออกซิเจนตั้งแต่ 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ 0.85 มิลลิกรัมต่อลิตรในชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และไม่ฆ่าเชื้อให้อัตราการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 99.31% หลังจาก 72 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง

Hadibarata และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยสลาย chrysene โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ *polyporus* sp. S133 เปรียบเทียบระหว่างการให้อากาศโดยการเขย่ากับไม่มีการให้อากาศ พบว่า เมื่อให้อากาศโดยการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย chrysene สูงกว่าไม่มีการให้อากาศเท่ากับ 65% ภายใน 30 วันทำการทดลอง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการให้อากาศ พบว่า ให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเพียงแค่ 24% ภายใน 30 วันทำการทดลอง

5.3.6 ความชื้น ความชื้นในดินทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านสารอาหาร ออกซิเจน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย โดยระดับความชื้นที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์อยู่ที่ประมาณ 30-90% ซึ่งความชื้นในดินที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ได้คิดเป็น 50% ของน้ำทั้งหมดในดิน (Baker and Diane, 1994)

Barahona และคณะ (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น โดยจำลองการปนเปื้อนในดินด้วยการเติม

น้ำมันดีเซลความเข้มข้น 40 กรัมต่อกิโลกรัมดิน ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร พบว่าเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนเป็น 1.0×10^5 CFU/g ภายในเวลา 55 วัน ที่ระดับความชื้น 20% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมวัสดุเศษเหลือ 2% ขณะที่ระดับความชื้น 30% และเติมวัสดุเศษเหลือ 3% เชื้อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนเป็น 1.6×10^5 CFU/g และหลังจากสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 109 วัน ปริมาณน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินลดลงเท่ากับ 67%

Børresen และ Rike (2007) ศึกษาผลของความชื้นต่อการย่อยสลาย hexadecane ที่ปนเปื้อนในดิน โดยศึกษาความแตกต่างของความชื้นที่ 10%, 15% และ 20% พบว่า ที่ความชื้น 10% ให้อัตราการย่อยสลาย hexadecane สูงที่สุดคือ 50-58 มิลลิกรัม hexadecane ต่อกิโลกรัมต่อวัน เมื่อเติม NH_4Cl 50-200 มิลลิกรัมของ $\text{NH}_4\text{-N}$ ต่อกิโลกรัม หลังจาก 36 วันทำการทดลอง ส่วนที่ความชื้น 15% ให้อัตราการย่อยสลาย hexadecane รองลงมาคือ 38-52 มิลลิกรัม hexadecane ต่อกิโลกรัมต่อวัน และที่ความชื้น 20% ให้อัตราการย่อยสลาย hexadecane ต่ำที่สุดคือ 12-14 มิลลิกรัม hexadecane ต่อกิโลกรัมต่อวัน หลังจาก 36 วันทำการทดลอง

5.3.7 สารอาหาร จุลินทรีย์ต้องการสารอาหารเพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์หรือสร้างพลังงานที่จำเป็นในการดำรงชีวิต สารอาหารถือเป็นส่วนสำคัญที่จะส่งเสริมให้การย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุด (Trindade *et al.*, 2005) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ตลอดจนอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยปกติอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารเหล่านี้อยู่ที่ 100:5:1 (Nikolopoulou *et al.*, 2007) และการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งแบคทีเรียต้องการอัตราส่วนของ C:N:P ตั้งแต่ 100:3:0.6 ถึง 100:10:1 (Leys *et al.*, 2005)

จิตติมา แก้วเรือง (2551) ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลาย ULO ในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC9 พบว่า ชุดการทดลองที่มีการปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 300:10:1 ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุด เท่ากับ 98.02% ภายใน 30 วันทำการทดลอง

Zinjarde และ Pant (2002) ศึกษาผลของสารอาหารต่อการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบ โดยมีการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส คือ 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (76 mM nitrogen) และ 0.001% K_2HPO_4 (6.5 mM phosphorus) ลงในสูตรอาหาร enrichment และ มีการศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ โดยใช้แหล่งไนโตรเจน 3 แหล่ง คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 และ ยูเรีย พบว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบได้สูงถึง 78%

Barahona และคณะ (2004) ศึกษาผลของอัตราส่วนของ C:N ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น โดยใช้อัตราส่วนของ C:N เท่ากับ 100:10 และ 100:30 พบว่า ชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนของ C:N เท่ากับ 100:10 มีอัตราการลดลงของปริมาณน้ำมันดีเซล 67% หลังจาก 109 วันทำการทดลอง

Børresen และ Rike (2006) ศึกษาผลของ NH_4Cl ต่อการย่อยสลาย hexadecane โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0 10 20 50 100 และ 200 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมดิน ซึ่งมีปริมาณความชื้น 12% บ่มที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 73 วัน พบว่า NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ให้ผลการย่อยสลาย hexadecane ได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ 738 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน

Galvis และคณะ (2006) ศึกษาผลของสารอาหารต่อการย่อยสลาย PAHs ที่ปนเปื้อนในดินที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง จำลองการปนเปื้อนในดินโดยการเติม phenanthrene, anthracene และ benzo[a]pyrene และปรับแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัสด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ KH_2PO_4 ตามลำดับ ให้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:1.25:1 กรัม ต่อกิโลกรัมของดิน สามารถลดปริมาณ phenanthrene เท่ากับ 1.7% ขณะที่ anthracene และ benzo[a]pyrene ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

Lee และคณะ (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหารต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในดินที่ปนเปื้อน ULO โดยการเติมปุ๋ย คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ K_2HPO_4 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมปุ๋ยลงในดิน พบว่า หลังจาก 105 วันทำการทดลอง ชุดการทดลองที่เติมปุ๋ยลงในดินที่ปนเปื้อน ULO สามารถลดปริมาณ ULO ได้ 42-51% ในชุดที่ไม่เติมปุ๋ย ULO ลดลงเพียง 18%

6. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ทั้งในรูปของสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular) และที่ติดอยู่กับผนังเซลล์จุลินทรีย์ (cell-bounded) (Mulligan, 2005) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแบบ amphipatic structure ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว หรือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) ส่วนใหญ่ได้แก่ โปรตีนและน้ำตาลซึ่งจะเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น และส่วนที่ไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) เป็นโมเลกุลของกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ดังแสดงใน Figure 3 เมื่อสารลด

แรงดึงผิวละลายอยู่ในตัวทำละลายเช่น น้ำ และหากมีความเข้มข้นที่จุด critical micelle concentration ก็จะเกิดโครงสร้างที่ เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) โดยหันเอาส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอก และส่วนที่ชอบไขมันไว้ด้านในซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงดึงผิวแตกต่างกันออกไป สารลดแรงดึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้ทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะในแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสับสเตรทไม่ละลายน้ำและใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน (Healy *et al.*, 1996)

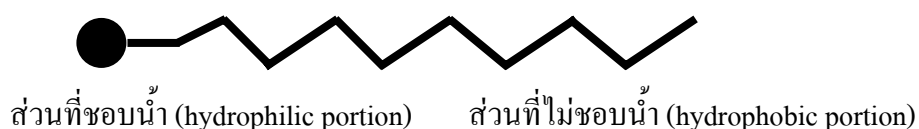


Figure 3. Structure of surfactant.

ที่มา: Fiechter (1992)

สารลดแรงดึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกตามส่วนประกอบโครงสร้างทางเคมี (Banat, 1995) สารลดแรงดึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงดึงผิวที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactants) และสารลดแรงดึงผิวประจุลบ (anionic surfactants) ไม่มีรายงานว่ามีสารลดแรงดึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactants) (Katemai, 2008)

6.1 การจำแนกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงดึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกได้ 6 ประเภทตามโครงสร้าง (Banat, 1995; Catherine, 2005)

6.1.1 ไกลโคลิพิด (glycolipid) เป็นสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต หรือน้ำตาลเชื่อมกับไขมันโดยการเชื่อมหมู่อีเทอร์และเอสเทอร์ เช่น rhamnolipid, sophorolipid, trehalolipid และ trisaccharide (Figure 4a, 4b และ 5)

6.1.2 ลิโปเปปไทด์ (lipopeptides) และลิโปโปรตีน (lipoproteins) ประกอบด้วยกรดอะมิโนเชื่อมต่อกับไขมัน เช่น lichenysin, surfactin, subtilisin, serrawettin, arthrofactin และ streptofactin (Figure 6a, 6b)

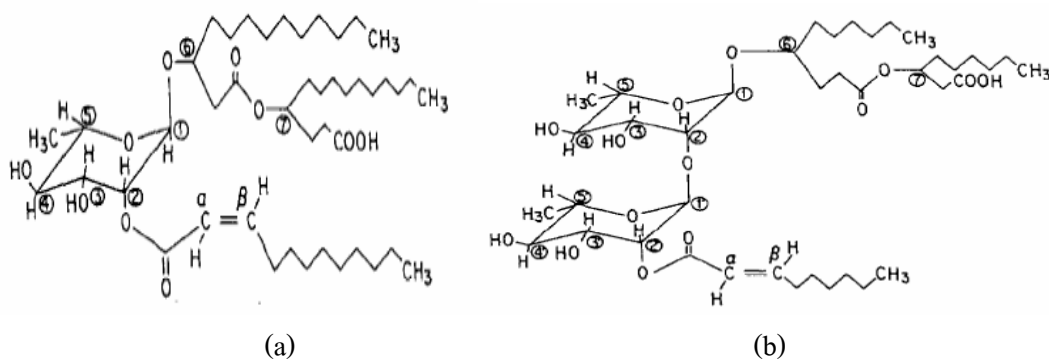


Figure 4. Structure of rhamnolipid different pH by *Pseudomonas* BOP 100 (a) 7.35 and (b) 8.5.

ที่มา : Ishigami and Suzuki (1997)

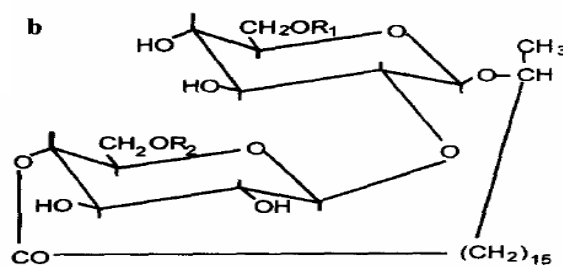


Figure 5. Structure of sophorolipid.

ที่มา : Casas and Ochoa (1999)

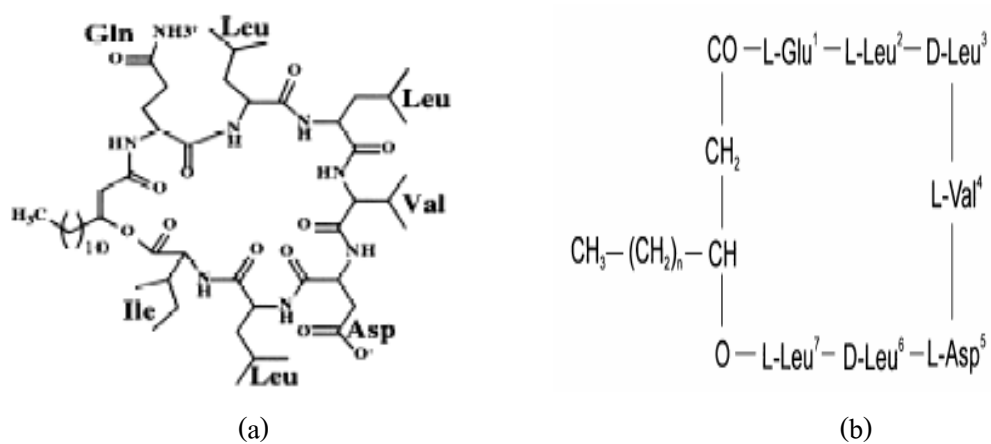


Figure 6. Structure of lichenysin (a) and surfactin (b).

ที่มา : Yakimov และคณะ (1999); Carrillo และคณะ (2003)

6.1.3 กรดไขมัน (fatty acid) และไขมัน (neutral lipids) เช่น rubiwettin R1 และ ornithinelipids (Figure 7)

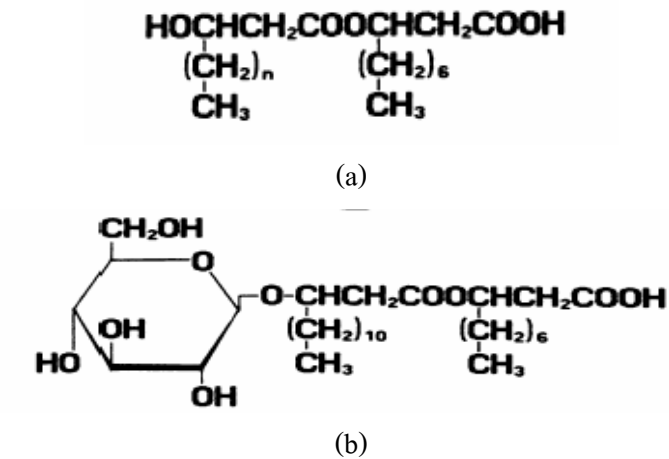


Figure 7. Structure of (a) rubiwettin R1 (b) rubiwettin RG1.

ที่มา : Matsuyama และคณะ (1990)

6.1.4 ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ประกอบด้วยฟอสเฟตเชื่อมต่อกับกรดไขมัน และ กลีเซอรอล เช่น phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol และ phosphatidic acid (Figure 8)

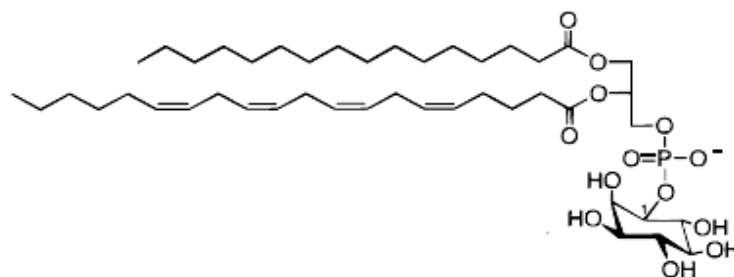


Figure 8. Structure of phosphatidylinositol.

ที่มา : Ryan และคณะ (1996)

6.1.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants) เป็น สารลดแรงตึงผิวที่มีโปรตีนต่อยูกับไขมันหรือโพลีแซคคาไรด์ เช่น emulsan, liposan, alasan, mannoprotein และ biodispersan (Figure 9)

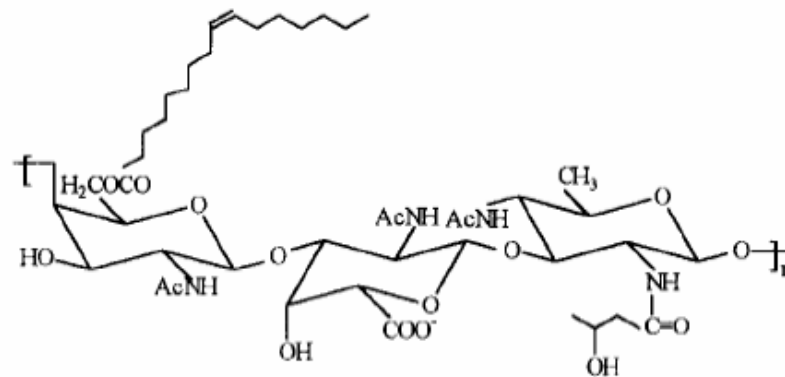


Figure 9. Structure of emulsan.

ที่มา : Zhang และคณะ (1997)

6.1.6 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ติดกับตัวเซลล์ (particulate biosurfactants) ประกอบด้วย โปรตีน ฟอสโฟลิปิด และไลโปพอลิแซ็กคารไรด์ ที่สะสมอยู่บนเซลล์ของจุลินทรีย์ (extracellular membrane vesicles) ที่มีส่วนในการนำสารไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ เช่น vesicle และ fimbriae นอกจากนี้ยังจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (Ron and Rosenberg, 2002)

- สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low-molecular-weight biosurfactant) คุณสมบัติที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือ การลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไกลโคลิปิด และไลโปเปปไทด์

- สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง (Hight-molecular-weight biosurfactant) เป็นพอลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลสูงที่ติดกับพื้นผิวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำอย่างแข็งแรง ทำให้จุลินทรีย์สามารถอยู่ติดกับสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ และนำสารตั้งต้นนั้นไปเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดีขึ้น คุณสมบัติที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือ การทำให้เกิดความคงตัวของอิมัลชัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ ได้แก่ โพลีแซ็กคารไรด์ โปรตีน ไลโปโพลีแซ็กคารไรด์ ไลโปโปรตีนหรือสารละลายเชิงซ้อนจากการรวมตัวของสารพอลิเมอร์ชีวภาพดังกล่าว

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ แสดงใน Table 4

Table 4. Type and microbial origin of biosurfactants.

Microorganism	Type of surfactant
<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N	Fatty acids, mono-and diglycerides
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Emulsan, biodispersan
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Rag-1	Lipoheteropolysaccharide (Emulsan)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2CAC	Whole cells (lipopeptide)
<i>Acinetobacter radioresistaens</i>	Alasan
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Glycolipids
<i>Arthrobacter</i> sp.	Anthrofactin
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Sucrose and fructose glycolipids
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipoprotein
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipoprotein (surfactin)
<i>Candida lipolytic</i>	liposan (mostly carbohydrate)
<i>Candida petrophilum</i>	Peptidolipid
<i>Candida tropicalis</i>	Polysaccharide-fatty acid complex
<i>Corynebacterium lepus</i>	Corynomycolic acids
<i>Corynebacterium salmonicum</i> SFC	Neutral lipids
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Polysaccharide-protein complex
<i>Nocardia erythropolis</i>	Neutral lipids
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glycolipid (rhamnose lipid)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rhamnose lipid
<i>Pseudomonas rubescens</i>	Ornithinelipids
<i>Pseudomonas</i> sp. DMS 2847	Glycolipid (rhamnose lipid)
<i>Pseudomonas</i> sp. MUB	Rhamnose lipid
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trehalose dimycolates
<i>Serratia marcescens</i>	Serrawettin
<i>Serratia rubidaea</i>	Rubiwettin R1
<i>Streptomyces tendae</i>	Streptofactin
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol

Table 4. (Continue)

Microorganism	Type of surfactant
<i>Torulopsis bombicola</i>	Glycolipid (sophorose lipid)
<i>Torulopsis petrophilum</i>	Glycolipid and / or protein

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kosaric (2001)

สารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยมีการทำงาน 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกจุลินทรีย์จะจับกับอนุภาคของน้ำมันและสร้างสารลดแรงตึงผิวออกมามีลซิฟิเคชันทำให้น้ำมันมีอนุภาคขนาดเล็กลง (oil droplets) และผสมเข้ากันได้ดีกับน้ำ หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะนำน้ำมันมีอนุภาคขนาดเล็กเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน ดังแสดงใน Figure 10 สารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มอัตราการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินได้ จะช่วยให้แบคทีเรียยึดเกาะกับอนุภาคดินที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ทำให้ระยะทางการแพร่ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับเซลล์แบคทีเรียสั้นลง (Tang *et al.*, 1998; Poeton *et al.*, 1999) แบคทีเรียสามารถนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย และมีประสิทธิภาพมากกว่าแบคทีเรียที่อยู่ในรูปอิสระ (Bastieans *et al.*, 2000)

นวดล สว่างนาวิน (2547) ทดลองเติมแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ *Pseudomonas aeruginosa* A 41 และ *Bacillus subtilis* BBK1 ในการย่อยสลายน้ำมันดิบในอาหารเหลว BH sea ที่มีน้ำมันดิบ 1% และมี *Brevundimonas* sp. HU2 ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้ พบว่า *P. aeruginosa* A 41 และ *B. subtilis* BBK1 สามารถส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดิบของเชื้อ *Brevundimonas* sp. HU2 ได้หมดภายในระยะเวลา 3 วัน สำหรับการเติม rhamnolipid และ surfactin พบว่ามีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดิบใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบสูงกว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ TritonX-100 และ Chemtech 307 ตามลำดับ

กุลนรี เพชรรงค์ (2550) ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่คัดแยกได้จากทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมัน พบว่า มีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 6-12 โดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 63.26-67.37% และมีความคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส มีค่า emulsification activity เท่ากับ 65.50-68.28% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีความจำเพาะต่อไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีความจำเพาะต่อ aromatic

hydrocarbon มากกว่า aliphatic hydrocarbon โดยสามารถอิมัลซิไฟด์ toluene ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ xylene และ benzene โดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 75%, 74% และ 71% ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ น้ำหนักโมเลกุล และศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความบริสุทธิ์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.97×10^6 และมีโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งปริมาณโปรตีน 42.26% และมีปริมาณโพลีแซคคาไรด์ 57.74%

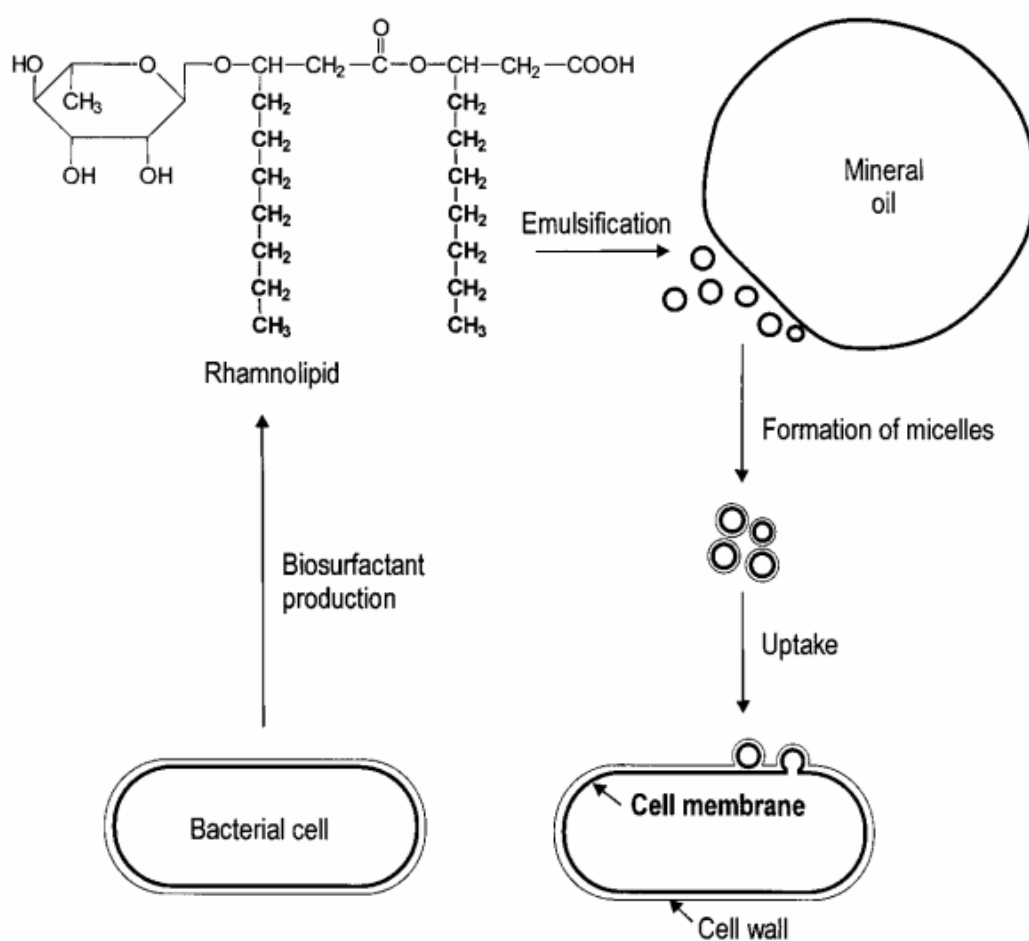


Figure 10. Involvement of biosurfactants in hydrocarbons uptake.

ที่มา : Fritsche และ Hofrichter (2000)

Banat (1995) ศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* ML2 และ *Acinetobacter haemolyticus* ในการส่งเสริมการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* ML2 สามารถเพิ่มการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ 44-46 % เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มเป็น 82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลงเหลือ 32-34%

Rahman และคณะ (2003b) ศึกษาการย่อยสลาย *n*-alkanes ในกากตะกอนปิโตรเลียม โดยการเติมกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ สารอาหาร และ rhamnolipid พบว่า กากตะกอนปิโตรเลียมมีปริมาณน้ำมันและ grease เท่ากับ 87.4% และสามารถย่อยสลาย *n*-alkanes ตั้งแต่ C₈ - C₁₁ ได้สมบูรณ์ และยังสามารถย่อยสลาย C₁₂-C₂₁, C₂₂-C₃₁ และ C₃₂-C₄₀ ได้ 83-98%, 80-85% และ 57-73% ตามลำดับ หลังจาก 56 วันจากการทดลอง

Perfumo และคณะ (2007) ศึกษาการส่งเสริมการย่อยสลาย hexadecane ที่ปนเปื้อนในดินที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายระหว่างชุดการทดลองที่ไม่เติม rhamnolipid, ชุดการทดลองที่เติม rhamnolipid เพียงอย่างเดียว และชุดการทดลองที่เติม rhamnolipid ร่วมกับสารอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า ชุดการทดลองที่เติม rhamnolipid ร่วมกับสารอาหาร NPK, เชื้อสายพันธุ์ *Geobacillus thermolevorans* T80 และไม่ฆ่าเชื้อ สามารถส่งเสริมการย่อยสลาย hexadecane ได้ 90% และ 48% หลังจาก 40 วันทำการทดลอง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Katamai (2008) ศึกษาการผลของลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ *Issatchenkia orientalis* SR4 ต่อการละลายของสารประกอบ PAHs ได้แก่ naphthalene, phenanthrene และ pyrene เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) พบว่า ลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ *I. orientalis* SR4 สามารถเพิ่มการละลายของสารประกอบ PAHs ได้แก่ naphthalene และ phenanthrene ได้ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยสามารถเพิ่มการละลายของ naphthalene เท่ากับ 49.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ phenanthrene เท่ากับ 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่สามารถเพิ่มการละลายของ pyrene ได้ อาจเนื่องมาจากไพริมมิงเบนซีน 4 วงทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าสารประกอบ PAHs ชนิด naphthalene และ phenanthrene ที่มีวงเบนซีนเพียงแค่ 2 และ 3 วง ตามลำดับ

Whang และคณะ (2008) ศึกษาการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในน้ำ โดยใช้เชื้อที่คัดแยกได้จากบริเวณที่ปนเปื้อนและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด surfactin ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ปริมาณที่ใช้ศึกษา 0-160 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

rhamnolipid ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* J4 ปริมาณที่ใช้ศึกษา 0-400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชุดการทดลองที่เติม surfactin 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลถึง 94% ส่วนชุดการทดลองที่ไม่เติม surfactin ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเพียงแค่ 40% หลังจาก 200 ชั่วโมงทำการทดลองและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ surfactin มากกว่า 40 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลเท่ากับ 0% ในการศึกษาผลของ rhamnolipid พบว่า ชุดการทดลองที่เติม rhamnolipid 0-80 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลถึง 100% หลังจาก 200 ชั่วโมงทำการทดลองและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ rhamnolipid สูงขึ้น พบว่า ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลคงที่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO โดยจุลินทรีย์เดี่ยว จุลินทรีย์ผสม และกลุ่มจุลินทรีย์
2. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปือก
3. ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปือก

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบและจุลินทรีย์

1.1 ดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อน LO จาก ต. เขาพระ อ. รัตภูมิ จ. สงขลา

1.2 ULO จากอุ้งมือรถมอเตอร์ไซค์ ซอยมรกตสุข ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา ตัวอย่าง ULO เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

1.3 กลุ่มจุลินทรีย์ SC9 และแบคทีเรียที่แยกให้บริสุทธิ์จากกลุ่มจุลินทรีย์ SC9 มี 4 สายพันธุ์ คือ

1.3.1 *Chryseobacterium* sp.

1.3.2 *Sphingobacterium multivorum*

1.3.3 *Bacillus cereus*

1.3.4 *Agrobacterium tumefaciens*

โดยเชื้อคัดแยกจากดินบริเวณอุ้งมือรถยนต์ อ. หัวไทร จ. นครศรีธรรมราช จากงานวิจัยของจิตติมา แก้วเรือง (2551)

1.4 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่คัดแยกได้จากทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันจากทะเลสาบสงขลา ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหาร Minimal salt medium (พีเอช 7.0) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% (กุลนรี เพชรรงค์, 2550; Phetrong *et al.*, 2008)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Mineral Salt Medium (MSM) (ภาคผนวก ก)

2.2 Minimal salt medium (ภาคผนวก ก)

2.3 Nutrient broth บริษัท Himedia (Mumbai, India) (ภาคผนวก ก)

2.4 Nutrient agar บริษัท Himedia (Mumbai, India) (ภาคผนวก ก)

3. สารเคมี

- 3.1 Dichloromethane บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.2 Toluene บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.3 Methanol บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.4 Ethanol 95% บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.5 Hexane บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.6 Tween 80 บริษัท Ajax finechem Ltd. (Auckland, Newzeland)
- 3.7 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) บริษัท Bio-Red (California, USA)
- 3.8 *n*-hexadecane บริษัท Nacalai Tesque Inc. (Tokyo, Japan)
- 3.9 Anhydrous Na₂SO₄ บริษัท Ajax finechem Ltd. (Auckland, Newzeland)
- 3.10 Urea บริษัท Riedel-deHaën (Germany)
- 3.11 Ammonium sulphate บริษัท Merck (Darmstadt, Germany)
- 3.12 Ammonium nitrate บริษัท Merck (Darmstadt, Germany)
- 3.13 Dipotassium hydrogenphosphate บริษัท Ajax finechem Ltd. (Auckland, Newzeland)
- 3.14 Sodium dihydrogenphosphate บริษัท Ajax finechem Ltd. (Auckland, Newzeland)
- 3.15 Ammonium chloride บริษัท Ajax finechem Ltd. (Auckland, Newzeland)
- 3.16 Sodium chloride บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.17 Potassium dihydrogenphosphate บริษัท APS Ajax finechem Ltd. (Auburn, Australia)
- 3.18 Magnesium sulphate บริษัท Carlo Erba (Italy)
- 3.19 Iron (II) sulphate บริษัท Riedel-deHaën (Germany)

4. อุปกรณ์

- 4.1 แท่ง silica gel รุ่น Cromarod-SIII บริษัท Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.
- 4.2 เครื่อง IATRONSCAN TLC-FID Analyzer รุ่น Iatronscan, TH-10 Mark 5 บริษัท Iatron Laboratories, Inc.
- 4.3 เครื่อง GC-MS รุ่น HP 5890 Gas Chromatograph-HP 5972 Mass Selective Detector บริษัท Hewlett-Packard
- 4.4 เครื่องเขย่า รุ่น Certomat MOII บริษัท B. Braun Biotech International
- 4.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210 s บริษัท Sartorius

- 4.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D Company, Ltd
- 4.7 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 5227044 บริษัท Hotpack
- 4.8 ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven) รุ่น MOV.212 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd
- 4.9 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd
- 4.10 เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-100 บริษัท Eyela
- 4.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น 5203 บริษัท Hitachi
- 4.12 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 420A บริษัท Orion Research, Inc
- 4.13 ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น U63118B บริษัท Gilson
- 4.14 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น YS100 บริษัท Nikon
- 4.15 โถดูดความชื้น (Desicator)
- 4.16 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอน

1.1 การวิเคราะห์การลดลงของ ULO (weight loss)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM 50 มิลลิลิตร ที่มี ULO 1% เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สกัด culture broth ด้วย hexane ในอัตราส่วนที่เท่ากันกับ culture broth โดยทำการสกัด 2 ครั้ง แล้วนำส่วนของตัวทำละลายมากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 นำสารละลายไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ และชั่งน้ำหนักสารที่ได้ จากนั้นคำนวณหาการลดลงของ ULO จากสมการ (Shirai *et al.*, 1995)

$$\text{การลดลงของ ULO (\%)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100$$

W_1 = น้ำหนักของน้ำมัน ULO เริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักของน้ำมัน ULO ที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1.2 การวิเคราะห์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนใน ULO โดย TLC-FID

นำ ULO ที่ได้จากการสกัดข้อ 1.1 มาละลายใน hexane อัตราส่วน 1:1,000 แล้วนำมา spot ลงบน silica gel rod SIII จากนั้นแยกองค์ประกอบของ ULO โดยใช้ตัวทำละลาย

เคลื่อนที่ (mobile phase) 3 ระบบ ระบบที่ 1 คือ hexane 100% จนกระทั่งความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 10 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น แล้วใช้ระบบที่ 2 คือ toluene 100% ให้ความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 5 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น และระบบที่ 3 คือ dichloromethane : methanol (95%: 5%) ให้ความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 2 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น จากนั้นอบ silica gel rod SIII ที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการวิเคราะห์ปริมาณขององค์ประกอบใน ULO ด้วยเครื่อง TLC-FID ที่มีอัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที อากาศ 2 ลิตรต่อนาที ระดับความเร็วในการสแกน 30 วินาทีต่อหนึ่งครั้งต่อการสแกน และทำการหาพื้นที่ใต้กราฟโดยการทำอินทิเกรต (Sharma *et al.*, 1998)

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน (\%)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟเริ่มต้น} - \text{พื้นที่ใต้กราฟสุดท้าย}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟเริ่มต้น}} \times 100$$

1.3 การวิเคราะห์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนใน ULO โดย GC-MS

นำ ULO ที่ได้จากการสกัดข้อ 1.1 ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณขององค์ประกอบใน ULO ด้วยเครื่อง GC-MS โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งจะเตรียมตัวอย่าง ULO ด้วยวิธี Solid-Phase Extraction (SPE) โดยนำ ULO 1 มิลลิลิตร หยดลงบนคอลัมน์ SPE แล้วชะด้วย 100% hexane หลังจากนั้นนำส่วนที่ผ่านคอลัมน์ SPE มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS โดยใช้สภาวะดังแสดงใน Table 5

Table 5. GC-MS conditions.

GC	MS
Inlet temp : 240 °C, He carrier flow 1.0 ml/min, splitless 0.8 min	Ionization mode : Electron Ionization
Oven initial temp : 50 °C 1.5 min	Acquisition mode : Scan, 35-500 amu
Ramp to 180°C at 15 °C/min	Solvent delay time : 3.0 min
Ramp to 275°C at 10 °C/min	Transfer line temp : 275 °C
Column : Rtx-5MS, 30m., film thickness 0.25 µm, ID. 0.25 mm	

2. การหาจำนวนเชื้อ Heterotrophic bacteria

หาจำนวน heterotrophic bacteria โดยนำ 0.1 มิลลิลิตร ของเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยที่ระดับความเจือจางเหมาะสม เกลี่ยบนอาหาร Nutrient agar ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงหรือจนสังเกตเห็นโคโลนีชัดเจน นับจำนวนโคโลนีและคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วย log CFU/mL (Ibekwe *et al.*, 2006)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

เก็บตัวอย่างดินที่อุดมสมบูรณ์โดยคูดึงจากการเจริญเติบโตของพืชในดินบริเวณดังกล่าว และไม่มีประวัติการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือ LO ขุดดินลึกจากผิวหน้าดินประมาณ 15 ซม. แยกเศษใบไม้และหินออก นำดินไปวิเคราะห์ ดังนี้

1.1 ความชื้น

ชั่งตัวอย่างดิน 100 กรัม ใส่ในจานระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำตัวอย่างดินไปอบที่ตู้อบ อุณหภูมิ 105 ± 1 องศาเซลเซียส อบจนแห้งและได้น้ำหนักคงที่ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน desicator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (Brady, 1974) แล้วหาความชื้นจากสมการคำนวณ

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100$$

$$W_1 = \text{น้ำหนักของดินเริ่มต้น}$$

$$W_2 = \text{น้ำหนักของดินที่ผ่านการอบแห้ง}$$

1.2 การวัดค่าพีเอชของดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำ DI 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน 20 นาที เมื่อครบกำหนดคนนำมาวัดด้วยเครื่อง pH meter ก่อนวัดต้องเปิดเครื่องทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นปรับเครื่องด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4, 7 และ 10 ตามลำดับ แล้วนำไปวัดพีเอชของตัวอย่างดินที่เตรียมไว้ (Beck *et al.*, 1980)

1.3 วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 50 กรัม ใส่ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร แล้วเติม hexane 100 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน แล้วนำส่วนของตัวทำละลายไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ แล้วนำไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้มาละลายใน hexane ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใช้ส่วนสกัด 1 ไมโครลิตร ฉีดลงเครื่อง TLC-FID แล้ววิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (Sharma *et al.*, 1998)

1.4 วิเคราะห์ชนิดของดิน, ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด, ปริมาณฟอสฟอรัสและปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน (organic matter)

ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยชนิดของดิน, ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน, ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และปริมาณฟอสฟอรัสวิเคราะห์ด้วยวิธี Hydrometer method, Walkley and Black's method, Micro kjeldahl method และ Bray No.II ตามลำดับ

ตัวอย่างดินเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อ SC9 ที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อโดยนำเชื้อที่เทียบเคียงสายพันธุ์แล้วจากการทดลองของจิตติมา แก้วเรือง จำนวน 4 สายพันธุ์ (A คือ *Chryseobacterium* sp., B คือ *Sphingobacterium multivorum*, C คือ *Bacillus cereus* และ D คือ *Agrobacterium tumefaciens*) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแต่ละสายพันธุ์ 1% มาเลี้ยงในอาหาร NB 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 125 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเหวี่ยงแยกเซลล์ (8,500 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส, 20 นาที) ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง แล้วเตรียมเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยด้วย 0.85% NaCl ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 7.0 log CFU/mL หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 10% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดสอบการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว 4 สายพันธุ์ (A, B, C, D), 2 สายพันธุ์ (AB, AC, AD, BC, BD, CD; 1:1, v/v), 3 สายพันธุ์ (ABC, ABD, ACD, BCD; 1:1:1, v/v), 4 สายพันธุ์ (ABCD; 1:1:1:1, v/v) และกลุ่มเชื้อ SC9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ บ่มเชื้อโดยเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดการเจริญและทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการ

ย่อยสลาย ULO ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO สูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3. ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อที่คัดเลือกได้ในดินสภาพของเหลวเปียก

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ในอาหาร NB 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1% มาเลี้ยงในอาหาร NB 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก 125 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเหวี่ยงแยกเซลล์ (8,500 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส, 20 นาที) ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง แล้วเตรียมเซลล์จูลินทรีย์ในรูปแขวนลอยด้วย 0.85% NaCl ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 7.0 log CFU/mL

3.1 ผลของปริมาณดินต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปียก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมดิน 0%, 5%, 10%, 15% และ 20% จากนั้นเติมเซลล์จูลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ลงไป 10% โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญและทดสอบความสามารถของเชื้อจูลินทรีย์ในการย่อยสลาย ULO ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO สูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.2 ผลของปริมาณเชื้อต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปียก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีพีเอชเท่ากับ 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ 10% ลงไป แล้วเติมเซลล์จูลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ลงไป 0%, 5%, 10%, 15%, 20% และ 25% โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดการเจริญและทดสอบความสามารถของเชื้อจูลินทรีย์ในการย่อยสลาย ULO ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO สูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปี้ยว

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 แล้วเติม ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดการเจริญ และทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย ULO ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ เลือกรูการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO สูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปี้ยว

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี NH_4Cl หรือ NH_4NO_3 หรือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ หรือยูเรีย ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วเติม ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดการเจริญและทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย ULO ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ เลือกรูการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO สูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปี้ยว

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วเติม ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดการเจริญและทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลาย ULO ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ เลือกรูการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO สูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.6 ผลของอัตราส่วนของแหล่งฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปี้ยว

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และแหล่งฟอสฟอรัส คือ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 อัตราส่วน 0:0, 0:1.2, 1.8:0, 0.9:1.2,

1.8:0.6 และ 1.8:1.2 (กรัมต่อลิตร) แล้วปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 เติม ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมนินและเซลล์จูลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดการเจริญและทดสอบความสามารถของเชื้อจูลินทรีย์ในการย่อยสลาย ULO ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO สูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย ULO โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในดินสภาพของเหลวเปียกที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 กรัมต่อลิตร เติม K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 เติม ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมนินและเซลล์จูลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ เติมนินและเซลล์จูลินทรีย์ที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ลงไปในดินสภาพของเหลวเปียก 35 มิลลิกรัม (ดัดแปลงจาก Kosaric, 2001; Katemai, 2008) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 8 ชุดการทดลอง ดังแสดงใน Table 6 ทุกชุดการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีทั้งชุดที่ฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ ซึ่งชุดที่ฆ่าเชื้อจะนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำชุดการทดลองทุกชุดการทดลองไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 7 และ 30 เพื่อนำไปวัดการเจริญและทดสอบความสามารถของเชื้อจูลินทรีย์ในการย่อยสลาย ULO ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1, 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ

5. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

เตรียมกล้าเชื้อโดยนำกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร NB 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1% มาเลี้ยงในอาหาร NB 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก 125 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเหวี่ยงแยกเซลล์ (8,500 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส, 20 นาที) ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง แล้วเตรียมเซลล์จูลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยด้วย 0.85% NaCl ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ $7.0 \log \text{CFU/mL}$

Table 6. Overview of microcosms set-up

No.	Amendments	Microcosm set-up
1	Sterilized soil with no amendments	SS
2	Sterilized soil with SC9 consortia	SS + SCI
3	Sterilized soil with crude biosurfactant	SS + CB
4	Sterilized soil with all amendments	SS + SCI + CB
5	Non-sterilized soil, No amendments	NSS
6	Non-sterilized soil, soil indigenous, SC9 consortia	NSS + SCI
7	Non-sterilized soil, soil indigenous, crude biosurfactant	NSS + CB
8	Non-sterilized soil, all amendments	NSS + SCI + CB

SS = sterile soil; NSS = non-sterile soil; SCI = SC9 consortia inoculum; CB = crude biosurfactant. Sample were sterile in autoclaved at 121°C for 30 min.

5.1 ผลของความสามารถในการย่อยสลาย xylene และ benzene

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 กรัมต่อลิตร เติม K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 เติม xylene และ benzene ที่ความเข้มข้น 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1% และ 0.25% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน เติมเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยที่เตรียมได้จากข้อ 5.1.5% พันฝาหลอดด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหยของ xylene และ benzene แล้วเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นแสดงว่าเชื้อมีการเจริญ

5.2 ผลของความสามารถในการย่อยสลาย naphthalene

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM agar ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 กรัมต่อลิตร เติม K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 เติม agar 1.5% แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM agar ลงในงานเพาะเชื้อ เชื้อการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง เลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM agar ที่ไม่มีการปนเปื้อนมา streak เซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยที่เตรียมได้จากข้อ 5.1.5 หลังจาก streak เสร็จกว่างานเพาะเชื้อ แล้วเติม naphthalene ในรูปของแข็งลงบนฝางานเพาะเชื้อให้ไอระเหยของ

naphthalene อิมัลชันในอาหารแข็ง พันด้วยพาราฟิล์มป้องกันการระเหยของ naphthalene บ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วันหรือจนสังเกตเห็นโคโลนี

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินที่ ต. เขาพระ อ. รัตภูมิ จ. สงขลา ซึ่งเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์มีองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุสูงและไม่มีประวัติการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือ LO โดยเมื่อนำไปสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในดินพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของสารดังกล่าว (Table 7) จากนั้นส่งดินไปวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จากผลการวิเคราะห์ พบว่าดินตัวอย่างมีลักษณะเป็นดินร่วน (Loam soil) มีค่าพีเอชและความชื้นเท่ากับ 6.29 และ 20% จะเห็นได้ว่าค่าความชื้นของดินตัวอย่างอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งความชื้นของดินที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะอยู่ในช่วง 30-90% (Baker and Diane, 1994) ส่วนค่าพีเอชนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารปนเปื้อนและชนิดของจุลินทรีย์ว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการย่อยสลายสารปนเปื้อนชนิดใดอยู่ในช่วงใด ซึ่งค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียจะอยู่ในช่วงที่เป็นกลางคือ พีเอช 7.0 (Ashok and Saxena, 1995) ส่วนปริมาณอินทรีย์วัตถุ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณฟอสฟอรัสในดินตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 2.5%, 0.13% และ 0.054% ตามลำดับ (Table 7) เมื่อพิจารณาอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในดินตัวอย่างเท่ากับ 100:5:2 จะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในดินมีปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Lay *et al.*, 2005)

ถึงแม้ดินตัวอย่างจะมีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญ แต่ในการทดลองในครั้งนี้เป็นการทดลองกับดินในสภาพของเหลวเพียงจึงทำให้ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ในดินมีปริมาณน้อยลง จึงจำเป็นต้องมีการเติมสารอาหารลงไป และจำเป็นต้องมีการหาปริมาณสารอาหารปริมาณดิน และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งมีต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

Table 7. Physical and chemical characteristics of soil sample

Soil property	
Texture	Loam
- clay (%)	17.32
- silt (%)	37.61
- sand (%)	45.06
pH	6.29
Moisture content (%)	20
Organic matter (%)	2.50
Total hydrocarbon (%)	0
Total N (%)	0.13
Available P (%)	0.054

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำกล้าเชื้อที่เทียบเคียงสายพันธุ์แล้วจากการทดลองของนางสาวจิตติมา แก้วเรือง จำนวน 4 สายพันธุ์ (A คือ *Chryseobacterium* sp., B คือ *Sphingobacterium multivorum*, C คือ *Bacillus cereus* และ D คือ *Agrobacterium tumefaciens*) และกลุ่มเชื้อ SC9 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว 4 สายพันธุ์ (A, B, C, D), 2 สายพันธุ์ (AB, AC, AD, BC, BD, CD; 1:1, v/v), 3 สายพันธุ์ (ABC, ABD, ACD, BCD; 1:1:1, v/v), 4 สายพันธุ์ (ABCD; 1:1:1:1, v/v) และกลุ่มเชื้อ SC9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $7 \log \text{CFU/mL}$ เลี้ยงเชื้อเดี่ยวและกลุ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงดัง Figure 11 พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด คือ 44.5% รองลงมาคือชุดการทดลอง AC เป็นชุดที่มีการเติมเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ร่วมกับ *B. cereus* ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO 27.5%

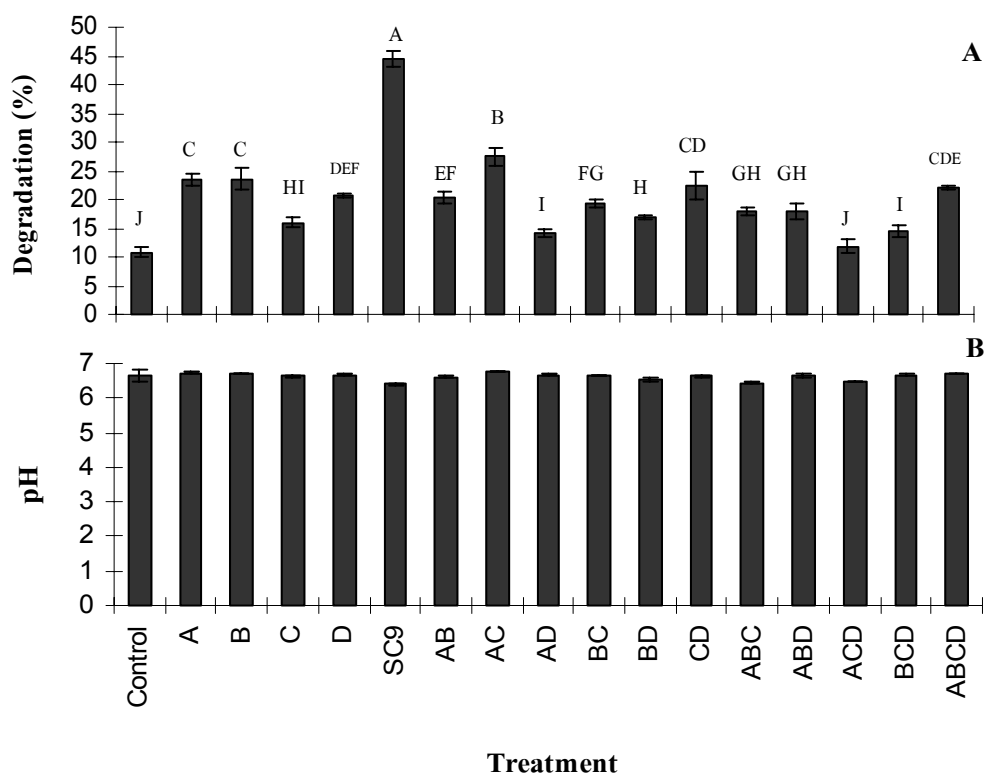


Figure 11. Degradation rate of ULO (1%) (A) and pH changes (B) with the addition of single, mixed bacterial culture and SC9 consortia of bacterial culture in 50 mL MSM and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

ผลการลดลงของ ULO สอดคล้องกับผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง และรองลงมาคือชุดการทดลอง AC มีจำนวนเชื้อเท่ากับ $10.1 \log \text{ CFU/mL}$ และ $9.9 \log \text{ CFU/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 8 และเมื่อพิจารณาถึงค่าพีเอชของ culture broth พบว่า ชุดการทดลองมีการลดลงของค่าพีเอช ดังแสดงใน Figure 11 การเติมกลุ่มเชื้อ SC9 มีการลดลงของค่าพีเอชมากที่สุด โดยลดลงจาก 7.0 เป็น 6.4 ซึ่งสอดคล้องกับการมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO มากที่สุดและมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นสูงที่สุด การลดลงของพีเอชในการย่อยสลาย ULO สอดคล้องกับการทดลองของ Hamdi และคณะ (2007) ที่ศึกษาการลดลงของสารประกอบ PAHs โดยการส่งเสริมการเจริญและการเติมเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าค่าพีเอชของทุกชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 6-7 ซึ่งการที่พีเอชลดลงนั้นเนื่องมาจากในระหว่างการย่อยสลายสารประกอบ

ไฮโดรคาร์บอน จุลินทรีย์ปล่อยสารออกมาอยู่ในรูปของโปรตอนซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน โดยมีเอนไซม์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา alicyclic alcohol จะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันและออกซิเดชัน ได้เป็นสารประกอบไดคาร์บอกซิลิกแอซิด (Juhasz, 1997) เป็นผลทำให้พีเอชมีค่าลดลง

Table 8. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the addition of single, mixed bacterial culture and SC9 consortia of bacterial culture in 50 mL MSM and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.

Treatment	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
Control	0
A	8.2±0.03
B	8.4±0.07
C	8.8±0.04
D	8.4±0.01
SC9	10.1±0.04
AB	9.3±0.05
AC	9.9±0.04
AD	8.3±0.06
BC	8.4±0.02
BD	8.3±0.15
CD	9.9±0.02
ABC	9.2±0.07
ABD	8.5±0.01
ACD	8.4±0.04
BCD	8.9±0.07
ABCD	9.4±0.05

จากการศึกษาของจิตติมา แก้วเรือง (2550) ที่ทำการคัดแยกกลุ่มเชื้อ SC9 จากดินที่บริเวณอู่ซ่อมรถที่มีการปนเปื้อนของ ULO เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 มาแยกให้บริสุทธิ์ สามารถแยก

ได้ 4 สายพันธุ์คือ *Chryseobacterium* sp., *B. cereus*, *A. tumefaciens* และ *S. multivorum* ซึ่งแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์แรกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) ส่วนอีก 2 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) และรูปร่างกลม (cocci) ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อ 4 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีคาร์บอน ULO เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน พบว่ามีเพียงสายพันธุ์ *A. tumefaciens* และ *S. multivorum* เท่านั้นที่สามารถย่อยสลาย ULO ได้ แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้จึงมีบทบาทในการย่อยสลายในช่วงแรก หลังจากนั้นเมื่อมีสารตัวกลางเกิดขึ้น เชื้อสายพันธุ์ *Chryseobacterium* sp. และ *B. cereus* จึงทำหน้าที่ย่อยสลายต่อไป แต่จากผลการทดลองของการทดลองนี้ พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงคือ *S. multivorum* และ *B. cereus* แตกต่างจากการทดลองของจิตติมา แก้วเรือง (2550) อาจเป็นเพราะคุณสมบัติของ ULO แตกต่างกัน ซึ่ง ULO ของจิตติมา แก้วเรือง (2550) มีองค์ประกอบของ aromatic, resins และ asphaltenes เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID ส่วน ULO ที่ใช้ในการทดลองนี้มีองค์ประกอบเฉพาะ aromatic เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID ดังนั้นจึงทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายแตกต่างกัน

ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO ของเชื้อผสมระหว่างเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ร่วมกับ *B. cereus* (AC) จะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO ดีกว่าเชื้อเดี่ยวทั้ง 2 สายพันธุ์ ในชุดการทดลอง A และ C ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีเอนไซม์ที่สามารถทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกันในการย่อยสลาย ULO ได้ดีกว่าเอนไซม์ของสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง แต่เมื่อใช้เชื้อ *Chryseobacterium* sp. ร่วมกับ *S. multivorum* และ *A. tumefaciens* ในชุดการทดลอง AB และ AC ตามลำดับ และใช้ *B. cereus* ร่วมกับ *S. multivorum* และ *A. tumefaciens* ในชุดการทดลอง BC และ CD ตามลำดับ นั้นให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO ใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่มีเชื้อผสม 3 สายพันธุ์ และต่ำกว่าในชุดการทดลอง AC นั้นอาจเป็นเพราะเกิดภาวะแข่งขันกันหรือจุลินทรีย์ดังกล่าวไม่สามารถย่อยสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายได้จึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายต่ำ แต่มีรายงานของ Syakti และคณะ (2004) ศึกษาการทำงานร่วมกันของ *Chryseobacterium* sp. และ *Sphingomonas* sp. 2MPII ในการย่อยสลาย *n*-ecosane และ phenanthrene พบว่า สามารถย่อยสลาย *n*-ecosane ได้ 58% และย่อยสลาย phenanthrene ได้ 64% การที่เชื้อผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ (ABCD) ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO ต่ำกว่ากลุ่มเชื้อ SC9 นั้นเป็นเพราะกลุ่มเชื้อ SC9 อาจจะมีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดนอกจากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ที่แยกได้ จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO ได้ดียิ่งขึ้น โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีอยู่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแบบส่งเสริมกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rosa และคณะ (2009) ที่ศึกษาการย่อยสลาย phenol ที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์และแบคทีเรียสายพันธุ์

Acinetobacter calcoaceticus var. *anitratus* ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรม พบว่า กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์สามารถมีชีวิตอยู่ที่ความเข้มข้นของ phenol 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตรและสามารถย่อยสลาย phenol ได้เร็วกว่าเชื้อสายพันธุ์ *A. calcoaceticus* var. *anitratus* โดยการใช้กลุ่มเชื้อสามารถย่อยสลาย phenol ได้ 86.0% ในขณะที่การใช้เชื้อ *A. calcoaceticus* var. *anitratus* ย่อยสลาย phenol ได้เพียง 48.5% และมีรายงานของ Rahman และคณะ (2002) ที่ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 และ *Pseudomonas* sp. DS10-129 พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้สูงที่สุดถึง 78% รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. DS10-129 และ *Bacillus* sp. DS6-86 สามารถย่อยสลายได้เท่ากับ 66% และ 59% ตามลำดับ แต่มีรายงานของวิภา ตันแพง (2546) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยใช้กลุ่มเชื้อ W3 และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. รหัส ALIP S34 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. รหัส ALIP S34 สามารถย่อยสลายสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ดีกว่ากลุ่มเชื้อ W3 ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้สมบูรณ์ในวันที่ 5 ของการทดลอง ส่วนกลุ่มเชื้อ W3 นั้นย่อยสลายสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ 94.1% ในวันที่ 5 ของการทดลอง และมีรายงานถึงความสามารถของจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC9 คือ *Chryseobacterium* sp., *Sphingobacterium multivorum*, *Bacillus cereus* และ *Agrobacterium tumefaciens* นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิด aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon (สมศักดิ์ วังไฉน, 2528; Cerniglia, 1993; Syakti *et al.*, 2004; Adebusoye *et al.* 2006; Tao *et al.* 2007; Seo *et al.* 2009)

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนมักต้องการการทำงานร่วมกันระหว่างเชื้อหลายสายพันธุ์มากกว่าการใช้เชื้อสายพันธุ์เดียว จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์จะทำให้ปริมาณและชนิดของเอนไซม์มีความหลากหลายซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของอัตราการย่อยสลาย ข้อได้เปรียบของการใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ คือจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายสารตัวกลางที่อาจจะเป็นพิษเกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายได้จึงทำให้ความเป็นพิษลดลงทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่สามารถทนต่อสารพิษสามารถเพิ่มจำนวนและเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ (Adebusoye *et al.*, 2006; Ghazali *et al.*, 2004)

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นชี้ให้เห็นว่ากลุ่มเชื้อ SC9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงกว่าเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มเชื้อ SC9 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อที่คัดเลือกได้ในดินสภาพของเหลวเปียก

3.1 ผลของปริมาณดินต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปียก

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 ที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 2 มาทำการทดสอบการย่อยสลาย ULO 1% ในดินสภาพของเหลวเปียกโดยปรับให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7.0 log CFU/mL ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และมีการเติมดิน 0%, 5%, 10%, 15% และ 20% บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 12 พบว่า ชุดควบคุมมีการย่อยสลายเกิดขึ้นเล็กน้อยเนื่องจากเกิดการระเหยและเกิดการย่อยสลายทางกายภาพหรือทางเคมี (abiotic degradation) (Shabir *et al.*, 2007) ในระหว่างการฆ่าเชื้อ ส่วนในชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด คือ 50.5% รองลงมาคือชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมดิน (0%) ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO 40.0% อาจเป็นเพราะดินตัวอย่างที่เติมลงไปนั้นมีสารอาหารจำพวกไนโตรเจน (0.13%) และมีฟอสฟอรัส (0.054%) (Table 6) สารอาหารเหล่านี้จะถูกชะออกมาจากอนุภาคของดิน จุลินทรีย์จึงนำสารอาหารที่ถูกชะมาใช้ในการเจริญ (Ramirez *et al.*, 2001) ส่วนในชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 5%, 15% และ 20% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO เท่ากับ 22.3%, 17.1% และ 16.9% ตามลำดับ และในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 จะมีการอัตราการลดลงของ ULO คงที่แม้ว่าจะมีการเพิ่มความเข้มข้นของดินแสดงให้เห็นว่าการเกาะติด (sorption) ของ ULO กับอนุภาคของดินหรือสารอินทรีย์ในดินนั้นน้อยมาก (Figure 12)

การที่เติมดินลงไป 5% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมดิน (0%) นั้นอาจเป็นเพราะสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เกิดการเกาะติด (sorption) กับอนุภาคของดินหรือสารอินทรีย์ในดิน ทำให้กลุ่มเชื้อ SC9 ไม่สามารถนำสารอาหารมาใช้ในการเจริญและการย่อยสลายได้จึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO ต่ำ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดินเป็น 10% จะให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุดในการทดลองนี้อาจเป็นเพราะเกิดความสมดุลระหว่างสารอาหารและแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลายของกลุ่มเชื้อ SC9 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดินเป็น 15% และ 20% จะทำให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO ต่ำนั้นอาจเป็นเพราะเกิดการเกาะติด (sorption) ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบใน ULO กับอนุภาคของดิน (Okuda *et al.*, 2007) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้ ULO เป็นแหล่งคาร์บอนได้จึงมีการย่อยสลายเกิดขึ้นน้อย นอกจากนี้ในบางครั้งตัวเซลล์จุลินทรีย์เองก็อาจถูกดูดติด (adsorp) ไว้กับอนุภาคดินได้ด้วย (Bai *et al.*, 1997)

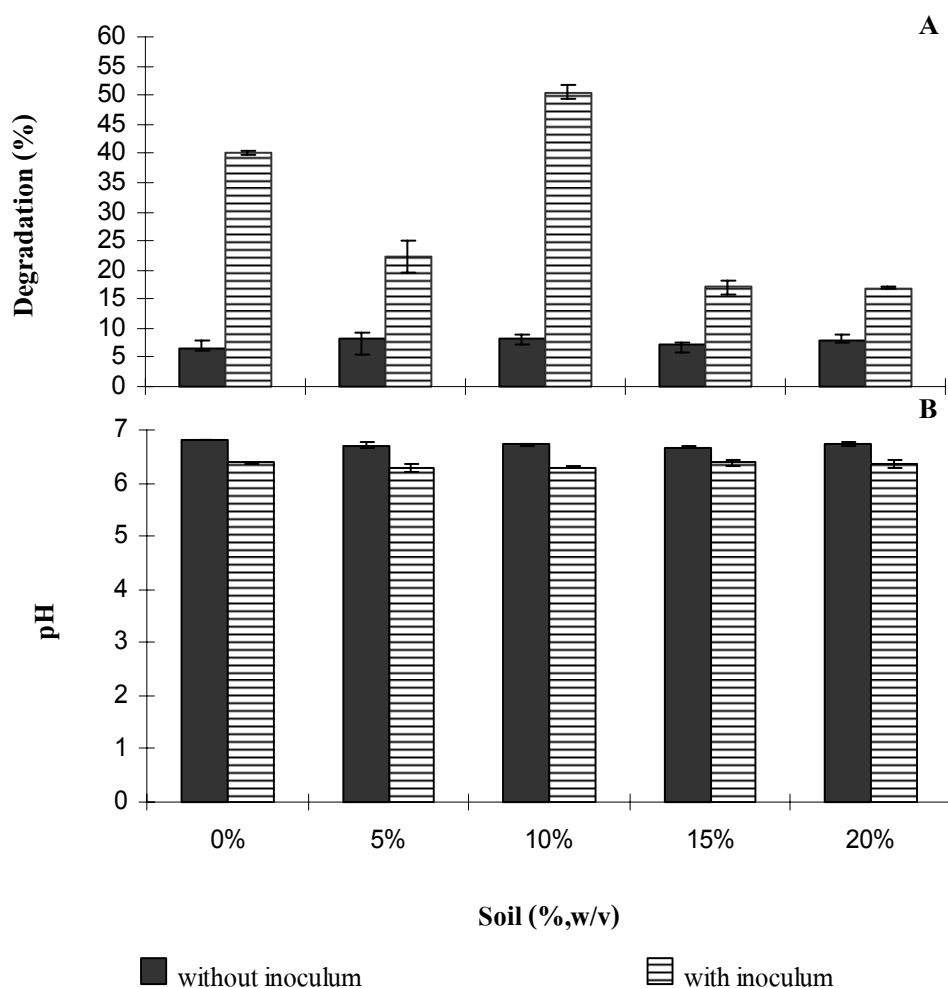


Figure 12. Effect of soil concentration on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM by SC9 consortia after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days. Bars represent the standard deviation from three determinations.

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดพบว่า ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการลดลงของ ULO ซึ่งชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $10.9 \log \text{ CFU/mL}$ รองลงมาคือชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมดินมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $10.2 \log \text{ CFU/mL}$ ดังแสดงใน Table 9 ซึ่งผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของทั้ง 2 ชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันนั้น อาจเป็นเพราะชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมดิน (0%) ลงไปนั้นกลุ่มเชื้อ SC9 สามารถนำสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ไปใช้ในการเจริญและย่อยสลาย ULO ได้ดี โดยที่สารอาหารและ ULO ไม่ถูกเกาะติดกับอนุภาคของดิน ส่วนใน

ชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% นั้นมีการเกาะติดของ ULO กับอนุภาคของดินมากกว่าการเกาะติดของสารอาหาร กลุ่มเชื้อ SC9 จึงสามารถใช้สารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM รวมทั้งสารอาหารที่มีอยู่ในดินในการเจริญได้ ทำให้ช่วยเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการเกาะจับกับ ULO ที่เกาะติดกับอนุภาคของดิน จึงไม่ส่งผลต่อการเจริญและการย่อยสลายและเมื่อพิจารณาถึงค่าพีเอชของดินในสภาพของเหลวเปียกพบว่า ค่าพีเอชของชุดควบคุมคือชุดที่ไม่มีการเติมดินและไม่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 มีค่าพีเอชคงที่เนื่องจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้น ในขณะที่ค่า พีเอชของชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 พีเอชมีค่าลดลงเนื่องจากการย่อยสลาย ULO โดยชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% ซึ่งมีการย่อยสลาย ULO สูงสุดมีการลดลงของค่าพีเอชมากที่สุดเช่นกันคือลดลงจาก 7.0 เป็น 6.5

Table 9. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the addition of soil in 50 mL MSM and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.

Soil (%)	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
0%	10.2±0.01
5%	9.9±0.01
10%	10.9±0.01
15%	9.6±0.01
20 %	9.4±0.01

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินสภาพของเหลวเปียกเป็นการเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และช่วยเพิ่มความสามารถในการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์เนื่องจากเมื่อมีดินอยู่ในระบบทำให้มีสารอาหารมากขึ้น อย่างไรก็ตามในบางกรณีความสามารถในการย่อยสลายก็อาจจะลดลงได้เนื่องจากอนุภาคดินอาจเกิดการดูดซับกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Okuda *et al.*, 2007) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินสภาพของเหลวเปียกโดยจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดิน ปริมาณสารอาหาร ปริมาณออกซิเจน และอัตราส่วนระหว่างดินและน้ำ (Li *et al.*, 2008b) Labare และ Alexander (1995) ศึกษาการบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ในดินสภาพของเหลวเปียกซึ่งมีอัตราส่วนของดินต่อน้ำ 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า สามารถส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลาย phenanthrene ได้ดีขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9% เนื่องจากน้ำจะช่วยเพิ่มพื้นที่

ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสดังกล่าวเกิดจากดินแตกตัว ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเคลื่อนไปยังวัฏภาคน้ำได้มากขึ้น รวมทั้งเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ด้วย (Doick and Semple, 2003) เช่นเดียวกับรายงานของ Fu และ Alexander (1995) ที่ทำการบำบัดสารประกอบ PAHs ในดินสภาพของเหลวเปือกด้วยอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสามารถเพิ่มการย่อยสลาย phenanthrene ได้

จากผลการศึกษาที่ชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกดินที่ความเข้มข้น 10% ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2 ผลของปริมาณเชื้อต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปือก

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $7.0 \log \text{ CFU/mL}$ ปริมาณต่างกัน คือ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% และ 25% และมี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน และเติมดิน 10% ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมื่อมีการเพิ่มเปอร์เซ็นต์เซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยของเชื้อสูงขึ้นความสามารถในการย่อยสลาย ULO จะเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยการใช้เซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอย 25% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุดคือ 58.4% อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่ 15%, 20% และ 25% ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (Figure 13)

Table 10. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the addition of various SC9 inoculum size in 50 mL MSM containing 10% soil and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.

Inoculum size (%)	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
0%	0
5%	9.2±0.10
10%	10.9±0.06
15%	11.1±0.03
20%	12.2±0.08
25%	12.7±0.03

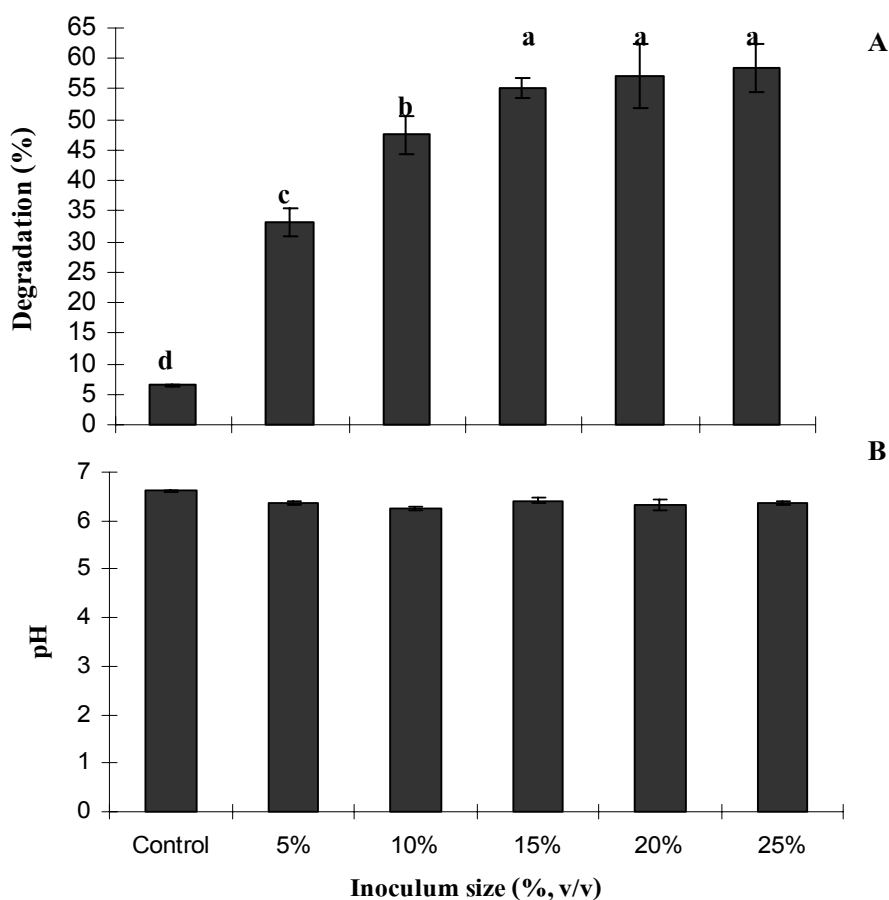


Figure 13. Effect of SC9 consortia inoculum size on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM containing 10% soil after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอย 25% มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดภายใน 7 วันที่ทำการทดลอง โดยมีจำนวนเชื้อเท่ากับ $12.7 \log \text{CFU/mL}$ รองลงมาคือชุดการทดลองที่มีการเติมเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอย 20% และ 15% มีจำนวนเชื้อเท่ากับ $12.2 \log \text{CFU/mL}$ และ $11.1 \log \text{CFU/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง ที่ 10 ซึ่งสอดคล้องกับผลการลดลงของ ULO และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ SC9 (Figure 13) การมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมากขึ้นจะมีผลทำให้การลดลงของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพิ่มมากขึ้นด้วย (Adebusoye *et al.*, 2006) เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้น (Regina *et al.*,

2006) Pathak และคณะ (2009) ศึกษาปริมาณเชื้อที่มีผลต่อการย่อยสลาย naphthalene ที่ปนเปื้อนในดิน โดยใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. HOB1 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อ *Pseudomonas* sp. HOB1 จะทำให้อัตราการย่อยสลาย naphthalene เพิ่มขึ้นด้วย โดยเมื่อใช้ปริมาณเชื้อต่ำสุดในการทดลองคือ 0.96 มิลลิลิตร ($A_{660\text{ nm}} = 1.0$) จะให้อัตราการย่อยสลายต่ำสุดเท่ากับ 63% ภายใน 24 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง และเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเป็น 2.3 มิลลิลิตร ($A_{660\text{ nm}} = 1.0$) จะให้อัตราการย่อยสลาย 100% ภายใน 24 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง

จากผลการศึกษานี้ชุดการทดลองที่มีการเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอย 15%, 20% และ 25% ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่ 15% ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปียก

เมื่อทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 แล้วเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $7.0 \log \text{CFU/mL}$ และมี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.5 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด คือ 59.3% รองลงมาคือชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO 58.9% อย่างไรก็ตามค่าการลดลงของ ULO ที่พีเอช 8.0 และ 8.5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (Figure 14) และเมื่อเพิ่มค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 9.0 และ 9.5 จะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO ลดลงเป็น 47.1% และ 34.7% ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Li และคณะ (2008b) ที่ศึกษาการย่อยสลาย hexachlorobutadiene (HCBD) โดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อน HCBD และตะกอนน้ำเสียจากบ่อน้ำบาดาลของโรงงานปิโตรเคมี พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายสารประกอบ HCBD ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 7 วัน ที่พีเอชเริ่มต้น 7.0, 7.5 และ 8.0 ส่วนการย่อยสลายสารประกอบ HCBD มีค่าลดลงที่พีเอช 6.0 และ 9.0 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 30.4% และ 54.4% ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Lee และคณะ (2008) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ cyclohexane ที่มีความแตกต่างของพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 4.7-8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลาย cyclohexane สูงที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 96.0% รองลงมาคือ ชุดที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 93.0% แต่อย่างไรก็ตามผลของของค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นจะขึ้นอยู่กับ

ชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วย Rahman และคณะ (2002) ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินในบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลประกอบด้วย *Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 และ *Pseudomonas* sp. DS10-129 โดยปรับพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีค่าเท่ากับ 6.5, 7.5 และ 8.5 ตามลำดับ พบว่า ที่พีเอช 7.5 จุลินทรีย์ผสม 5 สายพันธุ์ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 78% ภายในเวลา 20 วันที่ทำการทดลอง ส่วนที่พีเอช 8.5 จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Flavobacterium* sp. DS5-73 ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ 43% ภายในเวลา 20 วันที่ทำการทดลอง

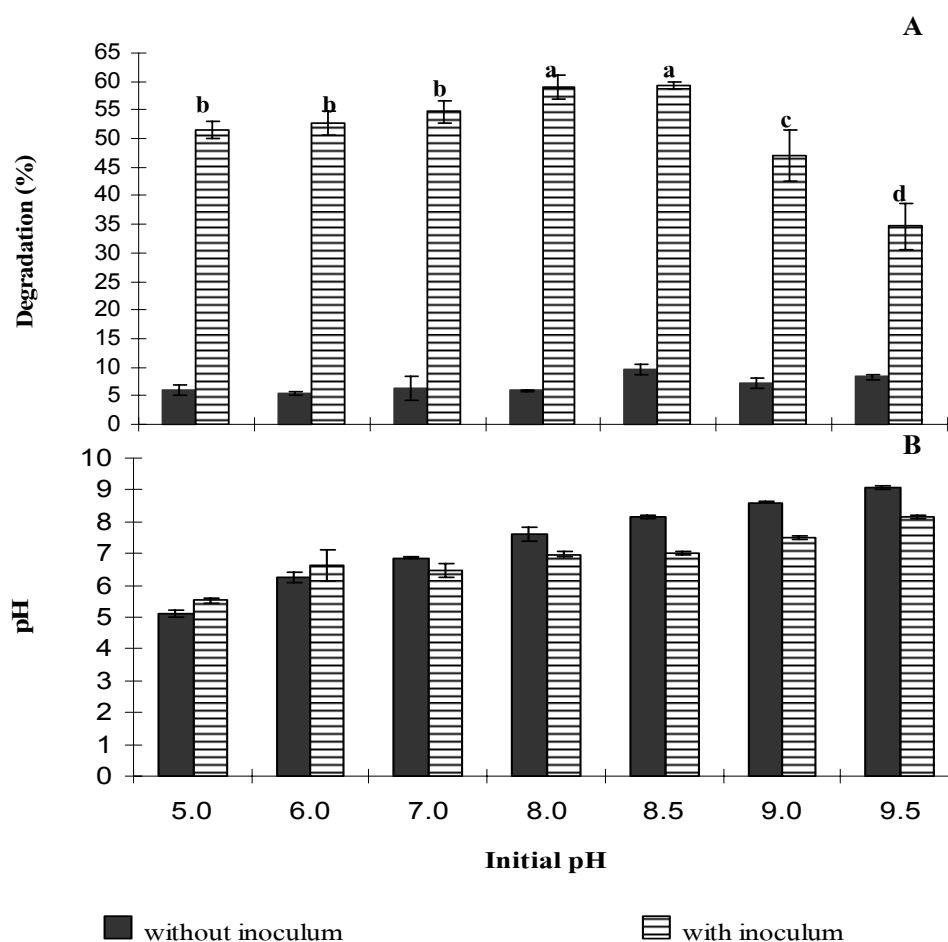


Figure 14. Effect of initial pH on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 11. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the various initial pHs in 50 mL MSM containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.

Initial pH	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
5.0	10.2±0.12
6.0	10.4±0.08
7.0	11.3±0.12
8.0	11.4±0.03
8.5	11.5±0.01
9.0	9.3±0.06
9.5	9.1±0.12

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุมการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.5 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.5 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และ 7.0 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.4×10^{11} log CFU/mL และ 11.3 log CFU/mL ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 11 และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่า ค่าพีเอชของชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และ 6.0 มีค่าเพิ่มขึ้น การที่พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นหลังการทดลองนั้นเป็นเพราะเกิดการปลดปล่อยสาร by-product ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในระหว่างการย่อยสลายจึงทำให้พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น (Rahman *et al.*, 2003b) ซึ่งแตกต่างกับค่าพีเอชของชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 มีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง (Figure 14) โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะชักนำให้เกิดการสร้างกรดอินทรีย์และสารตัวกลางชนิดอื่น ๆ ขึ้นเช่น aldehyde และ ketone เป็นต้น (Nwachukwu and Ugoji, 1995; Okpokwasili and James, 1995; Fritsche and Hofrichter, 2000) ดังนั้นกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าของพีเอชมีค่าลดลง (Obob *et al.*, 2006) ในทุกชุดการทดลอง โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนหรือเป็นกลาง (Dibble and Bartha, 1979; Abu and Dike, 2008) ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มเชื้อ SC9 จะมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแตกต่างกันดังรายงานของ Tao และคณะ (2007) ศึกษาผลของพีเอชต่อการย่อยสลาย phenanthrene ที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้ *Sphingomonas* sp. GY2B ในอาหาร

mineral salts medium ที่มี phenanthrene 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาความแตกต่างของพีเอชในช่วง 6.3-8.9 พบว่า *Sphingomonas* sp. GY2B สามารถเจริญได้ดีและสามารถย่อยสลาย phenanthrene ได้มากกว่า 90 % ในช่วงพีเอช 7.2-8.9 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจาก 2 วันที่ทำการทดลอง ส่วนที่พีเอชมีค่าเป็นกรดนั้น *Sphingomonas* sp. GY2B เจริญได้น้อยกว่าที่สภาวะพีเอชที่เป็นกลางหรือด่างอ่อนและให้อัตราการย่อยสลายต่ำกว่าด้วย หากสารละลายมีค่าพีเอชสูงหรือต่ำมากเกินไปอาจส่งผลต่อเซลล์จุลินทรีย์ เช่น ส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และค่าของซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) มีค่าเพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้โครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถปรับตัวให้ดำรงชีวิตในช่วงที่มีสภาพเป็นกรดหรือเป็นด่างสูงได้ (Baatout *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008b)

จากผลการศึกษานี้ชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 8.0 และ 8.5 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้น 8.0 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปียก

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 เดิมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในชุดการทดลองที่มีการเติม NH_4Cl หรือ NH_4NO_3 หรือ $(NH_4)_2SO_4$ หรือยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในแต่ละชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 100:10, 100:14, 100:8 และ 100:20 ตามลำดับ แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 8.0 แล้วเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $7.0 \log$ CFU/mL และมี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบของเหลวไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด คือ 65.2% รองลงมาคือ NH_4Cl , NH_4NO_3 และ ยูเรีย ที่มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO 60.6%, 57.2% และ 15.1% ตามลำดับ การย่อยสลายในชุดการทดลองที่เติมยูเรียมีการย่อยสลายต่ำที่สุดอาจจะมีผลมาจากค่าพีเอชที่เพิ่มสูงขึ้นและไม่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ (Figure 15) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zinjarde และ Pant (2002) ที่ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบ พบว่า $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ในน้ำมันดิบได้สูงถึง 78.0% การที่ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดอาจเป็นเพราะมีปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และอยู่ในรูปแบบที่จุลินทรีย์สามารถ

นำไปใช้ในการเจริญได้ง่าย ซึ่งการที่มีแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมนั้นสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ (Kwapisz *et al.*, 2008) อีกทั้ง $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ยังมีซัลเฟตซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่ดี (Newell *et al.*, 1995) และเป็นสารอาหารอีกชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเจริญของจุลินทรีย์ (Scelza *et al.*, 2007; Cameotra and Singh, 2008) สารอาหารถือเป็นส่วนสำคัญที่จะส่งเสริมให้การย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์ต้องการแหล่งไนโตรเจนเพื่อนำไปใช้ในการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิกซึ่งส่วนประกอบของเซลล์หรือสร้างพลังงานที่จำเป็นในการดำรงชีวิต (Trindade *et al.*, 2005; Shabir *et al.*, 2008)

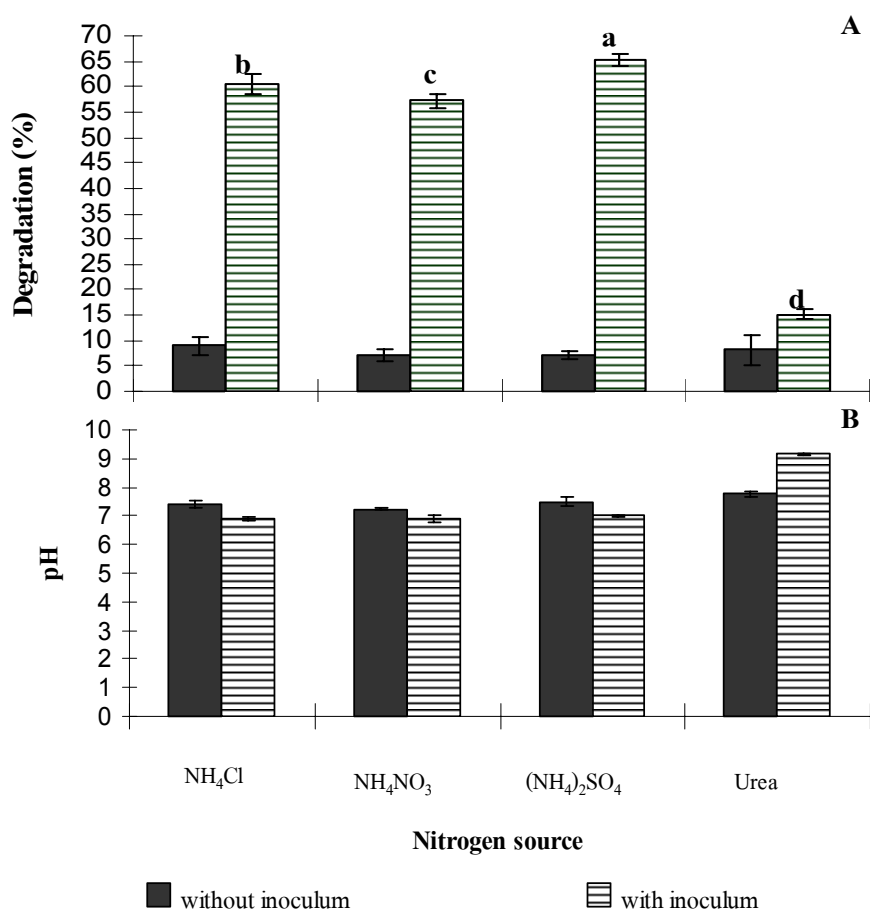


Figure 15. Effect of nitrogen source on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM with initial pH 8.0 containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุมการทดลองที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุด ใน 7 วันที่ทำการทดลอง มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.4 log CFU/mL รองลงมาคือ ชุมการทดลองที่มี NH_4Cl มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.2 log CFU/mL ดังแสดงใน Table 12 และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงในทุกชุมการทดลอง ยกเว้นชุมการทดลองที่เดิมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้นจากพีเอชเริ่มต้น 8.0 เป็น 9.2 หลังจาก 7 วันที่ทำการทดลอง (Figure 15) และชุมการทดลองที่เดิมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่น้อยที่สุดเท่ากับ 7.8 log CFU/mL ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงอาจเป็นเพราะสารละลายมีค่าพีเอชสูงมากเกินไป เนื่องจากยูเรียแตกตัวให้แอมโมเนียในปริมาณมาก มีความเป็นด่างสูงและเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนหรือเป็นกลาง (Abu and Dike, 2008)

Table 12. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the various nitrogen sources in 50 mL MSM with initial pH 8.0, containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.

Nitrogen source	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
NH_4Cl	11.2±0.15
NH_4NO_3	11.0±0.03
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	11.4±0.04
Urea	7.8±0.03

การเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันนั้น จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแตกต่างกันและยังขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจนอีกด้วย จะเห็นได้จากชุมการทดลองที่เดิมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่ำสุด นั่นอาจเป็นเพราะอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลาย ULO ของกลุ่มเชื้อ SC9 ที่มีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไป ส่วนในชุมการทดลองที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุมการทดลองอื่น ๆ (100:8) แต่เมื่อมีการเติมดินลงไป 10% ก็จะทำให้มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น เพราะในดินมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ 100:5 (Table 7) จึงทำให้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ในช่วงที่เหมาะสม

ต่อการเจริญและการย่อยสลาย ULO ของกลุ่มเชื้อ SC9 ส่วนในชุดการทดลองที่มี NH_4Cl และ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์อยู่แล้ว แต่เมื่อเพิ่มดินลงไป 10% ก็จะทำให้มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเช่นกันแต่ก็ยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สังเกตได้จากผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่มีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 ชุดการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามอัตราการย่อยสลายนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วย Barahona และคณะ (2004) ศึกษาผลของอัตราส่วนของ C:N ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น โดยใช้อัตราส่วนของ C:N เท่ากับ 100:10 และ 100:30 พบว่า ชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนของ C:N เท่ากับ 100:10 มีอัตราการลดลงของปริมาณน้ำมันดีเซล 67% หลังจาก 109 วันที่ทำการทดลอง

จากผลการศึกษาชุดการทดลองที่มีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือก $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองขั้นต่อไป

3.5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปี้ยว

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 กรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนแต่ละชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 100:0, 100:4, 100:8, 100:12 และ 100:16 ตามลำดับ แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 แล้วเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $7.0 \log \text{CFU/mL}$ และมี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบของเหลวลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด คือ 63.3% รองลงมาคือชุดการทดลองที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO 46.9% ดังแสดงใน Figure 16 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 6 และ 8 กรัมต่อลิตร พบว่า ความสามารถในการย่อยสลาย ULO ของกลุ่มเชื้อ SC9 ค่อย ๆ ลดลง โดยปกติการเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถทำได้โดยการเติมสารอาหารอนินทรีย์ เช่น ฟอสฟอรัสและไนโตรเจนลงไปเพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ โดยทั่วไปถึงแม้จะเติมในปริมาณที่มากเกินไปก็จะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Morgan and Watkinson, 1989) แต่มีรายงานการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูงประมาณ 4000 มิลลิกรัมของไนโตรเจนต่อกิโลกรัมของดิน (Genouw *et al.*, 1994)

และในบางครั้งการมีสารอาหารในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก็ส่งผลทำให้ อัตราการย่อยสลายน้อยลงเช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ควรหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลาย (Huang *et al.*, 2008)

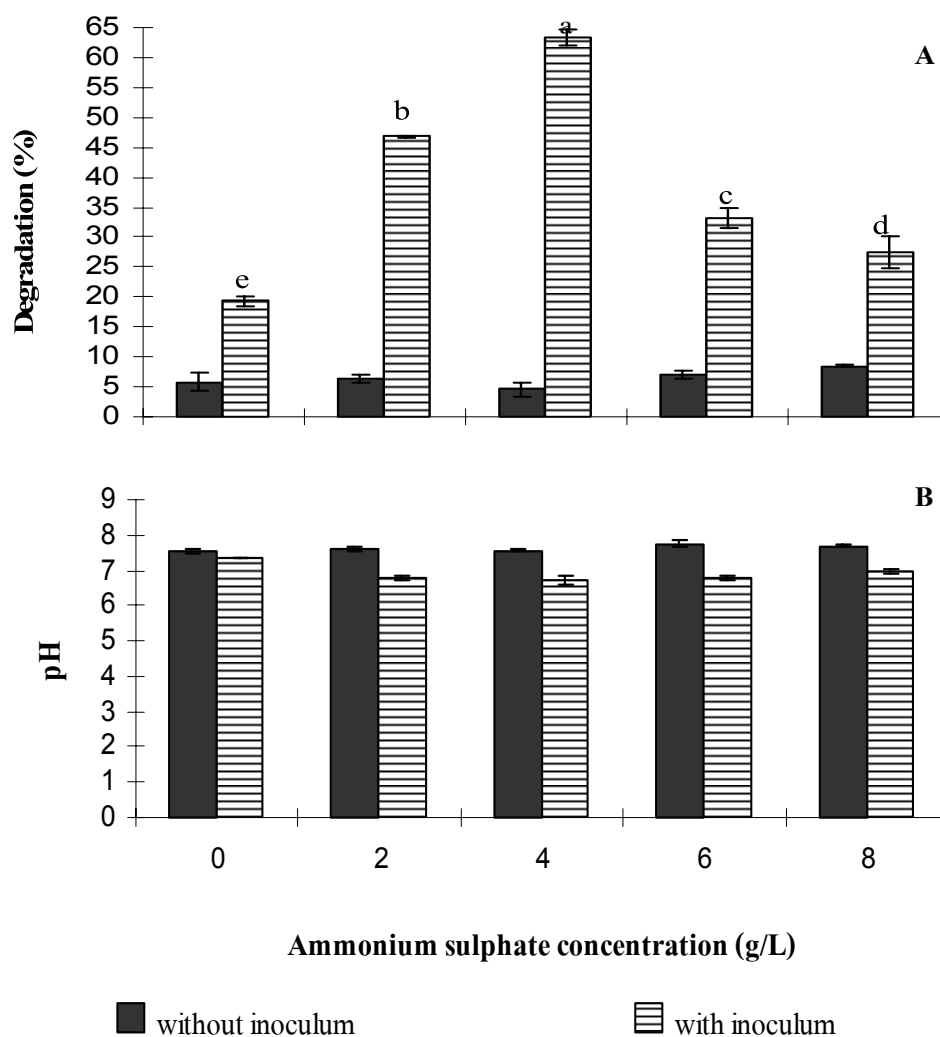


Figure 16. Effect of ammonium sulphate concentration on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM with initial pH 8.0 containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุดการทดลองที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง มีจำนวนเชื้อเท่ากับ $11.4 \log \text{ CFU/mL}$ รองลงมาคือชุดการทดลองที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเชื้อเท่ากับ $10.2 \log \text{ CFU/mL}$ ซึ่งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO ส่วนในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด คือ มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นประมาณ $7.0 \log \text{ CFU/mL}$ เป็น $8.2 \log \text{ CFU/mL}$ ดังแสดงใน Table 13 การที่ในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไป มีการย่อยสลาย ULO เกิดขึ้นนั้นเป็นเพราะในดินที่เติมลงไปนั้นมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ 100:5 (Table 7) สารอาหารเหล่านี้จึงถูกชะออกมาจากอนุภาคของดิน จุลินทรีย์จึงสามารถใช้สารอาหารเหล่านั้นในการเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดการย่อยสลายเกิดขึ้น (Ramirez *et al.*, 2001) และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง (Figure 16)

Table 13. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the various ammonium sulphate concentrations in 50 mL MSM with initial pH 8.0, containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.

Ammonium sulphate concentration (g/L)	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
0	8.2 ± 0.12
2	10.2 ± 0.06
4	11.4 ± 0.04
6	9.9 ± 0.03
8	9.6 ± 0.10

จากผลการศึกษาชุดการทดลองที่มีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือก $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองขั้นต่อไป

3.6 ผลของอัตราส่วนของแหล่งฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปียก

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 เดิมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และแหล่งฟอสฟอรัส คือ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 0:0, 0:1.2, 1.8:0, 0.9:1.2, 1.8:0.6 และ 1.8:1.2 (กรัมต่อลิตร) ซึ่งอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ของแต่ละชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 100:8:0, 100:8:2.8, 100:8:3.2, 100:8:4.4, 100:8:4.6 และ 100:8:6 ตามลำดับ แล้วปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของแต่ละชุดการทดลองให้เท่ากับ 8.0 เดิม ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแบบแขวนลอยลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มี K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 1.8:1.2 และ 1.8:0.6 (กรัมต่อลิตร) ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO เท่ากับ 62.6% และ 61.2% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่าการลดลงของ ULO ที่อัตราส่วน 1.8:1.2 และ 1.8:0.6 (กรัมต่อลิตร) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (Figure 17) ปริมาณของฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในแหล่งฟอสฟอรัสมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งฟอสฟอรัส โดย K_2HPO_4 มีปริมาณของฟอสฟอรัสมากกว่า KH_2PO_4 อยู่ 2 เท่า K_2HPO_4 จึงมีความสำคัญต่อการย่อยสลาย ULO มากกว่า K_2HPO_4 ดังนั้นการทดลองหากลดปริมาณของ K_2HPO_4 ลงจึงส่งผลให้อัตราการย่อยสลายลดลงด้วย

Table 14. Heterotrophic bacteria after 7 days of degradation of ULO (1%) with the 4 g/L ammonium sulphate and various potassium source ratio in 50 mL MSM with initial pH 8.0, containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.

Ratio of dipotassium hydrogenphosphate : potassium dihydrogenphosphate (g/L)	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
0:0	9.2±0.11
0:1.2	10.9±0.01
1.8:0	10.9±0.06
0.9:1.2	11.2±0.08
1.8:0.6	11.5±0.01
1.8:1.2	11.8±0.13

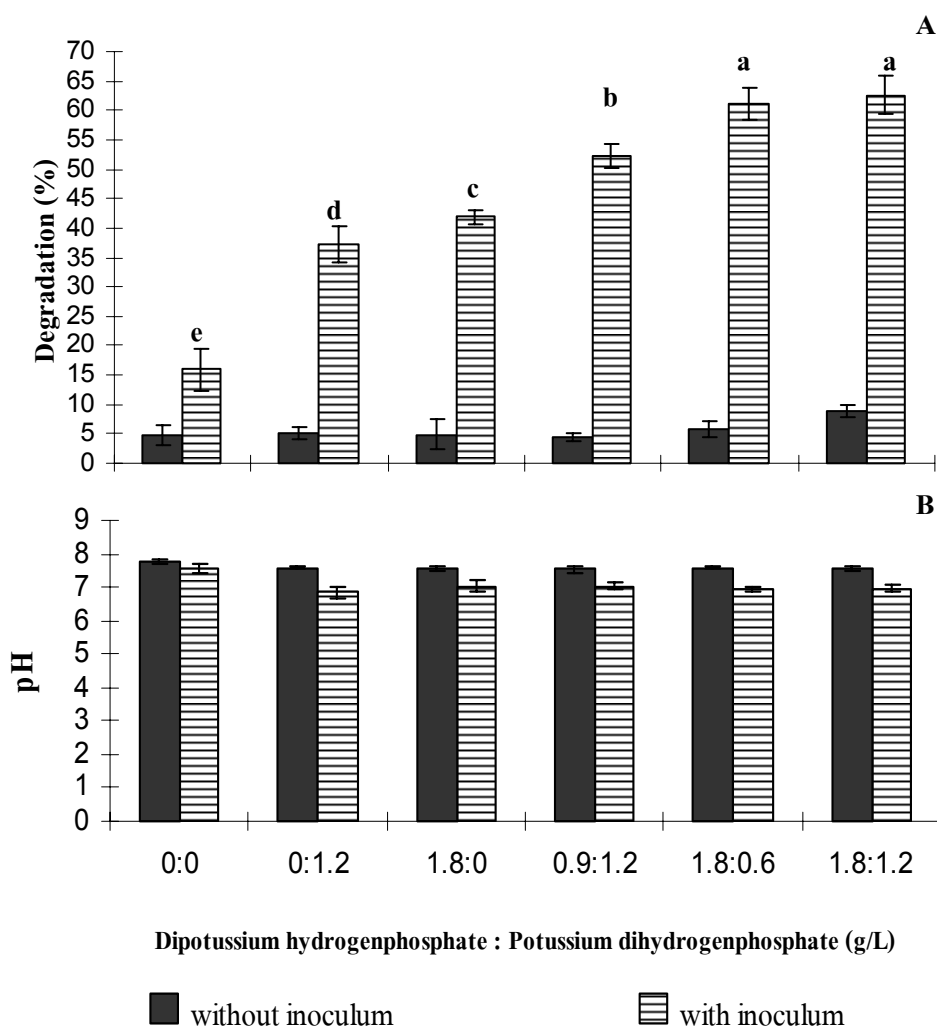


Figure 17. Effect of phosphorus source ratio on degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM with initial pH 8.0 containing 10% soil, 15% SC9 consortia inoculum size and 4g/L ammonium sulphate after incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดพบว่า ชุดการทดลองที่มี K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 อัตราส่วน 1.8:1.2 (กรัมต่อลิตร) มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดภายใน 7 วันที่ทำการทดลอง มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.8 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลองที่มี K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 อัตราส่วน 1.8:0.6 และ 0.9:1.2 (กรัมต่อลิตร) มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.5 log CFU/mL และ 11.2 log CFU/mL ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 14 การที่ชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งฟอสฟอรัส

(0%) มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากเริ่มต้นประมาณ 7.0 log CFU/mL เป็น 9.2 log CFU/mL และมีการย่อยสลาย ULO เกิดขึ้นนั้นเป็นเพราะในดินที่เติมลงไปมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เท่ากับ 100:5:2 (Table 7) ฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในดินที่เติมลงไปจึงถูกชะออกมาจากอนุภาคของดิน อีกทั้งยังมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM จุลินทรีย์จึงสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในการเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดการย่อยสลายเกิดขึ้น (Ramirez *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2008) และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง (Figure 17)

การที่มีปริมาณของแหล่งฟอสฟอรัสที่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นมีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพไม่น้อยไปกว่าแหล่งไนโตรเจน เพราะการที่มีแหล่งฟอสฟอรัสเพียงพอนั้นจะส่งเสริมให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) แล้วส่งผ่านออกมาภายนอกเซลล์หรืออยู่ภายในเซลล์จะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลาย โดยเอนไซม์ฟอสฟาเตสมีความสำคัญในกระบวนการลดความเป็นพิษ (detoxification) ในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Rosenberg and Alexander, 1979) ทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการเจริญได้ง่ายขึ้น ในทางตรงกันข้ามถ้ามีแหล่งฟอสฟอรัสไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เอนไซม์ฟอสฟาเตสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นก็จะมีปริมาณน้อยการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นน้อยด้วย เพราะว่าเอนไซม์ฟอสฟาเตสมีความสัมพันธ์กับปัจจัยการย่อยสลายทางชีวภาพปัจจัยอื่นด้วย เช่น จำนวนของจุลินทรีย์ อัตราการหายใจและมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ (Lee *et al.*, 2008) จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งฟอสฟอรัสจะทำให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO เพิ่มมากขึ้น แต่ในบางครั้งการเพิ่มปริมาณของฟอสฟอรัสมากเกินไปก็ไม่ได้ส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลาย เพราะจุลินทรีย์จะสะสมฟอสฟอรัสในรูปของ apatite และสารประกอบเชิงซ้อนแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) (Shabir *et al.*, 2007)

จากผลการศึกษาชุดการทดลองที่มีการเติม K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 อัตราส่วน 1.8:0.6 และ 0.9:1.2 (กรัมต่อลิตร) ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือก K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตรและ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตรไปใช้เป็นการทดลองขั้นต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย ULO โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในดิน สภาพของเหลวเปียกที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

เมื่อเติมดิน 10% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 กรัมต่อลิตร เติม K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร แล้วปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 เติม ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติม กลุ่มเชื้อ SC9 และสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ลงไปในดินสภาพของเหลวเปียก โดยแบ่งชุดการทดลอง ออกเป็น 8 ชุดการทดลอง ดังแสดงใน Table 6 แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิห้อง และทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 7 และ 30 พบว่า ชุดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อในชุด การทดลอง SS มีการลดลงของปริมาณสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบใน ULO (Figure 18) อาจเป็นเพราะเกิดปฏิกิริยา photo-oxidation และ/หรือ volatilization และ/หรือ evaporation (Perfumo *et al.*, 2007) ส่วนในชุดการทดลองที่ศึกษาผลของการย่อยสลาย สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เติมกลุ่มเชื้อ SC9 (SS+SCI) และชุดการทดลองที่เติมกลุ่มเชื้อ SC9 และสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (SS+SCI+CB) พบว่า สามารถย่อยสลาย สารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ 70.8% และ 80.2% หลังจาก 30 วันทำการทดลอง ตามลำดับ ซึ่ง การเติมสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปทำงานร่วมกับกลุ่มเชื้อ SC9 นั้นช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของกลุ่มเชื้อ SC9

ส่วนในชุดทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะศึกษาผลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นต่อการ ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบใน ULO ผลการย่อยสลายสารประกอบ ไฮโดรคาร์บอนระหว่างจุลินทรีย์ประจำถิ่นและกลุ่มเชื้อ SC9 ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น และผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพร่วมกับจุลินทรีย์ ประจำถิ่นและกลุ่มเชื้อ SC9 เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ชุดการทดลอง NSS ที่ไม่ผ่าน การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นมีความสามารถในการย่อยสลาย ULO ได้ โดยให้เปอร์เซ็นต์การ ลดลงของ ULO เท่ากับ 21.1% ซึ่งจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนของสารประกอบ ไฮโดรคาร์บอนนั้นสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้แต่การย่อยสลายจะเกิดขึ้นได้ น้อย เนื่องจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่ในดินเพียงอย่างเดียวมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการย่อยสลาย (Margesin *et al.*, 2000) ส่วนในชุดการทดลองที่ศึกษาผลของการย่อยสลายสารประกอบ ไฮโดรคาร์บอนระหว่างจุลินทรีย์ประจำถิ่นและกลุ่มเชื้อ SC9 (NSS+SCI) หลังจากการทดลองเป็น เวลา 30 วัน พบว่า กลุ่มเชื้อ SC9 สามารถทำงานร่วมกันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในการย่อยสลาย

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบใน ULO ได้ โดยให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO เท่ากับ 62.0% ซึ่งการที่เดิมเชื้อจากแหล่งอื่นลงไปทำงานร่วมกับเชื้อประจำถิ่นนั้นไม่ได้เพิ่มการย่อยสลาย ULO เนื่องจากเกิดการแข่งขันกันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นและเชื้อที่เติมลงไป (Yu *et al.*, 2005) แต่อย่างไรก็ตามในบางการทดลองการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไปทำงานร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นก็สามารถส่งเสริมการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ (Cubitto *et al.*, 2004) ผลของการเติมสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (NSS+CB) หลังจากการทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ความสามารถในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเพิ่มสูงขึ้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO เท่ากับ 43.7% เพราะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้วที่เป็นองค์ประกอบใน ULO จึงส่งเสริมให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นสามารถย่อย ULO ได้เพิ่มสูงขึ้น (Banat, 1995) และผลของการเติมสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพร่วมกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นและกลุ่มเชื้อ SC9 (NSS+SCI+CB) หลังจากการทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุดเท่ากับ 88.6% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ส่งเสริมการย่อยสลาย ULO ของจุลินทรีย์ประจำถิ่นและกลุ่มเชื้อ SC9 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานของ Cameotra และ Singh (2008) ที่ศึกษาการย่อยสลายกากตะกอนน้ำมันดิบโดยใช้สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มี ramnolipid เป็นองค์ประกอบที่ผลิตจากกลุ่มเชื้อที่ประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Rhodococcus* sp. พบว่า ในชุดการทดลองที่เติมกากตะกอนน้ำมันดิบจากแหล่ง Ratnagiri ประเทศอินเดีย ร่วมกับกลุ่มเชื้อ SSC2 และเติมสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้อัตราการย่อยสลายสูงสุดประมาณ 95% หลังจาก 5 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่เติมกากตะกอนน้ำมันร่วมกับกลุ่มเชื้อ SSC2 และชุดทดลองที่เติมกากตะกอนน้ำมันร่วมกับสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าให้อัตราการย่อยสลายประมาณ 91.0% และ 63.0% หลังจาก 4 สัปดาห์ และ 5 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง ตามลำดับ และยังศึกษาการย่อยสลายกากตะกอนน้ำมันดิบจาก Indian Oil Corporation Limited, Faridabad ประเทศอินเดีย ร่วมกับกลุ่มเชื้อ SSC2 และเติมสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้อัตราการย่อยสลายสูงสุดประมาณ 75.0% หลังจาก 8 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง ส่วนชุดที่เติมกากตะกอนน้ำมันร่วมกับกลุ่มเชื้อ SSC2 และชุดที่เติมกากตะกอนน้ำมันดิบร่วมกับสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าให้อัตราการย่อยสลายประมาณ 52.0% และ 25.0% ตามลำดับ หลังจาก 8 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง ซึ่งอัตราการย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมัน (Zinjarde and Pant, 2002) และชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ด้วย (Ron and Rosenberg, 2002)

ค่าพีเอชของชุดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อทุกชุดการทดลอง มีค่าพีเอชประมาณ 6.9 และค่าพีเอชของชุดทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อทุกชุดการทดลองมีค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วง 5.5-5.6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการย่อยสลาย ULO และยิ่งเวลาการย่อยสลายนานขึ้นจาก 7 วันเป็น 30 วัน พีเอชก็ยิ่งลดลงมากขึ้น (Figure 18)

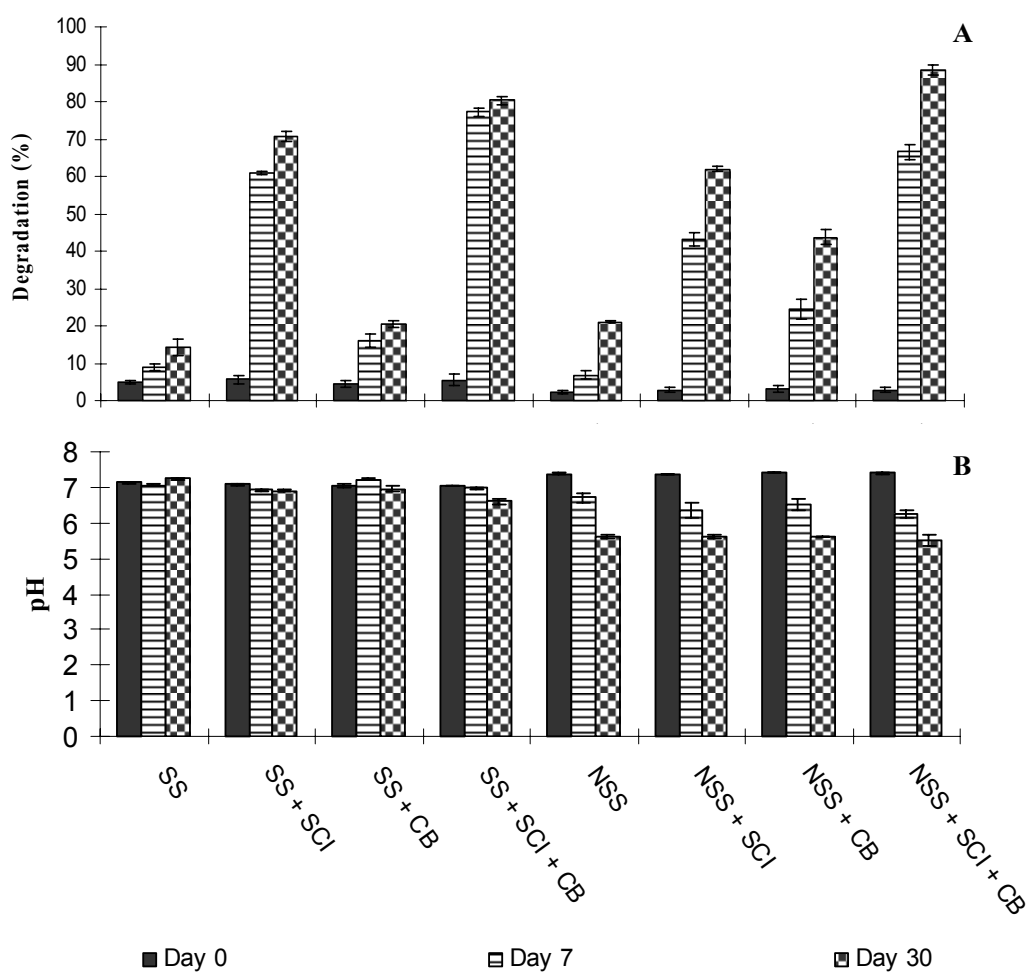


Figure 18. Effect of crude biosurfactant produced from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7 on the degradation of ULO (1%) (A) and pH changes (B) in 50 mL MSM with initial pH 8.0 containing 10% soil, 15% SC9 consortia inoculum size, 4 g/L ammonium sulphate, 1.8 g/L dipotassium hydrogenphosphate and 0.6 g/L potassium dihydrogenphosphate in sterilized and non-sterilized conditions after incubated at room temperature, 200 rpm for 0, 7 and 30 days. Bars represent the standard deviation from three determinations.

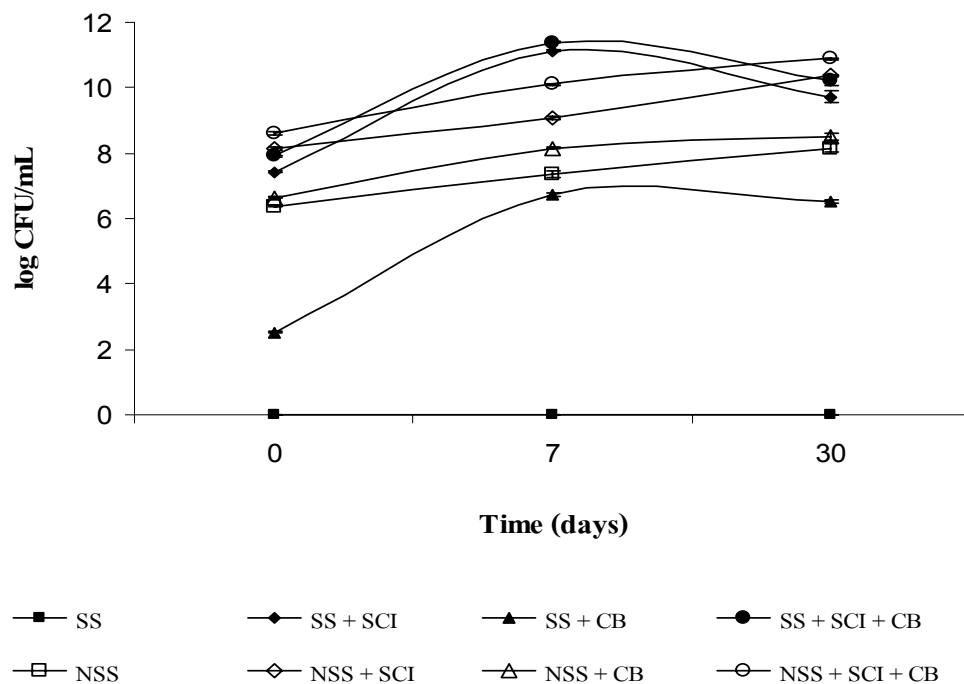


Figure 19. Heterotrophic bacteria after 30 days of degradation of ULO (1%) with the 4 g/L ammonium sulphate, 1.8 g/L dipotassium hydrogenphosphate and 0.6 g/L potassium dihydrogenphosphate in 50 mL MSM with initial pH 8.0, containing 10% soil and 15% SC9 consortia inoculum size and incubated at room temperature, 200 rpm for 7 days.

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุดการทดลอง SS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่มีเชื้อเจริญตลอดการทดลอง ส่วนชุดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีการเติมสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (SS+CB) เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 และมีจำนวนคงที่จนถึงวันที่ 30 อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่มีการฆ่าเชื้อจึงมีเชื้อปนเปื้อนอยู่ด้วย ส่วนชุดการทดลองที่เติมกลุ่มเชื้อ SC9 (SS+SCI) มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นจากประมาณ 7.0 log CFU/mL ในวันที่ 0 เป็น 11.1 log CFU/mL ในวันที่ 7 แต่เมื่อบ่มนานขึ้นจนถึงวันที่ 30 จำนวนเชื้อลดลงเหลือ 9.7 log CFU/mL ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 และสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (SS+SCI+CB) อาจเป็นเพราะสารอาหารที่มีอยู่ในชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีอยู่อย่างจำกัดเนื่องจากสารอาหารบางส่วนอาจถูกทำลายในระหว่างการฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิสูง แต่อย่างไรก็ตามในชุดการทดลองที่

เดิมทั้งกลุ่มเชื้อ SC9 และสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีจำนวนเชื้อมากที่สุดในชุดการทดลองที่มีการฆ่าเชื้อ (Figure 19)

ชุดการทดลองที่เดิมกลุ่มเชื้อ SC9, สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (NSS+SCI+CB) มีการเจริญของเชื้อสูงที่สุด โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10.9 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลอง ที่เดิมกลุ่มเชื้อ SC9 และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (NSS+SCI) มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10.4 log CFU/mL (Figure 19)

การเจริญของจุลินทรีย์ในกรณีที่มีสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น การปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญต่ออัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั้งในดินและแหล่งน้ำ ซึ่งจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถมีชีวิตอยู่และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Ramos *et al.*, 1991; Rahman *et al.*, 2003b) กลุ่มเชื้อ SC9 เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาจากดินที่ปนเปื้อน ULO จึงสามารถเจริญและใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบใน ULO เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ดีกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่ในดินที่ไม่มีการปนเปื้อน ULO ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการเพิ่มจำนวนของกลุ่มเชื้อ SC9 ในชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อ (SS+SCI) เปรียบเทียบกับการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในชุดการทดลองที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ (NSS) ดังนั้นหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในพื้นที่ที่ไม่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาก่อนนั้นจำเป็นต้องมีการเติมเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนลงไปช่วยเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ประจำถิ่น ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายจะช่วยย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีองค์ประกอบซับซ้อนหรือลดความเป็นพิษของสารที่ปนเปื้อนลง จุลินทรีย์ประจำถิ่นจึงสามารถเพิ่มจำนวนและสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ (Cunha and Leite, 2000)

การที่เดิมกลุ่มเชื้อ SC9 และสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ร่วมกันในชุด SS+SCI+CB และ NSS+SCI+CB แล้วให้ผลการย่อยสลายที่ดีกว่าการเติมเพียงตัวใดตัวหนึ่งนั้น อาจเป็นเพราะการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในดินสภาพของเหลวเปียกช่วยเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ประจำถิ่น และกลุ่มเชื้อ SC9 ในการย่อยสลาย ULO โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เติมลงไปนั้นจะเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทำให้เกิดความสมดุลระหว่างแหล่งคาร์บอนและปริมาณสารอาหาร จึงช่วยเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Perfumo *et al.*, 2007) Schipper และคณะ (2000) รายงานว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวจะช่วยเพิ่ม

ความสามารถในการใช้ได้ (bioavailability) ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะละลายอยู่ตรงกึ่งกลางของไมเซลล์ จากนั้นจะเกิดการเคลื่อนที่ของไมเซลล์ไปยังวัฏภาคน้ำอย่างรวดเร็ว สารลดแรงตึงผิวจะไปเพิ่มการขนส่งโมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไปยังวัฏภาคน้ำทำให้แบคทีเรียสามารถนำไฮโดรคาร์บอนไปใช้ได้ โดยแบคทีเรียจะใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในวัฏภาคน้ำหลังจากที่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนถูกปล่อยออกมาจากไมเซลล์ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวอาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผนังเซลล์ของแบคทีเรียให้มีสภาพไม่ชอบน้ำ ดังนั้นเซลล์แบคทีเรียจึงสามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้โดยตรง

เมื่อนำ ULO ที่ได้จากการสกัดในวันที่ 0, 7 และ 30 มาวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของ ULO ด้วย TLC-FID พบว่า ชุดการทดลอง NSS+SCI+CB ที่เดิมกลุ่มเชื้อ SC9 ร่วมกับสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีปริมาณสาร aromatic hydrocarbon I และ aromatic hydrocarbon II ลดลง 100% และ 2.4% ตามลำดับ ในวันที่ 30 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ดังแสดงใน Figure 23 รองลงมาคือชุดการทดลอง SS+SCI+CB ชุดการทดลอง ที่เดิมกลุ่มเชื้อ SC9 ร่วมกับสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและผ่านการฆ่าเชื้อมีปริมาณสาร aromatic hydrocarbon I ลดลงคิดเป็น 100% อย่างไรก็ตามสาร aromatic hydrocarbon II มีปริมาณเพิ่มขึ้น 18.8% ในวันที่ 30 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ดังแสดงใน Figure 21 และในวันที่ 30 ของการทดลองมีสารประกอบอื่นเกิดขึ้นนอกเหนือจากสาร aromatic hydrocarbon I และ aromatic hydrocarbon II อาจเป็นเพราะเกิดการสะสมของสารตัวกลาง (intermediate) เกิดขึ้นในการย่อยสลายทางชีวภาพนั้น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะถูกย่อยสลายเป็นสารตัวกลาง หลังจากนั้นจะเกิดการสะสมของสารตัวกลางก่อนที่จะเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralisation) โดยจูลินทรีย์ (Collina *et al.*, 2005)

ชุดการทดลองควบคุมทั้ง 2 ชุดคือ ชุดการทดลอง SS และ NSS ที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อตามลำดับ มีปริมาณของสาร aromatic hydrocarbon I ลดลงแต่มีปริมาณของสาร aromatic hydrocarbon II เพิ่มขึ้นมากเป็น 226.6% และ 215.9% ตามลำดับ ในวันที่ 30 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 Figure 20, 22 ซึ่งการเพิ่มขึ้นของสาร aromatic hydrocarbon II อาจเกิดการเปลี่ยนรูป (biotransformations) เป็นสารตัวกลาง (intermediate) แต่ยังมีโครงสร้างคล้ายกับสารในกลุ่ม aromatic hydrocarbon II จึงทำให้ปริมาณของสารในกลุ่มนี้เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจูลินทรีย์สามารถใช้สารตัวกลางที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปเป็น co-substrate (second substrate) ในการเจริญ แต่ในบางครั้งจูลินทรีย์ชนิดเดียวอาจไม่สามารถใช้สาร co-substrate ได้จึงจำเป็นต้องใช้จูลินทรีย์หลายชนิดในการย่อยสลาย (Fritsche and Hofrichter, 2000)

การย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปือกในชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu* SM7 และไม่ฆ่าเชื้อให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO มากกว่าการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปือกโดยใช้เชื้อประจำถิ่นและส่งเสริมการย่อยสลายด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ *Issatchenkia orientalis* SR4 พบว่า สารสกัดยับยั้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ช่วยส่งเสริมการย่อยสลาย ULO โดยทำให้สารประกอบ aromatic hydrocarbon ที่เป็นองค์ประกอบของ ULO ลดลง 20.0% ใน 30 วันทำการทดลอง (Katemai, 2008) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการใช้ rhamnolipid ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* UG2 ส่งเสริมการย่อยสลายสารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbons และ polychlorinated biphenyls (PCBs) ในดินสภาพของเหลวเปือก (Scheibenbogen *et al.*, 1994)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของ ULO ด้วยเครื่อง TLC-FID นั้นมีข้อจำกัดคือวิเคราะห์ได้เพียงกลุ่มขององค์ประกอบของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น alkane, aromatic, resins และ asphaltene ซึ่ง ULO มีองค์ประกอบเป็น aromatic hydrocarbon I และ aromatic hydrocarbon II เมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC-FID ส่วนเครื่อง GC-MS นั้นสามารถวิเคราะห์ถึงรายละเอียดของแต่ละ องค์ประกอบของ ULO ได้ ดังนั้นจึงนำตัวอย่างในชุดการทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 และสารสกัดยับยั้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (SS + SCI + CB) และชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 และสารสกัดยับยั้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (NSS + SCI + CB) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (SS) และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (NSS) ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า องค์ประกอบใน ULO เริ่มต้นที่วันที่ 0 ของชุดการทดลอง SS และ SS + SCI + CB มีองค์ประกอบของสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ที่ C_{11} - C_{29} และ C_{11} - C_{22} ตามลำดับ (Figure 24A, 24C) เมื่อทำการทดลองผ่านไป 30 วัน ชุดการทดลอง SS + SCI + CB สามารถตรวจพบ dimethyl naphthalene แต่ในชุดการทดลอง SS สามารถตรวจพบ m-p'-bitolyl (Figure 24B, 24D)

องค์ประกอบใน ULO ที่วันที่ 0 ของชุดการทดลอง NSS มีองค์ประกอบของสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ที่ C_{15} - C_{26} และสารประกอบ aromatic hydrocarbon ชนิด xylene และ benzene และเมื่อทำการทดลองผ่านไป 30 วันไม่สามารถระบุสารประกอบได้ (Figure 25A, 25B) และองค์ประกอบใน ULO เริ่มต้นที่วันที่ 0 ของชุดการทดลอง NSS + SCI + CB มีองค์ประกอบของสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ที่ C_{16} - C_{21} และสารประกอบ aromatic hydrocarbon ชนิด xylene, benzene และ naphthalene (Figure 25A, 25B) และเมื่อทำการทดลองผ่านไป 30 วัน พบว่า ไม่พบองค์ประกอบใน ULO ชนิดอื่น ๆ ยกเว้น n-hexadecane (C_{16}) ซึ่งเป็น

n-paraffins สายโซ่ยาว (Figure 25C, 25D) การที่พบเฉพาะ *n*-hexadecane ในวันที่ 30 ของการทดลองนั้นอาจเป็นเพราะเกิดการย่อยสลายไม่สมบูรณ์ของ *n*-paraffins สายโซ่ยาวชนิดอื่น ๆ ทำให้เหลือ *n*-hexadecane (Fritsche and Hofrichter, 2000)

การที่ในชุดการทดลองที่มีการฆ่าเชื้อมีองค์ประกอบของสารประกอบ aliphatic hydrocarbon มีสายโซ่สั้นกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการฆ่าเชื่อนั้นอาจเป็นเพราะในการใช้ความร้อนจากการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) ความร้อนและความดันจากการฆ่าเชื้อทำให้สารประกอบ aliphatic hydrocarbon ที่มีสายโซ่ยาวเกิดการสลายตัวเป็นสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ที่มีสายโซ่สั้นกว่าได้ (Kim *et al.*, 2003a) และการที่ไม่พบสารประกอบ aromatic hydrocarbon ในชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อ แต่ตรวจพบในชุดการทดลองที่ไม่ฆ่าเชื่อนั้นเป็นเพราะ ULO มีองค์ประกอบของสารประกอบ aromatic hydrocarbon ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น xylene, benzene และ naphthalene ซึ่งสังเกตได้ในชุดการทดลองที่ไม่ฆ่าเชื้อในวันที่ 0 สารประกอบดังกล่าวสามารถเกิดการระเหยได้เมื่อถูกความดันและความร้อนที่อุณหภูมิสูง (Perfumo *et al.*, 2007) หรืออาจเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายและใช้ในการเจริญ ดังนั้นจึงมีการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้ xylene, benzene และ naphthalene เป็นแหล่งคาร์บอนแทน ULO จากการทดลองพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ xylene, benzene และ naphthalene เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารประกอบ aromatic hydrocarbon ส่วนหนึ่งถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ (Table 15) และบางส่วนเกิดปฏิกิริยา photo-oxidation และ/หรือ volatilization และ/หรือ evaporation ในระหว่างการทดลอง (Perfumo *et al.*, 2007) การย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปียกในชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 และไม่ฆ่าเชื้อให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO สูงกว่าการย่อยสลาย ULO ในชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 และฆ่าเชื้อ รวมทั้งชุดควบคุม เพราะสามารถย่อยสลายได้ทั้งสารประกอบ aliphatic hydrocarbon และสารประกอบ aromatic hydrocarbon ส่วนในชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 และฆ่าเชื้อย่อยสลายได้เพียงแค่สารประกอบ aliphatic hydrocarbon เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Katemai (2008) ที่ศึกษาการย่อยสลาย ULO ในดินสภาพของเหลวเปียกที่ไม่ฆ่าเชื้อและส่งเสริมการย่อยสลายด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ *Issatchenkia orientalis* SR4 พบว่า สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ช่วยส่งเสริมการย่อยสลาย ULO โดยทำให้องค์ประกอบของ ULO ในวันที่ 0 ซึ่งมีองค์ประกอบของสารประกอบ

aliphatic hydrocarbon ตั้งแต่ C_{12} - C_{29} เหลือเพียงแค่ C_{12} , C_{16} , C_{17} , C_{20} , C_{22} , C_{24} และ C_{26} ในวันที่ 30 ของการทดลอง

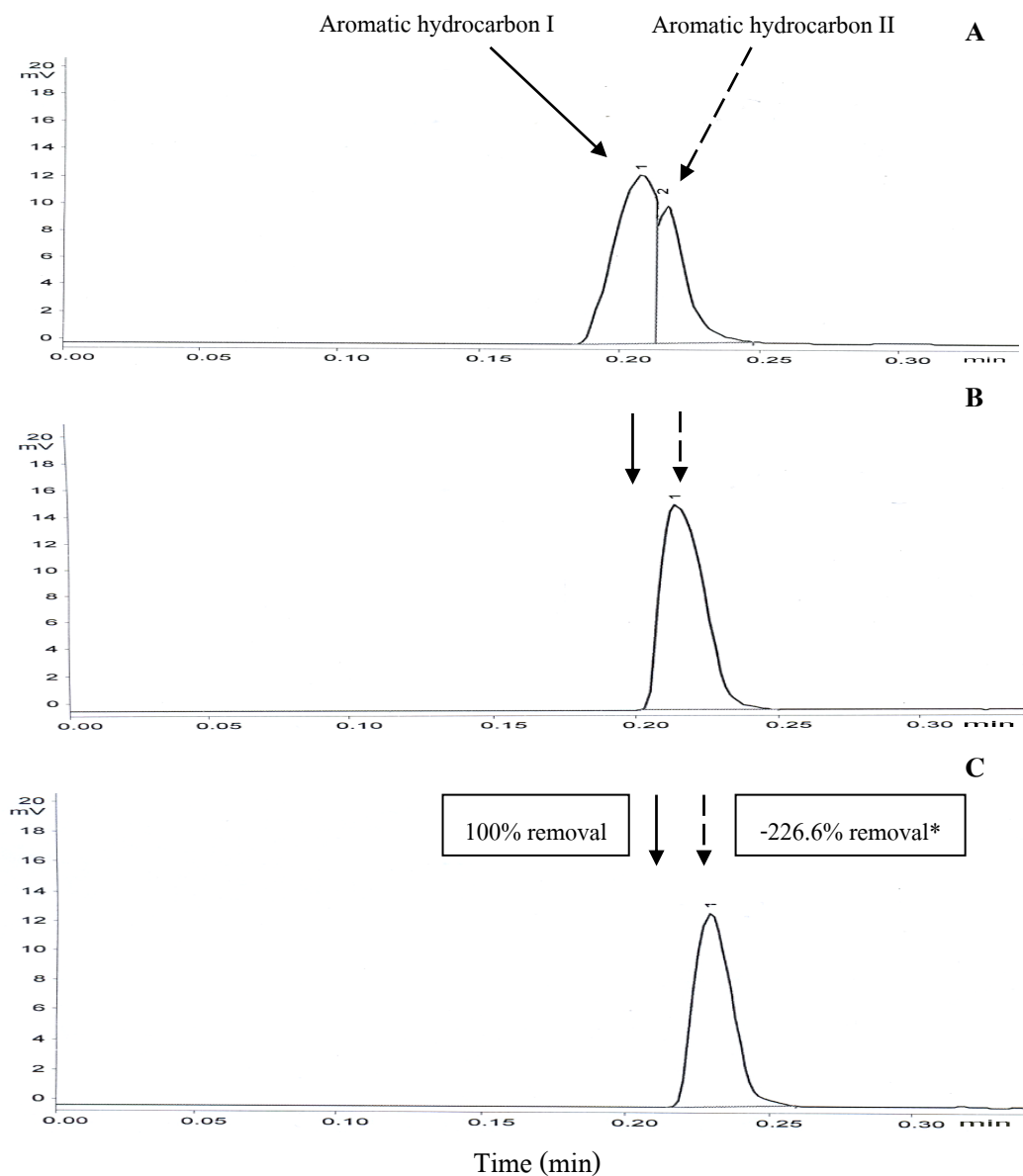


Figure 20. TLC-FID chromatogram of ULO extracted from ULO (1%) contaminated soil slurry sterilization and incubated at room temperature, 200 rpm for 30 days.

A = 0 day of cultivation B = 7 days of cultivation C = 30 days of cultivation

Note: Aromatic hydrocarbon I (RT=0.210±0.004) and Aromatic hydrocarbon II (RT=0.220±0.006) was analyzed by TLC-FID.

* Minus value means amount is increased.

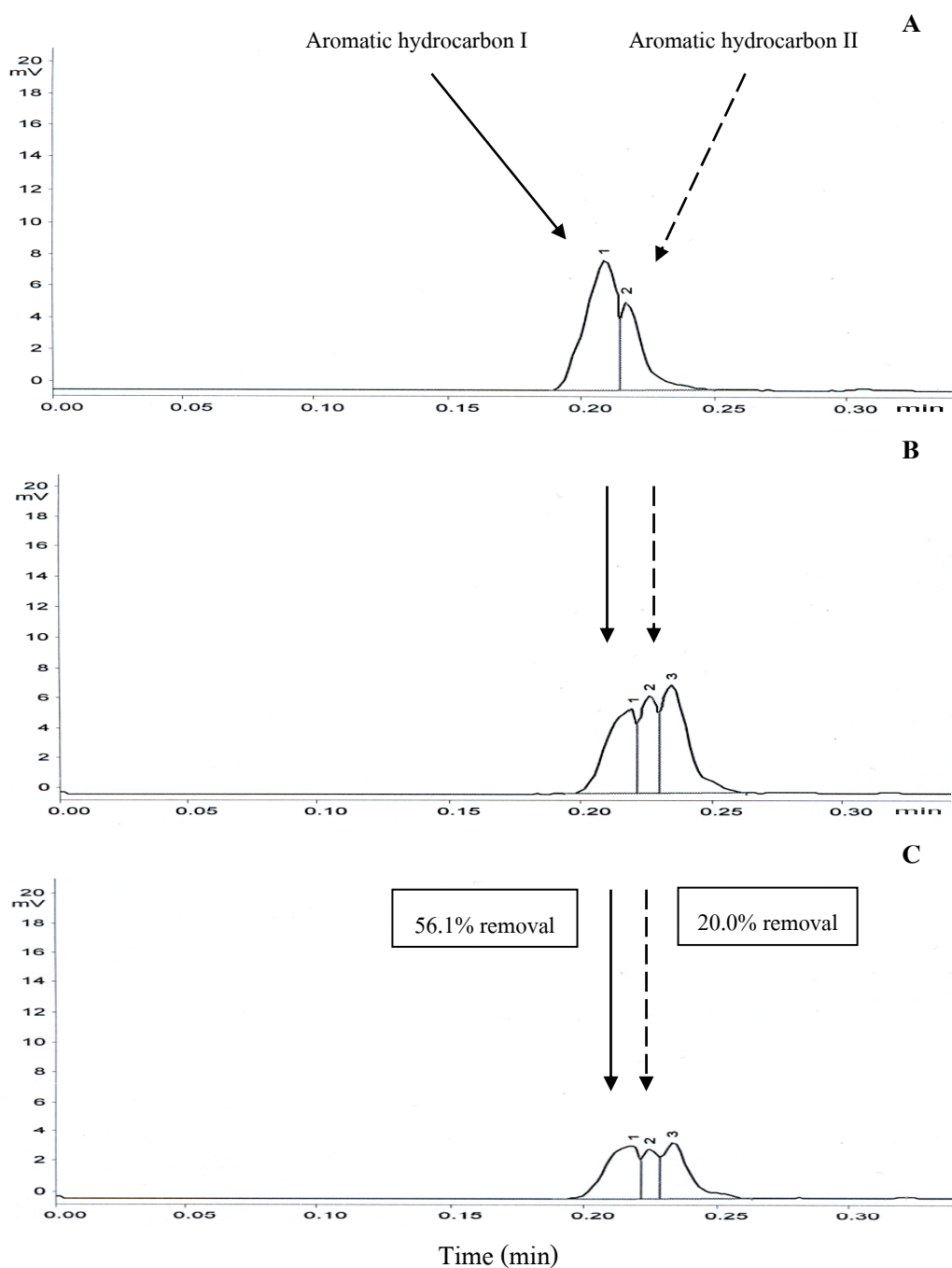


Figure 21. TLC-FID chromatogram of ULO extracted from ULO (1%) contaminated soil slurry sterilization supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant and incubated at room temperature, 200 rpm for 30 days.

A = 0 day of cultivation B = 7 days of cultivation C = 30 days of cultivation

Note: Aromatic hydrocarbon I (RT=0.208±0.001) and Aromatic hydrocarbon II (RT=0.217±0.002) was analyzed by TLC-FID.

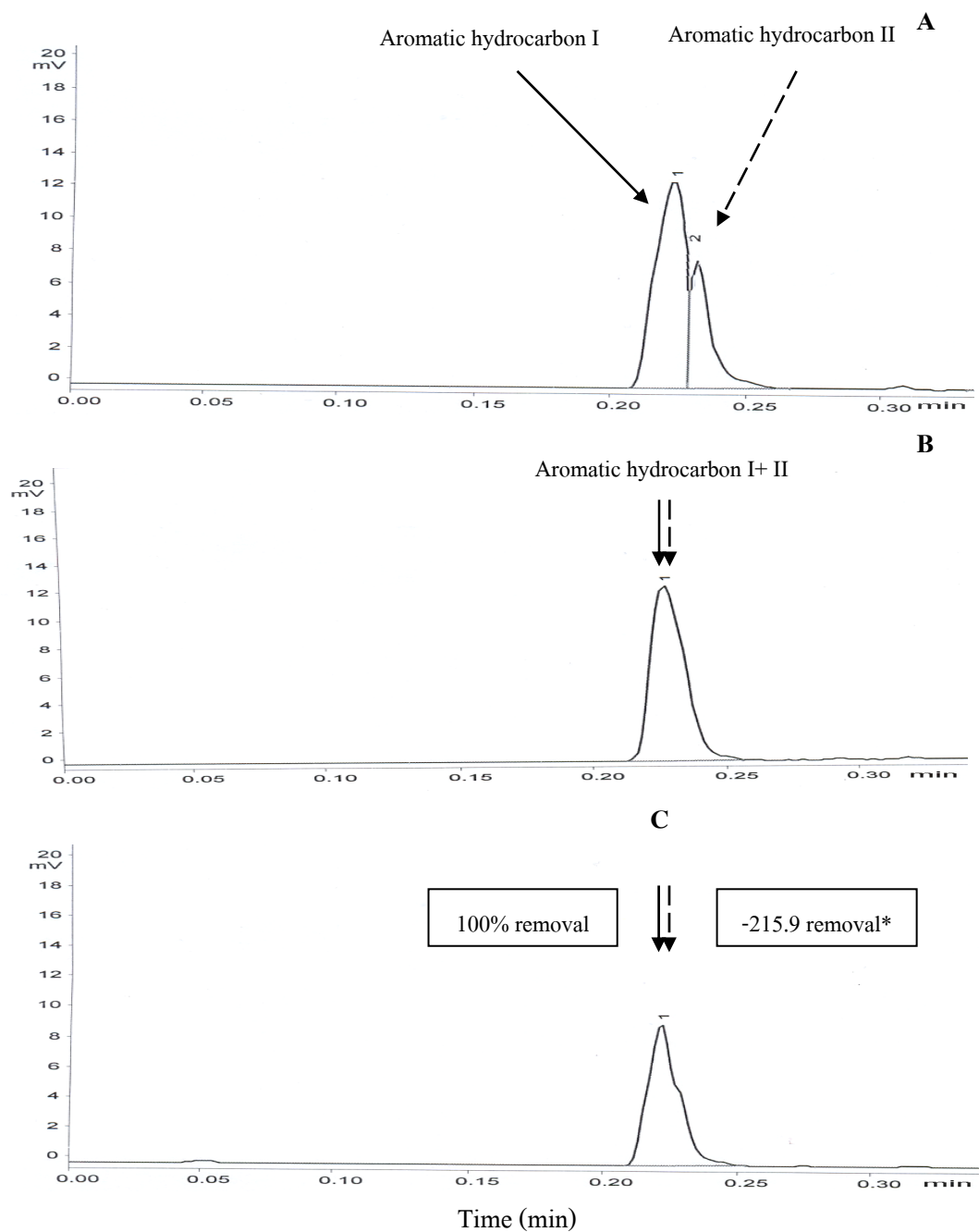


Figure 22. TLC-FID chromatogram of ULO extracted from ULO (1%) contaminated soil slurry without sterilization and incubated at room temperature, 200 rpm for 30 days.

A = 0 day of cultivation B = 7 days of cultivation C = 30 days of cultivation

Note: Aromatic hydrocarbon I (RT=0.211±0.004) and Aromatic hydrocarbon II (RT=0.218±0.008) was analyzed by TLC-FID.

* Minus value means amount is increased.

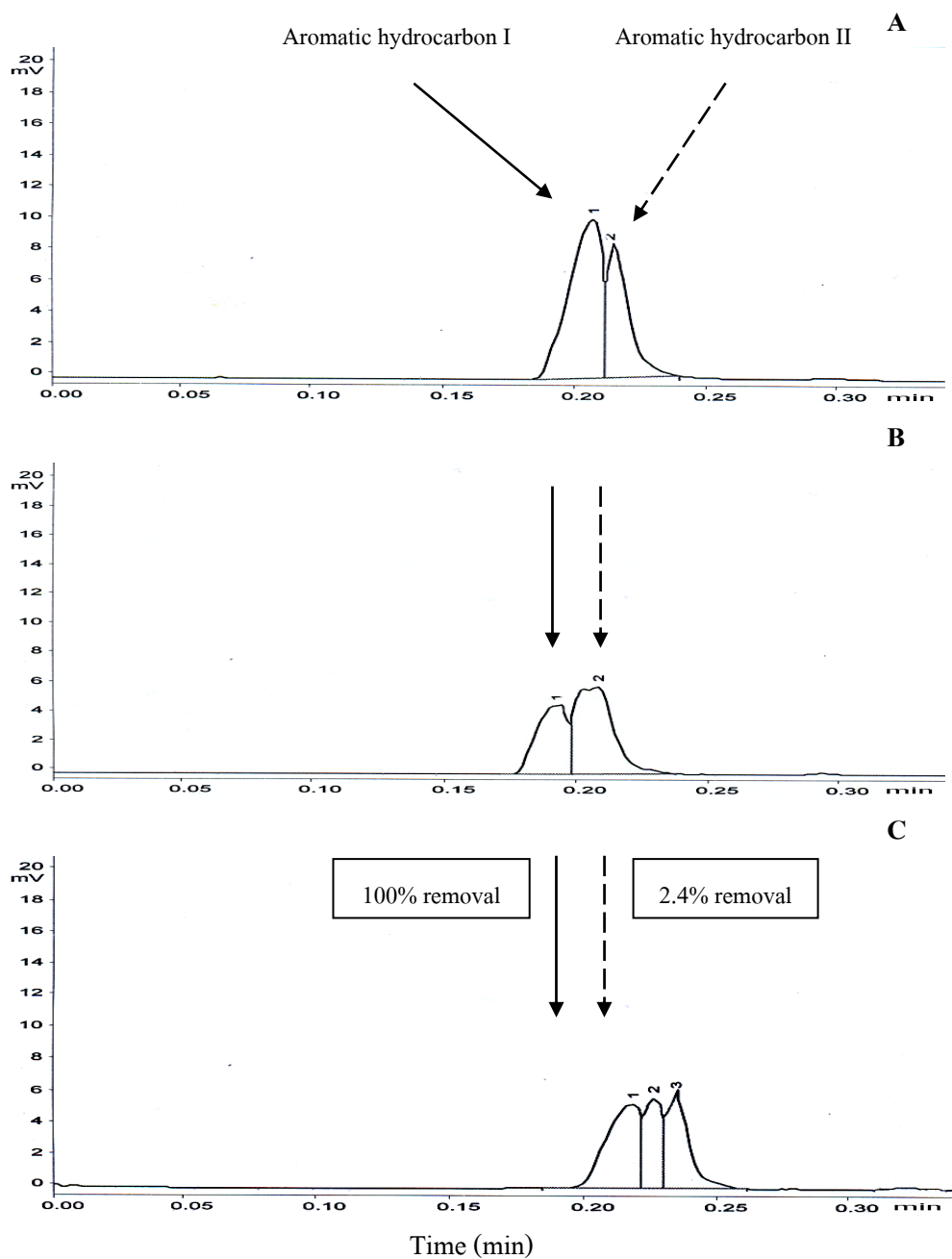


Figure 23. TLC-FID chromatogram of ULO extracted from ULO (1%) contaminated soil slurry without sterilization supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant and incubated at room temperature, 200 rpm for 30 days.

A = 0 day of cultivation B = 7 days of cultivation C = 30 days of cultivation

Note: Aromatic hydrocarbon I ($RT=0.209\pm 0.004$) and Aromatic hydrocarbon II ($RT=0.218\pm 0.004$) was analyzed by TLC-FID.

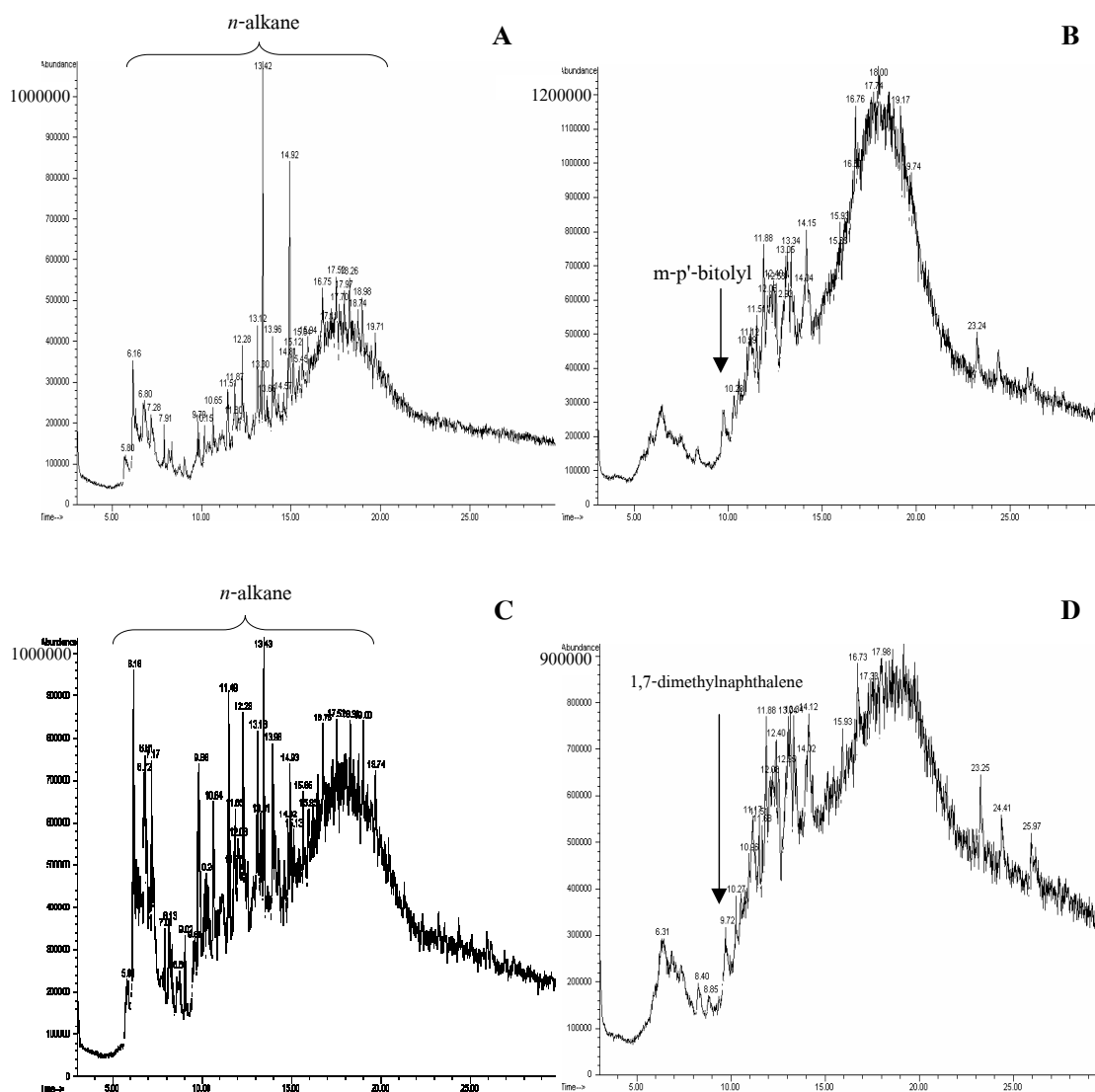


Figure 24. GC-MS chromatogram of hydrocarbon fraction from ULO contaminated soil slurry sterilization (A= day 0, B= day 30) and soil slurry sterilization supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant produced from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 (C= day 0, D= day 30). Time scale in minute.

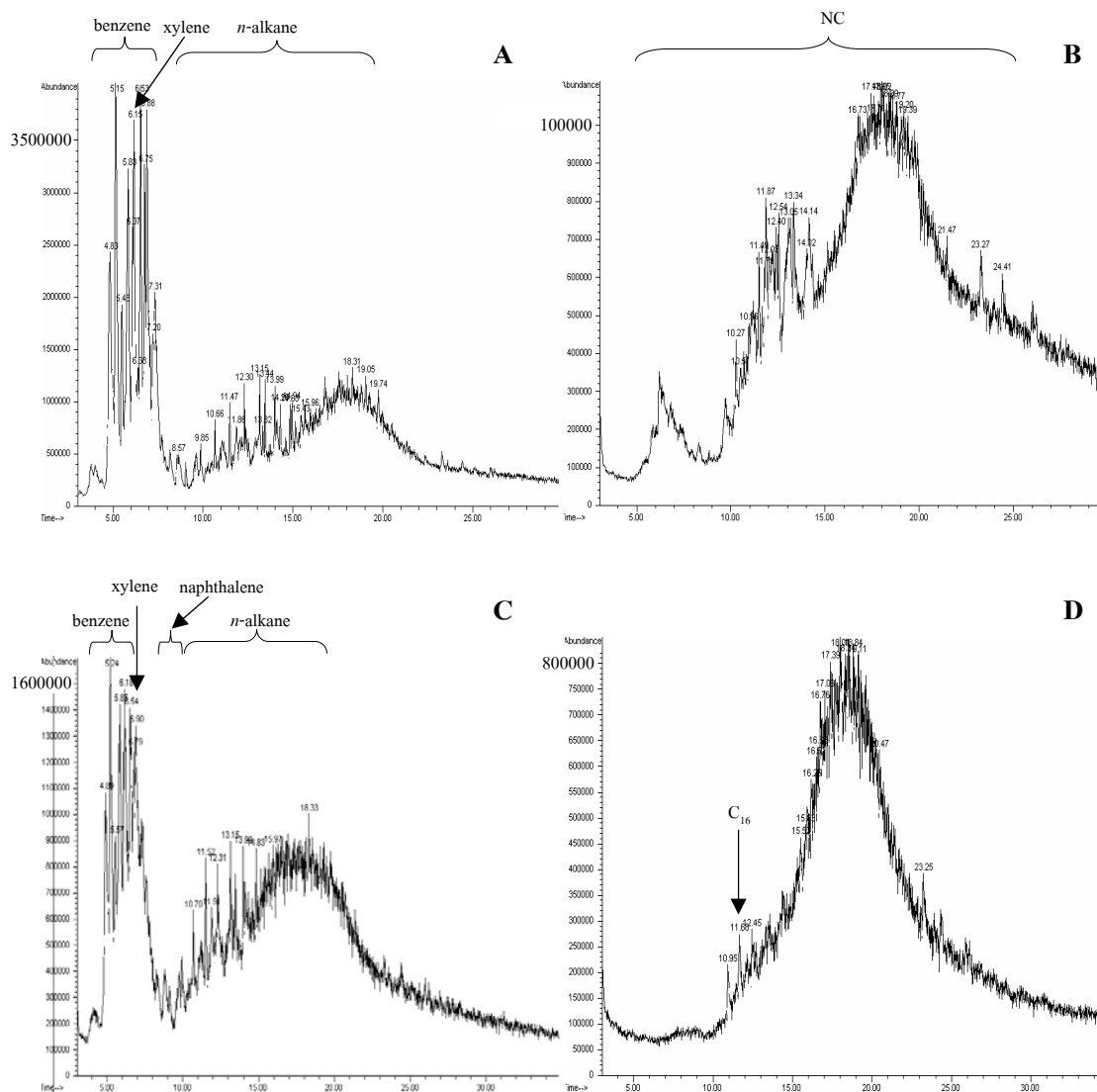


Figure 25. GC-MS chromatogram of hydrocarbon fraction from ULO contaminated soil slurry without sterilization (A= day 0, B= day 30) and soil slurry without sterilization supplemented with SC9 consortia and crude biosurfactant produced from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratius* SM7 (C= day 0, D= day 30). Time scale in minute. NC = No Classified.

Table 15. Effect of SC9 consortia on the degradation of low molecular weight aromatic hydrocarbon.

Type/Concentrations (%)	SC9 consortia
benzene	
0.01	++
0.025	++
0.05	+
0.10	+
0.25	-
xylene	
0.01	++
0.025	+
0.05	+
0.10	-
0.25	-
naphthalene	++

หมายเหตุ + หมายถึง เจริญได้น้อย

++ หมายถึง เจริญได้ดี

- หมายถึง ไม่มีการเจริญและตกตะกอน

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ตัวอย่างดินที่ใช้ทดลอง ไม่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ดินตัวอย่างมีลักษณะเป็นดินร่วน (Loam soil) มีพีเอช ความชื้นและปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน เท่ากับ 6.29, 20% และ 2.5% ตามลำดับ มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณฟอสฟอรัส เท่ากับ 0.13% และ 0.054% ตามลำดับ และมีอัตราส่วนของคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เท่ากับ 100:5:2

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กล้าเชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Chryseobacterium* sp., *Sphingobacterium multivorum*, *Bacillus cereus* และ *Agrobacterium tumefaciens* และกลุ่มเชื้อ SC9 มาทำการทดสอบการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อ SC9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $7 \log$ CFU/mL เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด คือ 44.54%

เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อที่คัดเลือกได้ในดินสภาพของเหลวเปียก พบว่า เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 15% เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และแหล่งฟอสฟอรัส คือ K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 แล้วเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $7 \log$ CFU/mL และมี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์ที่สแตนด์บายไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO เท่ากับ 61.17%

ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนใน ULO โดยกลุ่มเชื้อ SC9 ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ในดินสภาพของเหลวเปียกที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อนั้น ชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 และสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในดินสภาพของเหลวเปียกที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO สูงที่สุด 88.59% ภายใน 30 วัน ที่ทำการทดลอง โดยลดปริมาณ

สารประกอบ aliphatic hydrocarbon $C_{16}-C_{21}$ และสารประกอบ aromatic hydrocarbon เช่น benzene, xylene และ naphthalene ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้ภายใน 30 วันที่ทำการทดลอง

กลุ่มเชื้อ SC9 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของ ULO นอกเหนือจากดินในสภาพของเหลวเปี้ยวด้วยเทคนิค *In-situ* treatment และ *Ex-situ* treatment ซึ่งการนำกลุ่มเชื้อ SC9 ไปประยุกต์ใช้นั้นอาจจะใช้ตัวเซลล์โดยตรงหรืออาจจะใช้เฉพาะสารที่กลุ่มเชื้อ SC9 ผลิตขึ้น เช่น สารลดแรงตึงผิวและเอนไซม์ เป็นต้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมชนิดของน้ำมันที่ปนเปื้อนและวิธีการที่จะเลือกใช้ในการบำบัด

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปริมาณความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 เพราะความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีผลต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน
2. การใช้สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ในการวิจัยนี้ทำให้ไม่สามารถรู้องค์ประกอบหรือโครงสร้างอย่างละเอียดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ จึงไม่สามารถศึกษากลไกการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ที่จำเพาะต่อการย่อยสลาย ULO ได้ อีกทั้งเชื้อที่ใช้เป็นกลุ่มเชื้อจึงไม่สามารถรู้ได้ว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ใดที่มีบทบาทในการย่อยสลาย ULO และมีบทบาทในช่วงใดของการทดลอง ในการศึกษาวิจัยขั้นต่อไปควรศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มเชื้อ SC9 ว่ามีการเจริญสูงสุดอยู่ในช่วงใด และศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้ก่อนการศึกษาเพื่อที่จะได้ศึกษากลไกการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย
3. ควรมีการใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อ SC9 ซึ่งเป็นวิธีการที่ช่วยในการศึกษาทั้งในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่ได้ (unculturable) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีจำนวนมากว่า เพื่อจะได้ทราบว่าในช่วงใดของการย่อยสลายจุลินทรีย์สายพันธุ์ใดมีบทบาทในการย่อยสลาย ULO

เอกสารอ้างอิง

กรมธุรกิจพลังงาน. 2550. น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ (ออนไลน์). สืบค้นจาก :

http://www.doeb.go.th/knowledge/data/lube_total.html (2 กรกฎาคม 2550).

กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2551. ทรัพยากรดิน, ลักษณะสมบัติของดิน (ออนไลน์). สืบค้นจาก :

<http://www. Environnet.in.th/evdb/info/soil/soil19.html> (8 กุมภาพันธ์ 2551).

กุลนรี เพชรรงค์. 2550. การผลิตและการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่แยกได้จากทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิตติมา แก้วเรือง. 2551. การแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ในดิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. 2533. น้ำมัน. กองวิเคราะห์ผลกระทบสิ่งแวดล้อม สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ.

นภดล สว่างนาวิน. 2547. ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรายเป็นป็นเพื่อนคราบน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุจา สารคุณ. 2548. ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในดิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิภา ต้นแพง. 2546. การกำจัดคราบน้ำมัน (สารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน) ด้วยวิธีผสมผสานระหว่างการใช้แบคทีเรียและสารลดแรงตึงผิว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีระศักดิ์ ทรัพย์วิเชียร. 2550. น้ำมันหล่อลื่น. ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- สมศักดิ์ วั่งโน. 2528. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. ไทยวัฒนาพานิชย์. กรุงเทพฯ.
- สิริพร แก่นสียา. 2546. แนวทางการจัดเก็บน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว. ว. สิ่งแวดล้อม. 26.
- เอกวัฒน์ ลือพร้อมชัย. 2546. เทคโนโลยีชีวภาพกับการบำบัดสารเคมีอันตราย. ว. สิ่งแวดล้อม 8: 8-11.
- Abu, G. O. and Dike, P. O. 2008. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. *Bioresour. Technol.* 99: 4761-4767.
- Adebusoye, S. A., Ilori, M. O., Amund, O. O., Teniola, O. D. and Olatope. S. O. 2006. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted Tropical stream. *J. Amer. Sci.* 2: 48-57.
- Antai, S. P. 1992. Biodegradation of bonny light crude oil by *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. *Waste Manage.* 10: 61-64.
- Arulazhagan, P. and Vasudevan, N. 2009. Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* 58: 256-262.
- Ashok, B. T. and Saxena, S. 1995. Biodegradation of polycyclic-a review. *J. Sci. Ind. Res.* 54: 443-451.
- Atlas, M. R. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52: 149-156.
- Avramova, T., Sotirova, A., Galabova, D. and Karpenko, E. 2008. Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* 62: 415-420.
- Baatout, S., Leys, N., Hendrickx, L., Dams, A. and Margeay, M. 2007. Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research. *Acta Astronaut.* 60: 451-459.

- Back, R. H., Banwart, W. L. and Hassett, J. J. 1980. *Introductory Soil Science a Laboratory Manual*. 3rd Ed. Stipes. Illinois.
- Bai, G., Brusseau, M. L. and Miller, R. M. 1997. Influence of rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1866-1873.
- Baker, H. K. and Diane, S. H. 1994. *Bioremediation*. Environmental Microbiology Associates. p. 10-256. McGraw-Hill. New York.
- Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. *Bioresour. Technol.* 51: 1-12.
- Barahona, L. M., Vázquez, R. R., Velasco, M. H., Jarquin, C. V., Pérez, O. Z., Cantú, A. M. and Albores, A. 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Appl. Soil. Ecol.* 27: 165-175.
- Bastiaens, L., Springeal, D., Wattiau, P., Harms, H., Wachter, R. D., Verachtert, H. and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1834-1843.
- Biswal, B. K., Tiwari, S. N. and Mukherji, S. 2009. Biodegradation of oil in oily sludges from steel mills. *Bioresour. Technol.* 100: 1700-1703.
- Boonchan, S., Britz, M. L. and Stanley, G. A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial co-cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 3: 1007-1019.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.* 74: 63-67.
- Børresen, M. H. and Rike, A. G. 2006. Effect of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. *Col. Reg. Sci. Technol.* 48: 129-138.
- Cameotra, S. S. and Singh, P. 2008. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* 62: 274-280.

- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J. and Ortiz, A. 2003. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochem. Biophys. Act.* 1611: 91-97.
- Casas, J. A. and Ochoa, F. G. 1999. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 488-494.
- Catherine, N. M. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133: 183-198.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3: 351-368.
- Cerniglia, C. E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 331-338.
- Cheung, K. C., Zhang, J. Y., Deng, H. H., Ou, Y. K., Leung, H. M., Wu, S. C. and Wong, M. H. 2007. Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. *Bioresour. Technol.* 99: 2148-2155.
- Collina, E., Bestetti, G., Gennaro, P. D., Franzetti, A., Gugliersi, F., Lasagni, D. and Pitea, A. 2005. Naphthalene biodegradation kinetics in an aerobic slurry-phase bioreactor. *Environ. Inter.* 31: 167-171.
- Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M. M. A. and Noort, P. C. M. 1998. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 32: 966-970.
- Cubitto, M. A., Moran, A. C., Commendatore, M., Chiarello, M. N., Baldini, M. D. and Sineriz, F. 2004. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soil. *Biodegradation.* 15: 281-287.
- Cunha, C. D. and Leite, S. G. F. 2000. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazil. J. Microbiol.* 31: 45-49.

- Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T. and Rulkens, W. 2002. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere*. 46: 1235-1245.
- Dibble, J. T. and Bartha, R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 729-739.
- Doick, K. J. and Semple, K. T. 2003. The effect of soil: water ratio on the mineralization of phenanthrene: LNAPL mixtures in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 220: 29-33.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* 10: 208-217.
- Fritsche, W. and Hofrichter, M. 2000. Aerobic Degradation by Microorganisms. *In* Environmental Processes. Vol. 11b. 2nd ed. (Klein, J., ed.). p. 145-155. Wiley-Vch. Germany.
- Fry, I. J., Chakrabarty, A. M. and DeFrank, J. J. 1993. 1992 CRDEC Science Conf. on Chemical Defense, Edgewood, p. 362. Maryland. USA.
- Fu, M. H. and Alexander, M. 1995. Use of surfactants and slurring to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 551-558.
- 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.
- Garon, D., Sage, L., Wouessidjewe, D. and Murandi, F. S. 2004. Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. *Chemosphere*. 56: 159-166.
- Genouw, G., Naeyer, F., Meenan, P., Werf, J., Nijs, W. and Verstraete, W. 1994. Degradation of oil sludge by landfarming, a case study at the Ghent Harbour. *Biodegradation*. 5: 37-46.

- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B. and Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* 54: 61-67.
- Giessing, A. M. B. and Johnsen, A. R. 2005. Limited microbial degradation of pyrene metabolites from the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. *Chemosphere.* 61: 1281-1287.
- Gómez, B. C., Quintero, R., García, F. E., Howard, A. M. M., Serna, F. J. Z. D., Rodríguez, C. H. H., Gillén, T., Varaldo, H. M. P., Cortés, J. B. and Vázquez, R. R. 2003. Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresour. Technol.* 89: 177-183.
- Gouda, M. K., Omar, S. H., Chekroud, Z. A. and Eldin, H. M. N. 2007. Biodegradation of kerosene I: A case study in liquid media. *Chemosphere.* 69: 1807-1814.
- Hadibarata, T., Tachibana, S. and Itoh, K. 2009. Biodegradation of chrysene, an aromatic hydrocarbon by *Polyporus* sp. S133 in liquid medium. *J. Hazard. Mater.* 164: 911-917.
- Haigh, S. D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Sci. Environ.* 185: 161-170.
- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I. and Jedidi, N. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil. Biol. Biochem.* 39: 1926-1935.
- Healy, M. G., Devine, C. M. and Murphy, R. 1996. Microbial production of biosurfactants. *Res. Conserv. Rec.* 18: 41-57.
- Herwijnen, R., Sande, B. F., Wielen, F. W. M., Springael, D., Govers, H. A. J. and Parsons, J. R. 2003. Influence of phenanthrene and fluoranthene on the degradation of fluorine and glucose by *Sphingomonas* sp. strain LB126 in chemostat cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46: 105-111.

- Hong, P. K. A., Nakra, S., Kao, C. M. J. and Hayes, D. F. 2008. Pressure-assisted ozonation of PCB and PAH contaminated sediments. *Chemosphere*. 72: 1757-1764.
- Høier, C. K., Sonnenborg, T. O., Jensen, K. H. and Gudbjerg, J. 2009. Model analysis of mechanisms controlling pneumatic soil vapor extraction. *J. Cont. Hydrol*. 103: 82-98.
- Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F., Liu, R. L. and Li, G. 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Mar. Pollut. Bull.* 56: 1714-1718.
- Hwang, S. and Cutright, T. J. 2002. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere*. 47: 891-899.
- Ibekwe, V. I., Ubochi, K. C. and Ezeji, E. U. 2006. Effect of organic nutrient on microbial utilization of hydrocarbons on crude oil contaminated soil. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 983-986.
- Ijah, U. J. J. and Antai, S. P. 2003. Removal of nitrogen light crude oil in soil over a 12-month period. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* 51: 93-99.
- Ijah, U. J. J. and Ukpe, L. I. 1992. Biodegradation of crude oil by *Bacillus* strains 28A and 61B isolation from oil spilled soil. *Waste Manage.* 12: 55-60.
- Ishigami, Y. and Suzuki, S. 1997. Development of biochemical-functionalization of biosurfactants and natural dyes. *Pro. Org. Coat.* 31: 51-61.
- Javorská, H., Tlustoš, P., Komárek, M., Leštan, D., Kaliszová, R. and Száková, J. 2009. Effect of ozonation on polychlorinated biphenyl degradation and on soil physico-chemical properties. *J. Hazard. Mater.* 161: 1202-1207.
- Jin, L. S., Qi, W. H. and Hua, Y. Z. 2006. Isolation and characterization of gasoline-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated soils. *J. Environ. Sci.* 18:969-972.
- Jirasripongpun, K. 2002. The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 296-300.

- Jones, G. L. and Hunter, D. W. F. 1997. Characterization of fluoranthene and pyrene-degrading *Mycobacterium*-like strains by RAPD and SSU sequencing. FEMS Microbiol. Lett. 153: 51-56.
- Juhasz, A. J., Britz, M. L. and Stanley, G. A. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benzo[*a*]anthracene and dibenzo[*a,h*]anthracene by *Brucella cepacia*. J. Appl. Microbiol. 83: 189-198.
- Kao, C. M., Chen, C. Y., Chen, S. C., Chien, H. Y. and Chen, Y. L. 2008. Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation. Chemosphere. 70: 1492-1499.
- Kästner, M. and Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 668-675.
- Katamai, W. 2008. Screening of Biosurfactant-Producing Yeasts, Purification, Characterization and Application. Ph.D. Biotechnology. Prince of Songkla University.
- Kelsey, J. W., Kottler, B. D. and Alexander, M. 1997. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemical. Environ. Sci. Technol. 31: 214-217.
- Kim, I. S., Park, J. S. and Kim, K. W. 2001. Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. Appl. Geochem. 16: 1419-1428.
- Kim, S. S., Chun, B. H. and Kim, S. H. 2003a. Non-isothermal pyrolysis of waste automobile lubricating oil in a stirred batch reactor. Chem. Eng. J. 93: 225-231.
- Kim, Y. S., Jeong, S. U., Yoon, W. L., Yoon, H. K. and Kim, S. H. 2003b. Tar-formation kinetics and adsorption characteristics of pyrolyzed waste lubricating oil. J. Anal. Appl. Pyrol. 70 : 19-33.
- Koma, D., Hasumi, F., Yamamoto, E., Ohta, T., Chung, S. Y. and Kubo, M. 2001. Biodegradation of long-chain *n*-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. J. Biosci. Bioeng. 91 : 94-96.

- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* 39: 295-304.
- Kuyukinaa, M. S., Ivshinaa, I. B., Ritchkovaa, M. I., Cunninghamb, C. J., Philp, J. C. and Christofic, N. 2003. Bioremediation of crude oil contaminated soil using slurry phase biological treatment and landfarming techniques. *Soil. Sed. Cont.* 12: 85-99.
- Kwapisz, E., Wszelaka, J., Marchut, O. and Bielecki, S. 2008. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* 61: 214-222.
- Labare, M. P. and Alexander, M. 1995. Enhanced mineralization of organic compounds in non-aqueous phase liquids. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 257-265.
- Langwaldt, J. H. and Puhakka, J. A. 2000. On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environ. Pollut.* 107: 187-197.
- Lee, S. H., Lee, S., Kim, D. Y. and Kim, J. G. 2007. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *J. Hazard. Mater.* 143: 65-72.
- Lee, E. H. and Cho, K. S. 2008. Characterization of cyclohexane and hexane degradation by *Rhodococcus* sp. EC1. *Chemosphere.* 71: 1738-1744.
- Lertthamrongsak, W. 2003. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Petroleum-Contaminated Soil by the Addition of Tamarind Leaves Composted Contaminated Soil. M. Sc. Environmental. Management. Chulalongkorn University.
- Leys, N. M., Bastiaens, L., Verstraete, W. and Springael, D. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 726-736.
- Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q. and Gong, Z. 2008a. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J. Hazard. Mater.* 150: 21-26.

- Li, M.T., Hao, L.L., Sheng, L. X. and Xu, J. B. 2008b. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1. *Bioresour. Technol.* 99: 6878-6884.
- Lindstrom, J. E. and Braddock, J. F. 2002. Biodegradation of petroleum hydrocarbons at low temperature in the presence of the dispersant Corexit 9500. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 739-747.
- Mandri, T. and Lin, J. 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South. Afr. *J. Biotechnol.* 6: 023-027.
- Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 650-663.
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishizuka, I., Toida, T. and Yano, I. 1990. Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxy fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. *J. Bacteriol.* 172: 3015-3022.
- Mercadé, M. E., Monleón, L., Andeés, C. D., Rodón, I., Martínez, 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.
- Mohan, S. V., Shailaja, S., Ramakrishna, M., Reddy, K. B. and Sarma, P. N. 2006. Bioslurry phase degradation of DEP contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of augmentation and substrate partition. *Proc. Biochem.* 41: 644-652.
- Mohan, S. V., Reddy, B. P. and Sarma, P.N. 2009. *Ex situ* slurry phase bioremediation of chrysene contaminated soil with the function of metabolic function: Process evaluation by data enveloping analysis (DEA) and taguchi design of experimental methodology (DOE). *Bioresour. Technol.* 100: 164-172.
- Morgan, P. and Watkinson, R. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and method for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 8: 305-333.

- Morgan, P. and Watkinson, R. J. 1992. Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the *in situ* biotreatment of contaminated soil and groundwater. *Water. Res.* 26: 73-78.
- Morris, J. M., Jin, S., Crimi, B. and Pruden, A. 2009. Microbial fuel cell in enhancing anaerobic biodegradation of diesel. *Chem. Eng. J.* 146: 161-167.
- Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133: 183-198.
- Newell, C. J., Winters, J. A., Rafai, H. S., Miller, R. N., Gonzales, J. and Wiedemeier, T. H. 1995. Modeling Intrinsic remediation with multiple electron acceptors: results from seven sites. In: *Proceedings of the Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water: Provention, Detection and Restoration*. National Water Well Association, Houston, TX. P. 33-47.
- Nikolopoulou, M., Paradakis, N. and Kalogerakis, N. 2007. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. *Desalination.* 211: 286-295.
- Nikolopoulou, M. and Kalogerakis, N. 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Mar. Pollut. Bull.* 56: 1855-1861.
- Nwachukwu, S. U. and Ugoji, E. O. 1995. Impacts of crude petroleum spills on microbial communities of tropical soils. *Inter. J. Ecol. Environ. Sci.* 21: 169-176.
- Oboh, B. O., Ilori, M. O., Akinyemi, J. O. and Adebusoye, S. A. 2006. Hydrocarbon degrading potentials of bacteria isolated from a Nigerian bitumen (tarsand) deposit. *Nature Sci.* 3: 51-57.
- Okpokwasili, G. C. and James, W. A. 1995. Microbial contamination of kerosene, gasoline and crude oil and their spoilage potentials. *Mater. Org.* 29: 147-156.

- Okuda, T., Garduño, M. E. A., Suzuki, M., Matsui, C., Kose, T., Nishijima, W. and Okada, M. 2007. Enhancement of biodegradation of oil adsorbed on fine soils in a bioslurry reactor. *Chemosphere*. 68: 281-286.
- Oleszczuk, P. 2009. Application of three methods used for the evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bioaccessibility for sewage sludge composting. *Bioresour. Technol.* 100: 413-420.
- Pathak, H., Kantharia, D., Malpani, A. and Madamwar, D. 2009. Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: *In vitro* studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms. *J. Hazard. Mater.* Article in press.
- Perfumo, A., Banat, I. M., Marchant, R. and Vezzulli, L. 2007. Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Chemosphere*. 66 : 179-184.
- Phetrong, K., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2008. Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30: 297-305.
- Poeton, T., Stensel, H. and Strand, S. 1999. Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by marine bacteria: Effects of solid phase on degradation kinetics. *Water Res.* 33: 868-880.
- Pour, A. K., Karamanev, D. and Margaritis, A. 2005. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an immobilized cell airlift bioreactor. *Water Res.* 39: 3704-3714.
- Prasanna, D., Mohan, S. V., Reddy, P. B. and Sarma, P. N. 2008. Bioremediation of anthracene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode. *J. Hazard. Mater.* 153: 244-251.
- Providenti, M. A., Flemming, C. A., Lee, H. and Trevors, J. T. 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17: 15-26.
- Rafael, D. V. 1988. Environmental impact of used moter oil. *Sci. Total. Environ.* 79: 1-23.

- Rahman, K. S. M., Rahman, J. T., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I. M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour. Technol.* 85: 257-261.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I. M. 2003a. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *J. Basic Microbiol.* 42: 284-291.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R. and Banat, I. M. 2003b. Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour. Technol.* 90: 159-168.
- Ramirez, N., Cutright, T. and Ju, L. K. 2001. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium. *Chemosphere.* 44: 1079-1086.
- Ramos, J. L., Duque, E. and Gonzalez, M. I. R. 1991. Survival in soil of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 260-266.
- Regina, O. E., Emuobonuvie, I. F. and Roseline, U. E. 2006. Growth responses of bacteria isolates on various concentrations of crude oil. *J. Amer. Sci.* 2: 13-16.
- Rhykerd, R. L., Crews, B., McInnes, K. J. and Weaver, R. W. 1999. Impact of bulking agents forced aeration and tillage on remediation of oil-contaminated soil. *Bioresour. Technol.* 67: 279-285.
- Rockne, K. J., Shor, L. M., Young, L. Y., Tanghon, G. L. and Kosson, D. S. 2002. Distributed sequestration and release of PAHs in weathered sediment : The role of sediment structure and organic carbon properties. *Environ. Sci. Technol.* 36: 2636-2644.
- Ron, E. Z. and Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and bioremediation. *Environ. Biotechnol.* 13: 249-252.

- Rosa, S. M. C., Dams, R. I., Rosa, E. V., Radetski, M. R., Corrêa, A. X. R. and Radetski, C. M. 2009. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *J. Hazard. Mater.* 164: 61-66.
- Rosenberg, A. and Alexander, M. 1979. Microbial cleavage of various organophosphorus insecticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 886-891.
- Ryan, M., Smith, M. P., Vinod, T. K., Lau, W. L., Keana, J. F. W. and Griffith, O. H. 1996. Synthesis, structure-activity relationships and the effect of polyethylene glycol on inhibitors of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus*. *J. Med. Chem.* 39: 4366-4376.
- Samanta, S. K., Singh, O. V. and Jain, R. K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20: 243-248.
- Saul, D. J., Aislabie, J. M., Brown, C. E., Harris, L. and Foght, J. M. 2004. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 141-155.
- Scelza, R., Rao, M. A. and Gianfreda, L. 2007. Effects of compost and of bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. *Soil Biol. Biochem.* 39: 1303-1317.
- Scheibenbogen, K., Zytner, R. G., Lee, H. and Trevors, J. T. 1994. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 59: 53-59.
- Schipper, C., Gessner, K., Muller, T. and Scheper, T. 2000. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *J. Biotechnol.* 83: 189-198.
- Semple, K. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A. and Harms, H. 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* 38: 228-231.

- Seo, J. S., Keum, Y. S. and Li, Q. X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Inter. J. Environ. Res. Public Health*. 6: 278-309.
- Shabir, G., Afzal, M., Anwar, F., Tahseen, R. and Khalid, Z. M. 2007. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* 61: 161-166.
- Shailaja, S., Ramakrishna, M., Mohan, S. V. and Sarma, P. N. 2007. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate (DnBP) in bioaugmented bioslurry phase reactor. *Bioresour. Technol.* 98: 1561-1566.
- Sharma, B. K., Sarowha. S. L., Bhagat, S. D., Tiwari, R. K., Gupta, S. K. and Venkataramani, P. S. 1998. Hydrocarbon group type analysis of petroleum heavy fractions using the TLC-FID technique. *Fresenius J. Anal. Chem.* 360: 539-544.
- Shin, K. H. and Kim, K. W. 2004. A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenanthrene and diesel in sand. *Environ. Geochem. Health*. 26: 5-11.
- Shirai, K., Hanzawa, N. and Katusta, M. 1995. Heavy oil degrading bacteria isolated by long term enrichment in alumina columns containing heavy oil C. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2159-2161.
- Sims, R. C. and Overcash, M. R. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PANs) in soil-plant systems. *Res. Rev.* 88: 1-68.
- Straube, W. L., Nestler, C. C., Hansen, L. D., Ringleberg, D., Prichard, P. J. and Jones, M. J. 2003. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta. Biotechnol.* 2-3: 179-196.
- Suthersan, S. S. 1999. *In situ* Bioremediation. *Remediation Engineering: Design Concepts*. CRC Press LLC. Boca Raton.

- Syakti, A. D., Acquaviva, M., Gilewicz, M., Doumenq, P. and Bertrand, J. C. 2004. Comparison of *n*-eicosane and phenanthrene removal by pure and mixed cultures of two marine bacteria. *Environ. Res.* 96: 228-234.
- Tang, W., White, J. and Alexander, M. 1998. Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 117-121.
- Tao, X. Q., Lu, G. N., Dang, Z., Yang, C. and Yi, X. Y. 2007. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. *Proc. Biochem.* 42: 401-408.
- 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.
- Uz, I., Duan, Y. P. and Ogram, A. 2000. Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 231-238.
- Valentín, L., Chau, T. A. L., López, C., Feijoo, G., Moreira, M. T. and Lema, J. M. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Proc. Biochem.* 42: 641-648.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73: 1163-1172.
- Volkering, F., Breure, A. M. and Rulkens, W. H. 1997. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation.* 8: 401-417.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 2637-2641.
- Whang, L. M., Liu, P. W. G., Ma, C. C. and Cheng, S. S. 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid and surfactin for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 151: 155-163.

- Wilson, S. C. and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). A review. *Environ. Pollut.* 81: 229-249.
- Yakimov, M. M., Abraham, W. R., Meyer, H., Giuliano, L. and Golyshin, P. N. 1999. Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Act.* 1438: 273-280.
- Yu, K. S. H., Wong, A. H. Y., Yau, K. W. Y., Wong, Y. S. and Tam, N. F. Y. 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 51: 1071-1077.
- Zaidi, B. R. and Imum, S. H. 1999. Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the Caribbean Coastal water. *Mar. Pollut. Bull.* 38: 737-742.
- Zang, S., Li, P., Li, W., Zhang, D. and Hamilton, A. 2007. Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. *Chemosphere.* 67: 1368-1374.
- Zang, S. and Lian, B. 2008. Synergistic degradation of 2-naphthol by *Fusarium proliferatum* and *Bacillus subtilis* in wastewater. *J. Hazard. Mater.* Article in press.
- Zhang, J., Gorkovenko, A., Gross, R. A., Allen A. L. and Kaplan, D. 1997. Incorporation of 2-hydroxyl fatty acids by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to tailor emulsan structure. *Inter. J. Biol. Macromol.* 20: 9-21.
- Zinjarde, S. S. and Pant, A. A. 2002. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 118-121.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mineral Salt Medium (MSM) (ดัดแปลงจาก Ijah and Upke, 1992)

K_2HPO_4	1.8 g/L
KH_2PO_4	1.2 g/L
NH_4Cl	4.0 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.8 g/L
$NaCl$	1.7 g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g/L
pH 7.0	

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Minimal salt medium (ดัดแปลงจาก Shabtai and Gutnick, 1985)

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2.2 g/L
KH_2PO_4	0.73 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/L
$NaCl$	30 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g/L
pH 7.0	

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient broth

Nutrient broth 13.0 g/L

ประกอบด้วย

- Peptic digest of animal tissue 5.0 g/L
- NaCl 5.0 g/L
- Beef extract 1.5 g/L
- Yeast extract 1.5 g/L

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient agar

Nutrient broth 13.0 g/L

ประกอบด้วย

- Peptic digest of animal tissue 5.0 g/L
- NaCl 5.0 g/L
- Beef extract 1.5 g/L
- Yeast extract 1.5 g/L

Agar 1.5 g/L

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวนฤมล มีบุญ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5011020016

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา) (เกียรตินิยมอันดับ 2)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Meeboon, N. and Maneerat, S. 2008. Acceleration of waste lubricating oil degradation in soil slurry with the addition of a microbial consortium. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. TSB 2008 : Biotechnology for Global Care. Taksila Hotel, Mahasarakham, Thailand. 14th-17th October 2008.