



การแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว  
และการประยุกต์ใช้ที่ดิน

**Isolation and Screening of Waste Lubricating Oil-Degrading Microorganisms  
Consortia from Soil and Its Application in Soil**

จิตติมา แก้วเรือง

**Jittima Kaewrueng**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

**2551**

**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

ชื่อวิทยานิพนธ์      การแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์  
 ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ในดิน

ผู้เขียน                นางสาวจิตติมา แก้วเรือง

สาขาวิชา              เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
.....	.....ประธานกรรมการ
(ดร.ศุภศิลา ป๋ มณีรัตน์)	(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงษ์ศักดิ์กุล)
	.....กรรมการ
	(ดร.ศุภศิลา ป๋ มณีรัตน์)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐกานต์ นิตยพัทธ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น  
 ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

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

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ในดิน
ผู้เขียน	นางสาวจิตติมา แก้วเรือง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2550

### บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจากบริเวณอู่ซ่อมรถและปั้มน้ำมันในจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานีและสงขลา ในการแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยวิธี enrichment culture โดยนำตัวอย่างดิน 1 กรัม เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและตรวจสอบกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยวิธี weight loss พบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดคือกลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40 ภายในเวลา 5 วันของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 10 พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลงจากร้อยละ 40.46 เป็นร้อยละ 15.05 เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาแยกเชื้อให้เป็นเชื้อเดี่ยว พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 4 ไอโซเลต เป็นแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่ง 2 ไอโซเลต และอีก 2 ไอโซเลต เป็นแกรมลบ มีรูปร่างกลมและรูปร่างแบบแท่ง เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA สามารถจำแนกเป็นเชื้อ *Chryseobacterium* sp., *Bacillus cereus*, *Sphingobacterium multivorum* และ *Agrobacterium tumefaciens* การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือเติมกลุ่มเชื้อ SC-9 ให้มีจำนวนเชื้อประมาณ  $10^4$  CFU/g ปรับระดับความชื้นในดินเท่ากับร้อยละ 17 เติมสารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสโดยให้มีอัตราส่วนของคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 300:10:1 ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 98 และปริมาณสาร aromatic hydrocarbon และ asphaltene ลดลงร้อยละ 64 และ 70 ตามลำดับ หลังจากการย่อยสลาย 30 วัน

**Thesis Title** Isolation and Screening of Waste Lubricating Oil-Degrading Microorganisms Consortia from Soil and Its Application in Soil

**Author** Miss Jittima Kaewrueng

**Major Program** Biotechnology

**Academic year** 2007

### ABSTRACT

Consortia of waste lubricating oil degrading microorganisms were isolated from oil contaminated soil collected from garages and petrol stations in Nakhonsithammarat, Songkhla and Suratthani Provinces. An enrichment culture technique was used for the isolation of microorganisms responsible for the biodegradation of waste lubricating oil. One gram of soil sample was added into mineral salt medium containing 1% waste lubricating oil as sole carbon source. Waste lubricating oil degradation activity was measured by weight loss method. The most active consortia in the assimilation of waste lubricating oil was SC-9. The SC-9 consortia showed 40.46% oil degrading activity within 5 days. The oil concentration had affected the degradation of the SC-9 consortia. The degrading activity was decreased from 40.46% to 15.05% when waste lubricating oil was increased from 1% to 10%. The SC-9 consortia contained four bacterial isolates, two isolates were Gram-positive, rod shape and the other was Gram-negative, cocci and rod shape. Determination of the nucleotide sequence of the gene encoding 16S rDNA of the four bacterial strains was identified as *Chryseobacterium* sp., *Bacillus cereus*, *Sphingobacterium multivorum* and *Agrobacterium tumefaciens*. The optimal conditions for degradation of waste lubricating oil contaminated soil by SC-9 consortia were the addition of SC-9 consortia to obtain about  $10^4$  CFU/g soil and adjusted moisture content of soil to 17%. In addition, C:N:P ratio was adjusted to 300:10:1 gave the maximal biodegradation 98% and aromatic hydrocarbon and asphaltene was decreased up to 64% and 70%, respectively.

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการทำวิจัย ตลอดจนการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงษ์กิตติกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐกานต์ นิตยพันธ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่าในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติภายใต้รหัสโครงการ BRT R\_150005 ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง สำหรับกำลังใจและให้โอกาสในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรมในการอำนวยความสะดวกในการทำงานรวมถึงอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย ตลอดจนทุกๆ ท่านที่มีได้กล่าวมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

จิตติมา แก้วเรือง

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำสั้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	21
ขอบเขตงานวิจัย	21
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ อุปกรณ์	22
วิธีการวิเคราะห์	23
วิธีการทดลอง	25
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
การเก็บตัวอย่าง	29
การศึกษาประสิทธิภาพในการข่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของ กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์	34
การศึกษาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ เชื้อจุลินทรีย์สามารถข่อยได้	37
การเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	39
การวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของดิน	43
ผลของกลุ่มเชื้อ SC-9 ต่อการข่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ในดิน	45
ผลของความชื้นต่อการข่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยกลุ่มเชื้อ SC-9	52

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสต่อการ ย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยกลุ่มเชื้อ SC-9	58
4. สรุปผลการทดลอง	66
ข้อเสนอแนะ	68
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	76
ประวัติผู้เขียน	83

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน	3
2.	แบคทีเรียที่พบในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน	11
3.	รายละเอียดการเก็บตัวอย่าง	30
4.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 : (a) เจริญบนอาหาร Nutrient agar, (b) เจริญบนอาหาร mineral salt medium agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1	41
5.	ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 โดย 16S rDNA	41
6.	ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างดิน	43
7.	ชุดการทดลองการผลของกลุ่มเชื้อ SC-9 ต่อย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน	45
8.	ผลของกลุ่มเชื้อ SC-9 ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินในวันที่ 30	50
9.	ค่าพีเอชและความชื้นที่ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9	50
10.	ชุดการทดลองผลของความชื้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9	52
11.	ผลของความชื้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินในวันที่ 30	56
12.	ค่าพีเอชและความชื้นที่ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9	56
13.	ชุดการทดลองผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9	58



## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14.	ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9 ในวันที่ 30	64
15.	ค่าพีเอชและความชื้นที่ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยกลุ่มเชื้อ SC-9	64

## รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. วิธีการย่อยสลาย aliphatic hydrocarbon ① = <i>n</i> -alkane monooxygenase, ② = alcohol dehydrogenase และ ③ = aldehyde dehydrogenase	12
2. วิธีการย่อยสลาย aromatic hydrocarbon	14
3. ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน	36
4. ผลของความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่อการย่อยสลาย โดยกลุ่มเชื้อ SC-9 ในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน	38
5. แผนภูมิต้นไม้ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SC9-1, SC9-2, SC9-3 และ SC9-4	42
6. TLC/FID โครมาโตแกรมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเริ่มต้นในดินที่ใช้ในการทดลอง	44
7. ผลของการเติมกลุ่มเชื้อ SC-9 ต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ 0, 15 และ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1; (A) จำนวน heterotrophic bacteria, (B) จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว	47
8. TLC-FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของชุดการทดลองที่ 4 (ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน $10^4$ CFU/g)	51
9. ผลของความขึ้นต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ 0, 15 และ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1; (A) จำนวน heterotrophic bacteria, (B) จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว	54
10. TLC-FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของชุดการทดลองที่ 2 (ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน $10^4$ CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17)	57

## รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11.	ผลของอัตราส่วนระหว่าง C:N:P ต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ 0, 15 และ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1; (A) จำนวน heterotrophic bacteria, (B) จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว	60
12.	TLC-FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของชุดการทดลองที่ 4 (ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน $10^4$ CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17+ ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 300:10:1)	65

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. บทนำต้นเรื่อง

การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในดินหรือแหล่งน้ำเป็นปัญหาหนึ่งที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเมื่อสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะมีการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ต่างๆ ทำให้การย่อยสลายยากยิ่งขึ้นและมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว (Mercadé *et al.*, 1996) โดยสาเหตุใหญ่ที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อม คือ การขาดความระมัดระวังและความรับผิดชอบของผู้ใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ เช่น การเททิ้งลงสู่แหล่งดินหรือที่ระบายน้ำหลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำมันเครื่อง การหกสะสมของน้ำมันเครื่องและผลิตภัณฑ์น้ำมันอื่นๆ ภายในบริเวณสถานีบริการน้ำมันหรืออู่ซ่อมรถยนต์ เป็นต้น

การกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนซึ่งปนเปื้อนในธรรมชาติมีหลายวิธีแต่การกำจัดโดยชีววิธี (bioremediation) เป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่ายน้อย และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งไม่เป็นพิษ (Leahy and Colwell, 1990) แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในสถานที่ที่มีการปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอนดังกล่าว ด้วยเหตุนี้การกำจัดมลพิษด้วยชีววิธีจึงมีความเป็นไปได้สูงในการกำจัดคราบน้ำมันหล่อลื่นที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Atlas and Atlas, 1991; Balba *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมนั้นไม่ได้บ่งชี้ว่าสารไฮโดรคาร์บอนนั้นจะถูกย่อยสลายไปด้วยเนื่องจากอาจจะขาดสารอาหารชนิดอื่นที่มีความจำเป็นต่อการเจริญหรือสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญ การย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนอาจจะเพิ่มขึ้นได้โดยการเติมแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจนและสารอาหารอื่นๆ หรือโดยการเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนชนิดนั้นๆ ลงไปโดยตรง (Van Hamme *et al.*, 2003)

สำหรับในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะการศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับ

สภาพแวดล้อมในประเทศรวมไปถึงการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับการแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำจัดและแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อมต่อไป

## 2. ทรวจเอกสาร

### 2.1 น้ำมันหล่อลื่น (Lubricating oil)

น้ำมันหล่อลื่นเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่ได้จากการกลั่นปิโตรเลียม มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่หล่อลื่นชิ้นส่วนของเครื่องยนต์และเครื่องจักรกลที่มีลักษณะปิด ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วนคือ

- น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน (base oil) ที่มีใช้ในปัจจุบันแบ่งเป็น น้ำมันพืชหรือสัตว์ น้ำมันแร่และน้ำมันสังเคราะห์ โดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้น้ำมันแร่มาผลิตเป็นน้ำมันหล่อลื่นสำเร็จรูปเพราะมีคุณภาพดีและราคาถูก ขณะที่น้ำมันพืชหรือสัตว์เป็นน้ำมันที่ราคาถูกแต่มีการใช้งานน้อยมากในปัจจุบันเนื่องจากมีความคงตัวทางเคมีต่ำ เสื่อมสภาพง่าย สำหรับน้ำมันสังเคราะห์เป็นน้ำมันที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมีนำไปใช้ในงานที่ต้องการคุณสมบัติพิเศษ มีราคาสูงแต่ในปัจจุบันมีการนิยมใช้มากขึ้น ซึ่งมีองค์ประกอบพื้นฐานดังแสดงในตารางที่ 1

- สารเพิ่มคุณภาพ (additives) เป็นสารที่เติมลงไปนน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานเพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางด้านกายภาพและเคมีให้เหมาะสมกับชนิดและประเภทการใช้งานของเครื่องจักร น้ำมันหล่อลื่นพื้นฐานเมื่อเติมสารเพิ่มคุณภาพเข้าไปแล้วจะเรียกว่าน้ำมันหล่อลื่นสำเร็จรูป สำหรับสารเพิ่มคุณภาพที่นิยมใช้อาจมีคุณสมบัติดังนี้ สารต้านทานปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารป้องกันการสึกหรอ สารป้องกันการสนิม สารป้องกันฟอง สารรับแรงกดสูง สารเพิ่มดัชนีความหนืด สารชะล้างและกระจายสิ่งสกปรกหรือสารเพิ่มความเป็นด่าง เป็นต้น

น้ำมันหล่อลื่นมีองค์ประกอบเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมเลกุลตั้งแต่  $C_{18}$ -  $C_{25}$  อยู่หลายชนิด ทั้ง linear paraffins, branched paraffins, cyclic alkanes และ aromatic hydrocarbon (Goto *et al.*, 1994) โดยองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นมี aliphatic รวมทั้ง alkanes และ cycloalkanes อยู่ร้อยละ 73-80 ของน้ำหนักทั้งหมด มี monoaromatic hydrocarbons อยู่ประมาณร้อยละ 11-15 ของน้ำหนัก มี polycyclic aromatic

hydrocarbons อยู่ประมาณร้อยละ 2-5 และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีขั้ว (polar fraction) ประมาณร้อยละ 4-8 โดยส่วนที่มีขั้วนี้เกิดจาก aromatic compounds ซึ่งมีซัลเฟอร์ ไนโตรเจนหรือออกซิเจนประกอบอยู่ (Rafael, 1988)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน

Table 1. Component of 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)

ประเทศไทยมีการใช้น้ำมันหล่อลื่นเป็นจำนวนมากทั้งในอุตสาหกรรมและการคมนาคม พบว่าในปี 2540 มีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว (used lubricating oil) รวมทั้งประเทศประมาณ 329 ล้านลิตร โดยสามารถจัดเก็บได้เพียง 219 ล้านลิตร หรือร้อยละ 66 ส่วนอีกกว่า 100 ล้านลิตร หรือร้อยละ 34 คาดว่ามีการจัดเก็บรวบรวมไว้ใช้ประโยชน์หรือเททิ้งในลักษณะที่ไม่เหมาะสมเช่น ทิ้งลงในแหล่งน้ำ บริเวณที่อยู่อาศัย พื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษสะสมต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว (พนัส งามกนกวรรณ, 2545) โดยการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วให้มีคุณสมบัติที่สามารถนำไปใช้ใหม่ได้โดยผ่านกรรมวิธี 2 วิธีคือ

- การบำบัดทางกายภาพและทางเคมี โดยใช้กรดซัลฟิวริกในปริมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรและฟูลเลอร์เอิร์ทในปริมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก เป็นการฟอกสีและกำจัดองค์ประกอบต่างๆ ที่ไม่เสถียรตลอดจนถึงเจือปนอื่นๆ ซึ่งทำให้น้ำมันเสื่อมคุณภาพ

- การบำบัดด้วยไฮโดรเจน ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ ตัวเร่งปฏิกิริยาเรนี-นิกเกิล นิกเกิลออกไซด์โมลิบดีนัมไดรอกไซด์บนตัวรองรับอะลูมินา และตัวเร่งปฏิกิริยานิกเกิลออกไซด์ทั้งสแตนไดรอกไซด์บนตัวรองรับอะลูมินา ตัวเร่งปฏิกิริยาเรนี-นิกเกิลมีราคาถูกสามารถใช้บำบัดน้ำมันได้ดีและสามารถแยกออกจากน้ำมันได้ง่าย ความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการบำบัดคือร้อยละ 4 น้ำมันที่ได้จากกรรมวิธีดังกล่าวมีคุณภาพที่ดีโดยมีปริมาณซัลเฟอร์ลดลงและดัชนีความหนืดของน้ำมันมีค่าเพิ่มขึ้น (สมพร สีนโพธิ์ และธีระ นานาศรีรัตน์, 2551)

จากการสำรวจกลุ่มตัวอย่างประเภทต่างๆ เกี่ยวกับปริมาณและการจัดการน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วทั่วประเทศจากสถานบริการ ร้านค้าจำหน่ายน้ำมันหล่อลื่น อู่ซ่อมรถหรือศูนย์บริการ โดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วก่อนบำบัดและหลังการบำบัด พบว่าคุณสมบัติรวมของน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วก่อนการบำบัดโดยเฉลี่ยยังมีคุณสมบัติในการหล่อลื่นที่ดีสามารถใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดน้ำมันเตาเกรดเอ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยความร้อน (heating value) ประมาณ 9,500 kcal/kg ปริมาณกำมะถันไม่เกินร้อยละ 1 โดยมีน้ำและโลหะที่เกิดจากการเผาไหม้และสึกหรอในปริมาณน้อยมาก นอกจากนี้พบว่ามีโลหะและสารที่มาจากการเพิ่มคุณภาพคงเหลืออยู่ในปริมาณมากเช่น Zn, Ca, Pb และ Mg ผลการศึกษาพบว่าสามารถนำไปใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเตาในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี ส่วนคุณสมบัติรวมของน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วหลังการบำบัด มีค่าคุณสมบัติสำคัญคือ ความหนืดอยู่ในมาตรฐานแต่มีแนวโน้มไปทางด้านต่ำ นอกจากนี้มีค่าความเป็นกรดสูงมากจึงไม่เหมาะต่อการนำไปใช้เป็นน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์อีกครั้ง ทั้งนี้เพราะค่าความเป็นกรดสูงอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่เครื่องยนต์จากการกัดกร่อนของกรด การมีจุลควาไฟฟ้าและความใสของน้ำมันหล่อลื่น

ต่ำแสดงว่าน่าจะมีสารละลายอินทรีย์บางประเภทปนเปื้อนอยู่ (พนัส งามกนกวรรณ, 2545; สิริพร แก่นสียา, 2546)

## 2.2 การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจัดเป็นของเสียอันตราย หากทำการถ่ายเทและกำจัดไม่ถูกวิธีจะเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม สัตว์ พืช และมนุษย์ เช่น การเผาภาชนะบรรจุหรือน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วทำให้เกิดไอและควันพิษที่มีออกไซด์ของโลหะฟุ้งกระจายสู่บรรยากาศ นอกจากนี้การรั่วไหลของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วลงดินจะแพร่กระจายสู่บริเวณหรือพื้นที่ข้างเคียงอย่างรวดเร็วทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายประการด้วยกัน

- ประเภทการรั่วไหลและอัตราการไหล จะเป็นตัวกำหนดการแพร่กระจายของน้ำมันโดยการรั่วไหลอย่างต่อเนื่องจะทำให้คราบน้ำมันมีโอกาสแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้าง นอกจากนี้อัตราการไหลก็มีส่วนสำคัญต่อการแพร่กระจายออกไปของคราบน้ำมัน

- ประเภทของน้ำมัน คุณสมบัติเฉพาะตัวของน้ำมันแต่ละชนิดทำให้ขนาดของพื้นที่ที่แพร่กระจายไม่เท่ากันแม้ว่าจะมีการรั่วไหลในปริมาณที่เท่ากัน

- ลักษณะของสภาพพื้นที่ ลักษณะของสภาพพื้นที่จะมีอิทธิพลสำคัญต่อการแพร่กระจายของน้ำมันเป็นอย่างมาก กล่าวคือพื้นที่ที่มีความลาดชันจะมีผลทำให้น้ำมันแพร่กระจายได้เร็วกว่าในสภาพพื้นที่ที่เป็นที่ราบ

- ระยะเวลาที่เกิด การแพร่กระจายของน้ำมันครอบคลุมพื้นที่กว้างไกลมากน้อยเพียงใดนั้นระยะเวลาที่เกิดการรั่วไหลจะเป็นตัวชี้วัดอย่างหนึ่งที่จะช่วยให้คาดการณ์เป็นไปอย่างถูกต้อง

นอกจากนี้การหกหรือรั่วไหลของน้ำมันลงดินบางส่วนจะซึมผ่านช่องว่างของดิน (permeable soil) ตามแนวตั้งด้วยแรงโน้มถ่วงโลกและบางส่วนจะซึมออกทางด้านข้างของชั้นดินตามช่องว่างหรือรอยแยก การไหลซึมของน้ำมันลงสู่ดินจะมีเนื้อดินบางส่วนที่ยอมให้น้ำมันซึมผ่านได้ในช่วงแรกเท่านั้นและเมื่อระยะเวลาผ่านไปช่วงหนึ่งจะไม่ยอมให้ซึมผ่านได้อีกเนื่องจากเนื้อดินมีการอึดตัวด้วยน้ำมันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติคุณสมบัติทางกายภาพของดินนั้นๆ ด้วย กล่าวคือดินที่มีกรวดหรืออนุภาคของทรายหยาบสูงน้ำมันจะสามารถซึมผ่านในอัตราที่สูงกว่าดินที่มีอนุภาคเป็นดินเหนียว การปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ ในแหล่งดิน พบว่าคราบน้ำมันที่ปกคลุมผิวดินจะกั้นไม่ให้ออกซิเจนและแสงอาทิตย์ผ่านไปได้เป็นการทำลายแหล่งอาหารในดิน เช่นเดียวกับการปนเปื้อนบนผิวน้ำจะขัดขวางการถ่ายเทออกซิเจนระหว่างอากาศและน้ำทำให้พืชและสัตว์ที่อาศัยในแหล่งน้ำขาด



ออกซิเจน นอกจากนี้คราบน้ำมันยังปิดกั้นแสงสว่างที่ส่องลงมาสู่พื้นท้องน้ำมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ ผลกระทบที่กล่าวมานี้จะทำให้สมดุลของระบบนิเวศน์และความงามทางธรรมชาติหมดไป

Pezeshki และคณะ (2000) ศึกษาผลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมต่อพืชบริเวณป่าชายเลน พบว่าพืชสามารถดูดซึมสารไฮโดรคาร์บอนบางชนิดผ่านผนังเซลล์ นอกจากนี้คราบน้ำมันที่เกาะตามใบพืชจะขัดขวางกระบวนการคายน้ำและการสังเคราะห์แสงของพืชส่งผลให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีส่วนประกอบของสารเคมีที่มีพิษ เช่น สารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) หากร่างกายได้รับในปริมาณ 0.23 - 48.9 ไมโครกรัมต่อกรัม จะมีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ผ่านการใช้งานแล้วจะมีปริมาณโลหะหนักสูง เช่น Pb, Zn, Ba และ Mg (Rafael, 1988) การรับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะผ่านกระบวนการดูดซึมผ่านผนังเซลล์หรือรับผ่านการกินอาหารที่มีสารไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนเข้าไปโดยตรง ความเป็นพิษจะเกิดจากการที่น้ำมันเข้าไปทำลายหรือขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือเกิดจากการสะสมของสารไฮโดรคาร์บอนในเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างและอวัยวะต่างๆ หากได้รับในปริมาณมากจะทำลายเซลล์ภายในร่างกายได้

Newman และคณะ (2000) ศึกษาผลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่อนกที่หากินบริเวณชายฝั่งที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบ พบว่านกได้รับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนผ่านการกินอาหารและสัมผัสคราบน้ำมัน เมื่อสัมผัสคราบน้ำมันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่ออวัยวะต่างๆ ในร่างกาย นอกจากนี้การกินอาหารที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนเข้าไปโดยตรงจะทำให้เกิดโรคโลหิตจาง (anemia) และโรคปอดบวม (pneumonia) ส่งผลให้เซลล์ตับถูกทำลายและองค์ประกอบทางเคมีของเลือดเปลี่ยนแปลงไป

Orisakwe และคณะ (2004) ศึกษาระดับความเป็นพิษของน้ำมันดิบชนิด Bonny light ต่อเนื้อเยื่อไตของหนูเผือก (albino rat) ที่ได้รับน้ำมันดิบเป็นเวลา 7 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู เนื้อเยื่อไตมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นั่นคือเซลล์บุผิวเกิดการคั่งของเลือดและเกิดการตายของเนื้อเยื่อและกลุ่มเซลล์

## 2.3 การกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

การกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมสามารถทำได้หลายวิธีตามความเหมาะสมของแต่ละพื้นที่ โดยปกติแล้วสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลักคือ

### 2.3.1 วิธีการทางกายภาพ (Physical method)

เป็นวิธีการควบคุม กำจัด และเก็บกวาดคราบน้ำมันด้วยกลวิธีหรืออุปกรณ์เครื่องมือ อุปกรณ์แต่ละชนิดมีหลักการและประสิทธิภาพในการทำงานแตกต่างกัน และในบางพื้นที่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือมากกว่า 1 ชนิด ปฏิบัติงานในลักษณะผสมผสานกัน ซึ่งประกอบด้วยวิธีดังต่อไปนี้

- Soil vapor extraction เป็นวิธีบำบัดโดยการดูดสารไฮโดรคาร์บอนที่ระเหยได้ออกจากดิน ซึ่งการบำบัดจะได้ผลดีในดินที่มีความพรุนสูง ดังนั้นดินที่มีความพรุนต่ำหรือแน่นทึบสามารถเพิ่มความพรุนและรอยแตกร้าวด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การใช้น้ำหรืออากาศความดันสูงอัดลงในชั้นดินเพื่อทำให้เกิดรอยร้าว เป็นต้น

- การเผา เป็นวิธีบำบัดที่สามารถทำได้รวดเร็ว สามารถกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนได้หมดถึงร้อยละ 98 แต่ก่อให้เกิดปัญหาหมอกพิษทางอากาศและความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน

### 2.3.2 วิธีการทางเคมี (Chemical method)

สารเคมีกำจัดคราบน้ำมัน (oil dispersant) มีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และตัวทำละลายบางชนิดยังมีส่วนผสมของสารที่สามารถควบคุมการแผ่กระจายของคราบน้ำมันที่แตกตัวในน้ำ โดยสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันจะทำให้ความแตกต่างของแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันลดลงจนแรงตึงผิวของน้ำมันใกล้เคียงกับน้ำ การนำสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันไปใช้โดยการฉีดพ่นลงบนคราบน้ำมันทำให้น้ำมันเกิดการแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายและนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้ (สมควร ไขแก้ว, 2545) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีและมีตัวทำละลายเป็นองค์ประกอบซึ่งย่อยสลายยากและเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (Healy *et al.*, 1996)

นอกจากนี้ยังมีการใช้โอโซนในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยโอโซนจัดเป็นสารออกซิแดนต์ (oxidant) ที่แรง เมื่อละลายอยู่ในน้ำจะเกิดการแพร่เข้าไปยังผิวและในรูพรุนของดินทำให้เกิดการออกซิไดส์ของ polycyclic aromatic hydrocarbon ได้ intermediate หรือผลิตภัณฑ์ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันของกรดคาร์บอกซิลิก ฟีนอล อัลดีไฮด์ และคีโตน ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่า polycyclic aromatic hydrocarbon และผลิตภัณฑ์หรือ intermediate ที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกับ

ไอโซนเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้หลายชนิดซึ่งสารผลิตภัณฑ์เหล่านี้สามารถย่อยสลายต่อโดยทางชีวภาพ

### 2.3.3 วิธีการทางชีวภาพ (Biological method)

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

- การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น (natural attenuation) เกิดจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสถานที่ปนเปื้อนย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยกระบวนการย่อยสลายจะเกิดอย่างช้าๆ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีจำนวนน้อยและสภาวะแวดล้อมอาจจะไม่เหมาะสม เช่น แหล่งไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสไม่เพียงพอ ความชื้น พีเอชหรือปริมาณออกซิเจนไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน วิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนในกรณีที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันปริมาณมาก (Forsyth *et al.*, 1995)

- การย่อยสลายโดยชีววิธี (bioremediation) โดยการปรับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ พีเอช ความชื้นหรือการเติมสารอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ตลอดจนการใช้จุลินทรีย์ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจะเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนได้เร็วขึ้น โดยวิธีนี้สามารถแบ่งกว้างๆ ออกเป็น *ex-situ* bioremediation หรือการนำดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนแล้วจึงดำเนินการบำบัดด้วยวิธีการทางชีววิธีต่างๆ และ *in-situ* bioremediation หรือการบำบัดดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยไม่นำดินหรือน้ำออกจากบริเวณที่มีการปนเปื้อน ทำให้สามารถลดต้นทุนในการขนย้ายและลดปัญหาการแพร่กระจายหรือปนเปื้อนในระหว่างการขนส่ง การเลือกวิธีในกระบวนการบำบัดจะขึ้นกับชนิดและปริมาณสารที่ปนเปื้อนหรือสภาพแวดล้อมที่เกิดการปนเปื้อนซึ่งเทคนิคที่สำคัญและนิยมเลือกนำมาใช้มี 2 แบบด้วยกัน คือ (Iwanoto and Nasu, 2001)

Bio-stimulation เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณสารอาหารจำกัดหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม โดยการเติม

สารอาหาร เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส การเพิ่มปริมาณออกซิเจน การปรับความชื้นหรือพีเอช ให้เหมาะสมเพื่อกระตุ้นการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสถานที่ที่มีการปนเปื้อน (Iwanoto and Nasu, 2001) วิธีนี้จะอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่น

การใช้เทคนิค biostimulation โดยเติมสารอนินทรีย์หรือปุ๋ยเคมีลงในสถานที่ปนเปื้อนจะสามารถส่งเสริมอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและมีบางรายงานพบว่าระดับความเข้มข้นของสารอาหารมีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์เช่น Braddock และคณะ (1997) พบว่าการเติมสารอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันเชื้อเพลิง (fuel oil) ที่ปนเปื้อนในดิน ซึ่งสอดคล้องกับ Atagana และคณะ (2003) แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 25 : 1 ให้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการย่อยสลาย creosote ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูงๆ

Bioaugmentation เป็นเทคนิคที่ส่งเสริมอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยการเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งกล้าเชื้อที่ใช้อาจจะแยกมาจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนนั่นเองหรืออาจจะแยกมาจากแหล่งปนเปื้อนอื่นหรือเป็นเชื้อที่ได้รับการคัดแปลงพันธุกรรมให้มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นๆ แล้ว

Dave และคณะ (1994) ศึกษาการย่อยสลาย slop oil โดยการใช้เทคนิค bioaugmentation ที่มีการเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 7 สายพันธุ์ ลงในดินที่มีการปนเปื้อน slop oil หลังจาก 30 วัน พบว่าการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย slop oil ได้ร้อยละ 70 ขณะที่การย่อยสลายโดยอาศัยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในดินมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพียงร้อยละ 40 ซึ่งสอดคล้องกับ Vasudevan และ Rajaram (2001) ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินโดยการใช้เทคนิค bioaugmentation พบว่าการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลวยร้อยละ 40 หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 90 วัน และเมื่อเติมสารอาหารอนินทรีย์ร่วมกับการเติมกล้าเชื้อจะให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลวยร้อยละ 65 นอกจากนี้ Bento และคณะ (2003) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลโดยการใช้เทคนิค bioaugmentation, biostimulation และ attenuation พบว่าเทคนิค bioaugmentation มีประสิทธิภาพในการย่อยสลวยดีกว่าเทคนิคอื่นๆ โดยสามารถย่อยสลวยในส่วนของ C<sub>12</sub>- C<sub>23</sub> ได้ร้อยละ 75 และส่วนของ C<sub>23</sub>- C<sub>40</sub> ได้ร้อยละ 73 หลังจาก 12 สัปดาห์ของการบ่ม

## 2.4 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญ นั่นคือจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานซึ่งจะถูกเปลี่ยนหรือย่อยสลายไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และองค์ประกอบของเซลล์โดยวิธีต่างๆ โดยในสิ่งแวดล้อมนั้นประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนรูปหรือย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายๆ สายพันธุ์ บางสายพันธุ์อาจจะมีผลสำคัญในช่วงแรกหรือช่วงหลังหรือตลอดการย่อยสลาย ทำให้โอกาสในการเปลี่ยนรูปหรือย่อยสลายสารเกิดขึ้นได้มากกว่าสิ่งแวดล้อมที่มีจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียวเพราะบางครั้งสภาวะแวดล้อมอาจไม่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์นั้น ทำให้การเปลี่ยนรูปหรือการย่อยสลายสารไม่เกิดขึ้น

Nakamura และคณะ (1996) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวได้แก่ *Acinetobacter* sp. T4, *Rhodococcus* sp. PR4, *Sphingomonas* sp. AJ1 และ *Pseudomonas putida* PB4 กับกลุ่มเชื้อแบคทีเรียผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่ากลุ่มเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ดีกว่าสายพันธุ์เดี่ยว โดยสามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 61 ขณะที่เชื้อ *Acinetobacter* sp. T4, *Rhodococcus* sp. PR4, *Sphingomonas* sp. AJ1 และ *Pseudomonas putida* PB4 สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 54, 53, 7 และ 2 ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 10 วัน ซึ่งสอดคล้องกับ Rahman และคณะ (2002) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้เชื้อสายพันธุ์เดี่ยวได้แก่ *Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 และ *Pseudomonas* sp. DS10-129 กับกลุ่มเชื้อผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่ากลุ่มเชื้อผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ได้ดีกว่า โดยสามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 78 ขณะที่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. DS10-129, *Bacillus* sp. DS6-86, *Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66 และ *Flavobacterium* sp. DS5-73 สามารถย่อยสลายได้ร้อยละ 66, 60, 50, 43 และ 41 ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 20 วัน

ความหลากหลายของสายพันธุ์จุลินทรีย์ในดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของดินและปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น ชนิดและปริมาณสารอาหาร ความชื้น พีเอช อุณหภูมิ การระบายอากาศภายในดิน เป็นต้น โดยแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดดินในแหล่งดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสายพันธุ์เด่นๆ แสดงดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่พบในดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

Table 2. Bacterial strain isolated from hydrocarbon contaminated soil.

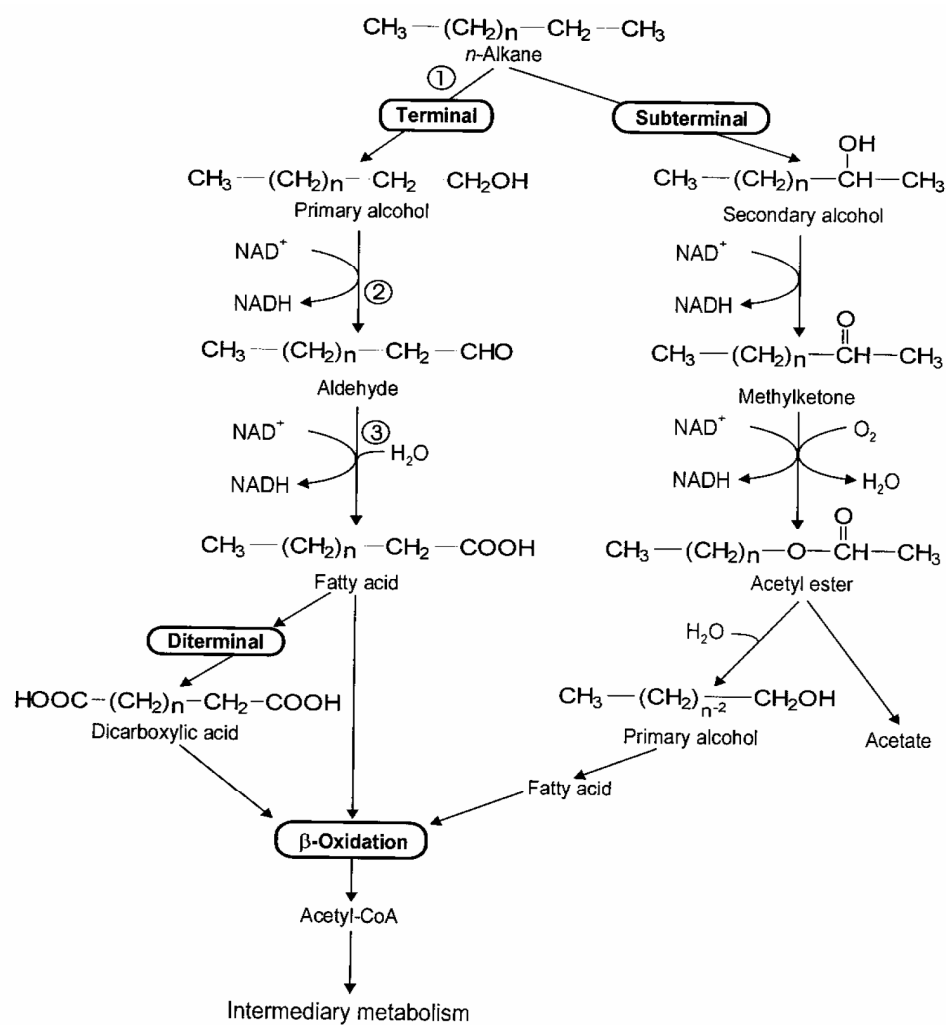
Gram-negative bacteria	Gram-positive bacteria
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Nocardia</i> spp.
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> spp.
<i>Flavobacterium/ Cytophaga</i> group	<i>Arthrobacter</i> spp.
<i>Xanthomonas</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.

ที่มา : Baker และคณะ (1994)

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติเกิดขึ้นได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อแลกเปลี่ยนสารโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงและได้พลังงานออกมาสำหรับนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือสารประกอบ aliphatic hydrocarbon และสารประกอบ aromatic hydrocarbon ซึ่งมีวิธีการย่อยสลายดังนี้

1. การย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon

การย่อยสลายสารประกอบ aliphatic hydrocarbon นั้น พบว่าบางชนิดที่ปลายสายไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่จะถูกย่อยโดยกลไกการเกิดปฏิกิริยา oxidation และ dehydrogenation มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดไขมัน ซึ่งจะถูกลดสลายต่อโดยกลไกการเกิด  $\beta$ -oxidation (Atlas, 1991) ในกรณีการย่อยสลาย cyclohexane เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยา hydroxylation โดยมีเอนไซม์ oxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็นสารประกอบ alicyclic alcohol จะเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยปฏิกิริยา dehydrogenation และ oxidation ได้เป็นสารประกอบ dicarboxylic acid ซึ่งเข้าสู่กลไกการเกิด  $\beta$ -oxidation ซึ่งปฏิกิริยานี้จะตัดคาร์บอนอะตอมโดยใช้เอนไซม์ oxygenase เป็นเอนไซม์เริ่มต้นในการเปลี่ยนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนให้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเอนไซม์ dehydrogenase จะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นอัลดีไฮด์และกรดไขมัน ตามลำดับ ซึ่งสารตัวกลาง (intermediate) ที่ได้ก่อนเข้าสู่กระบวนการ tricarboxylic acid cycle คือ acetyl-CoA และจะถูกใช้เป็น building blocks สำหรับสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ (ภาพที่ 1)



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

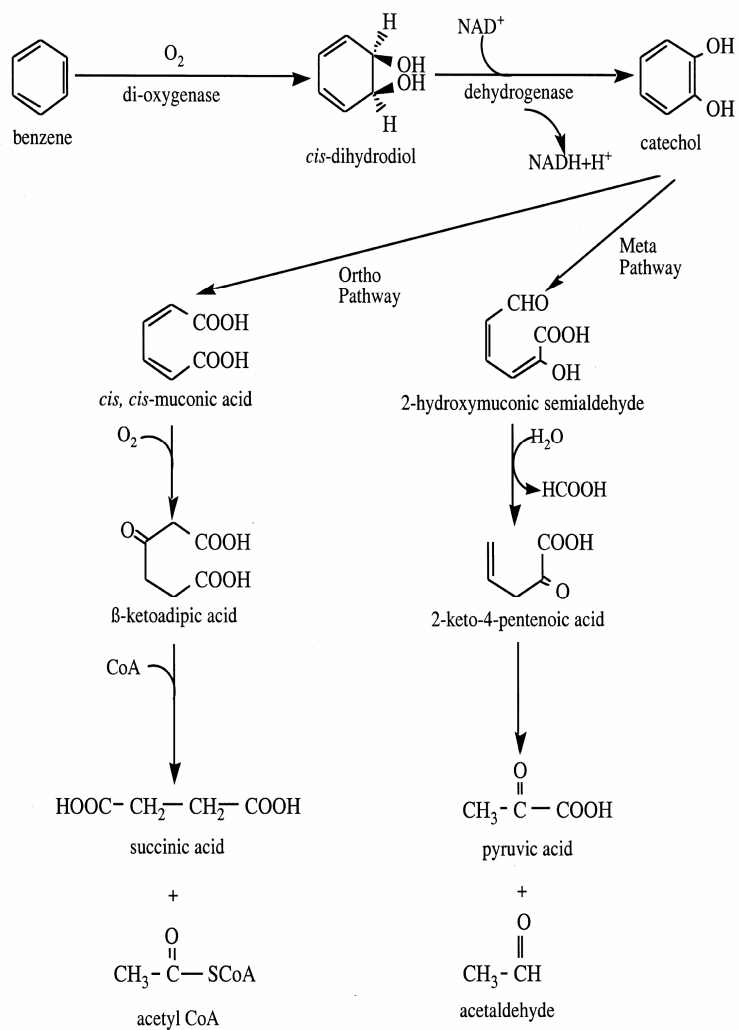
Figure 1. Biodegradation pathway of aliphatic hydrocarbon.

ที่มา : Fritsche และ Hofrichter (2000)

## 2. การย่อยสลายสารประกอบ aromatic hydrocarbon

การย่อยสลายสารประกอบ aromatic hydrocarbon เริ่มต้นจากการย่อยสลายส่วนที่เป็น side chain แล้วจึงย่อยส่วนของวงแหวนเบนซีน โดยอาศัยปฏิกิริยา hydroxylation และ dehydrogenation ในการเติมออกซิเจนเข้าไปในวงเบนซีนด้วยเอนไซม์ oxygenase ให้อยู่ในรูปของ diol จากนั้นเอนไซม์ dehydrogenase จะเปลี่ยน diol ให้อยู่ในรูปของสารที่ไม่เสถียรหรือที่เรียกว่า catecol ซึ่งการย่อยสลายโดยการแตกวงเบนซีนจะเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ ortho หรือ meta cleavage (ภาพที่ 2) ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่จะนำสารตัวกลางไปใช้สังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ซึ่งตัวกลางที่ได้จากการแตกวงเบนซีนแบบ ortho cleavage คือ succinate และ acetyl-CoA ส่วนการแตกวงเบนซีนแบบ meta cleavage คือ acetaldehyde และ pyruvate นอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีโครงสร้างของโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์หลายๆ สายพันธุ์เพื่อสร้างเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายให้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จนได้ผลิตภัณฑ์คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ





ภาพที่ 2 วิธีการย่อยสลาย aromatic hydrocarbon

Figure 2. Biodegradation pathway of aromatic hydrocarbon.

ที่มา : Galvis และคณะ (2006)

## 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ต้องการสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารแตกต่างกันเช่น จุลินทรีย์ที่อาศัยในดินที่มีการปนเปื้อนสารไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจำกัด จำเป็นต้องปรับระดับสารอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ความชื้น พีเอช ปริมาณออกซิเจนในดินและอุณหภูมิที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินให้สมบูรณ์และรวดเร็วขึ้น

### 2.5.1 ความชื้น

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

Barahona และคณะ (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น โดยจำลองการปนเปื้อนในดินด้วยการเติมน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 40 กรัมต่อกิโลกรัมดิน ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิเมตร พบว่าเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนเป็น  $1.0 \times 10^5$  CFU ต่อกรัมดิน ภายในเวลา 55 วัน ที่ระดับความชื้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเติมวัสดุเศษเหลือร้อยละ 2 ขณะที่ระดับความชื้นร้อยละ 30 และเติมวัสดุเศษเหลือร้อยละ 3 เชื้อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนเป็น  $1.6 \times 10^5$  CFU ต่อกรัมดิน และหลังสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 109 วัน ปริมาณน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินลดลงเท่ากับร้อยละ 67 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดิน

Coulon และคณะ (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (petroleum hydrocarbon) ที่ปนเปื้อนในดินบริเวณแอมดาร์กติกของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดิน โดยจำลองการปนเปื้อนด้วยน้ำมันดิบและน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 28.53 และ 27.33 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน ตามลำดับ ในภาชนะขนาด  $27 \times 24 \times 13$  เซนติเมตร และปรับระดับความชื้นให้มีค่าเท่ากับร้อยละ 40 พบว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนในรูปของ alkane ลดลงเท่ากับร้อยละ 77-95 ขณะที่ไฮโดรคาร์บอนในรูปของ polycyclic aromatic hydrocarbon ลดลงเท่ากับร้อยละ 80 ภายในเวลา 180 วัน

### 2.5.2 พีเอช

พีเอชของดินจะพบอยู่ในช่วง 2.5-11 ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและแร่ธาตุต่างๆที่อยู่ในดินซึ่งพบว่าที่พีเอช 7-9 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Dibble and Bartha, 1979) แต่ดินส่วนใหญ่จะมีสภาพเป็นกรดจำเป็นต้องปรับสภาพดินให้เป็นกลาง นอกจากนี้ช่วงค่าพีเอชที่เป็นกลางยังทำให้ธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้ วิธีที่เลือกใช้ส่วนใหญ่คือการเติมปูนขาว

Rahman และคณะ (2002) ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินในบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล โดยเลี้ยงเชื้อร้อยละ 1 ในอาหาร mineral salt medium ที่มีน้ำมันดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและปรับพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีค่าเท่ากับ 6.5, 7.5 และ 8.5 ตามลำดับ พบว่าที่พีเอช 7.5 ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบเท่ากับร้อยละ 78 ภายในเวลา 20 วัน และเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนเป็น  $9.0 \times 10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร

Hong และคณะ (2005) ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* IU5 ที่คัดแยกจากดินในบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซล โดยเลี้ยงเชื้อร้อยละ 2 ในอาหาร Bushnell-Hass ที่มีน้ำมันดีเซลร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและปรับพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีค่าเท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ พบว่าที่พีเอช 7 ปริมาณน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินลดลงเท่ากับร้อยละ 60 ภายในเวลา 13 วัน

### 2.5.3 ออกซิเจน

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

Rhykerd และคณะ (1999) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อการย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (petroleum hydrocarbon) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ปนเปื้อนในดิน โดยใช้วิธีเติมฟางและการให้อากาศ (อัดอากาศหรือการไถพรวน) เพื่อเพิ่มออกซิเจนและช่องว่างภายในดิน

พบว่า การเติมฟางแล้วทำการไถพรวน, การเติมฟางแล้วทำการอัดอากาศและชุดทดลองที่ไม่มีการปรับสภาพดินปริมาณปุ๋ยโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนลดลงเท่ากับร้อยละ 82, 50, 33 ตามลำดับ ที่เวลา 12 สัปดาห์ และร้อยละ 90, 90, 77 ตามลำดับ ที่เวลา 30 สัปดาห์

Vasudevan และ Rajaram (2001) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อการย่อยสลายกากตะกอนน้ำมัน (oil sludge) ที่ปนเปื้อนในดิน โดยใช้สัดส่วนของกากตะกอนน้ำมันต่อดินเท่ากับร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก แล้วเติมแกลบและกล้าเชื้อผสมเริ่มต้นจำนวน  $10^6$  CFU ต่อกรัมดิน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน พบว่าปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินลดลงเท่ากับร้อยละ 76 และมีจำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ  $6 \times 10^{13}$  CFU ต่อกรัมดิน ขณะที่เติมกล้าเชื้อผสมเริ่มต้น  $10^6$  CFU ต่อกรัมดินแต่ไม่เติมแกลบ ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินลดลงเท่ากับร้อยละ 40 และมีจำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ  $2 \times 10^{10}$  CFU ต่อกรัมดิน

#### 2.5.4 สารอาหาร

จุลินทรีย์ต้องการสารอาหารเพื่อนำไปใช้สร้างส่วนประกอบของเซลล์หรือสร้างพลังงานที่จำเป็นในการดำรงชีวิต สารอาหารถือเป็นส่วนสำคัญที่จะส่งเสริมให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพสูงสุด (Trindade *et al.*, 2005) โดยพบว่าดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจะมีปริมาณแหล่งคาร์บอนในดินเพิ่มขึ้นในขณะที่แหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมักจะไม่มีเปลี่ยนแปลง ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลงในแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนจะช่วยให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ในการสร้างและสลายสารเพื่อความอยู่รอดและการเจริญดำเนินไปอย่างรวดเร็ว (Bragg *et al.*, 1994; Venosa *et al.*, 1996) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ตลอดจนอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

Wang และ Bartha (1990) ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน พบว่าการปรับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้เท่ากับ 1000 : 5 : 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของดิน สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจาก 185 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเหลือเพียง 26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภายใน 15 สัปดาห์

Trindade และคณะ (2005) ศึกษาผลของสารอาหารต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินจากประเทศบราซิล โดยปรับแหล่งฟอสฟอรัสในดินด้วยไดโปตัสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate) ให้มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่ากับ 100 : 1.25 : 1 กรัมต่อกิโลกรัมของดิน จะสามารถลดปริมาณไฮโดรคาร์บอนจาก

53.80 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน เหลือเพียง 43.13 มิลลิกรัมต่อกรัมดิน คิดเป็นร้อยละ 7.4 ภายในเวลา 41 วัน

Galvis และคณะ (2006) ศึกษาผลของสารอาหารต่อการย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbon ที่ปนเปื้อนในดินที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง โดยจำลองการปนเปื้อนในดินโดยการเติม phenanthrene, anthracene และ benzo[a]pyrene และปรับแหล่งไนโตรเจนฟอสฟอรัสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) และโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogenphosphate) ตามลำดับ ให้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่ากับ 100 : 1.25 : 1 กรัมต่อกิโลกรัมของดิน สามารถลดปริมาณ phenanthrene เท่ากับร้อยละ 1.7 ขณะที่ anthracene และ benzo[a]pyrene ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

### 2.5.5 อุณหภูมิ

การเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นกับปฏิกิริยาทางเคมีของการสร้าง (anabolism) และสลายสาร (catabolism) โดยอัตราของปฏิกิริยาทางเคมีจะขึ้นกับอุณหภูมิ พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 10 องศาเซลเซียส จากอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะทำให้จุลินทรีย์มีเมตาบอลิซึมสูงขึ้นเป็น 2 เท่า (Baker and Diane, 1994) อย่างไรก็ตามช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์จะขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดด้วย ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีผลต่อการเจริญและการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์

Antai (1992) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสูงสุดที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 24 วัน และประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. จะลดลงต่ำสุดที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Wongsa และคณะ (2004) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยคัดเลือกไอโซเลตเด่นๆ ที่มีประสิทธิภาพในการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนมาเลี้ยงในอาหาร LB broth พบว่าทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิกว้าง (4 – 50 องศาเซลเซียส) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของสายพันธุ์ WatG, HokM และ HokS คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายพันธุ์ HooP และ TooY ซึ่งเป็นไอโซเลตที่คัดแยกมาจากน้ำพุร้อนที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันดิบ คืออุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว สภาวะแวดล้อมของแหล่งตัวอย่างที่จุลินทรีย์นั้นๆ อาศัยอยู่จะเป็นตัวกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน

### 2.5.6 ชนิดและปริมาณของสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อน

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินมีหลายรูปแบบ บางชนิดจุลินทรีย์ย่อยสลายไม่ได้หรือย่อยสลายได้ยาก เช่น aromatic hydrocarbon เป็นสารไฮโดรคาร์บอนไม่ละลายน้ำซึ่งจุลินทรีย์จะย่อยสลายได้ยาก ดังนั้นการเติมสารเคมีบางชนิดลงไปเพื่อช่วยให้ไฮโดรคาร์บอนอิมัลซิไฟด์หรือทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้นทำให้ง่ายแก่การย่อยสลายจึงเป็นสิ่งจำเป็น นอกจากนี้ปริมาณของสารที่ปนเปื้อนยังมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์

Ijah และ Antai (2003) ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้น้ำมันดิบ Nigerian light ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 เป็นเวลา 12 เดือน พบว่าจุลินทรีย์กลุ่ม aerobic heterothrophs และจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันมีจำนวนลดลงที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบสูงขึ้น

### 2.5.7 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

สารลดแรงตึงผิวถูกนำมาใช้ในการลดแรงตึงผิวหรืออิมัลซิไฟด์ (emulsify) เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของสารที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อย โดยนำไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการย่อยสลายคราบน้ำมันของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เพิ่มความสามารถในการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ทำให้การย่อยสลายน้ำมันเป็นไปอย่างรวดเร็ว

Mercadé และคณะ (1996) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเลี้ยงเชื้อ *Rhodococcus* และ *Bacillus* ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีปริมาณลดลงร้อยละ 7.87 - 45.89 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

Cuny และคณะ (1999) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลาย phenanthrene ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Sphingomonas* sp. 2MPII ในอาหารเลี้ยงเชื้อ synthetic seawater (SSW) ที่มีการเติม Tween 80 ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่า Tween 80 ส่งเสริมการย่อยสลาย phenanthrene โดยเชื้อ *Sphingomonas* sp. 2MPII สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติม Tween 80 ประสิทธิภาพการย่อยสลาย phenanthrene ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Tween 80 และชุดควบคุมที่เวลา 46 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับร้อยละ 65 และ 25 ตามลำดับ และหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 197 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการย่อยสลายมีค่าเท่ากับร้อยละ 85 และ 52 ตามลำดับ

Lee และคณะ (2006) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดีเซลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Rhodococcus baikonurensis* strain EN3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ (Tergitol 15-S, APG, LAE-9, SDS, Tween 80) พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิว APG, LAE-9 และ Tween 80 เหลือเพียง 11 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิว Tergitol 15-S เหลือ 12 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำมันดีเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิว SDS เหลือ 15 กรัมต่อลิตร ในเวลา 7 วัน

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว
2. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้
3. จำแนกสายพันธุ์กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

## ขอบเขตงานวิจัย

แยกและคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ด้วยวิธี enrichment culture และศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ตลอดจนจัดจำแนกสายพันธุ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rDNA



## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### วัสดุ อุปกรณ์

##### 1. วัสดุดิบ

- 1.1 ดินปนเปื้อนน้ำมันบริเวณอู่ซ่อมรถมอเตอร์ไซค์และปั้มน้ำมันในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา สุราษฎร์ธานีและดินบริเวณสถานีไบโอดีเซล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำการบันทึกลักษณะทางกายภาพของดิน วันเดือนปีที่เก็บ (ตารางที่ 3) โดยเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติกและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการทดสอบ
- 1.2 ดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสวนต้นไม้ อำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา
- 1.3 น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากอู่ซ่อมรถมอเตอร์ไซค์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

##### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกกลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ดัดแปลงจาก Ijah และ Upke (1992)
- 2.2 Nutrient agar (NA) บริษัท Himedia (Mumbai, India)
- 2.3 Nutrient broth (NB) บริษัท Himedia (Mumbai, India)

##### 3. สารเคมี

- 3.1 Ammoniumsulfate บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.2 Dichloromethane บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.3 Methanol บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)
- 3.4 Toluene บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)

3.5 Hexane บริษัท Lab-Scan (Bangkok, Thailand)

#### 4. อุปกรณ์

- 4.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd
- 4.2 ตู้อบอากาศร้อน (hot air oven) รุ่น MOV 212 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd
- 4.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 420 A บริษัท Orion Research, Inc
- 4.4 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D company, Ltd
- 4.5 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น BO210s บริษัท Sartorius
- 4.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Technical Cooperation
- 4.7 เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc
- 4.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR20B บริษัท Hitachi
- 4.9 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
- 4.10 เครื่อง TLC/FID รุ่น Iatroscan, TH-10 Mark 5 บริษัท Iatron Laboratories, Inc
- 4.11 Silica gel rod รุ่น Chromarod-SIII บริษัท Laboratories, Inc
- 4.12 เครื่องระเหยสุญญากาศ รุ่น EYELA บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd

#### วิธีการวิเคราะห์

##### 1. ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

1.1 Weight loss method สกัด culture broth ด้วย dichloromethane ในอัตราส่วน 1:1 โดยสกัด 2 ครั้ง แล้วนำส่วนของตัวทำละลายมากำจัดน้ำด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ทำแห้งตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำสารที่ได้มาวางในเคชิตเตอร์ที่มีการต่อกับ vacuum pump เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้นที่เหลืออยู่และชั่งน้ำหนักสารที่ได้ (Mercadé *et al.*, 1996) จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Shirai *et al.*, 1995) จากสมการ

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

$$W_1 = \text{น้ำหนักของน้ำมันเริ่มต้น}$$

$$W_2 = \text{น้ำหนักของน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์}$$

นำน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ได้จากการสกัดมาละลายในตัวทำละลาย dichloromethane ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กรองด้วย glass membrane filter GF-A (Whatman) และเก็บใส่ขวดฝาเกลียว ปิดสนิท นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ขั้นต่อไป

1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วย Thin layer chromatography (TLC) ที่มี flame ionization detector (FID) เป็นอุปกรณ์วัด สกัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในตัวอย่างดินด้วย dichloromethane ในอัตราส่วน 1 : 2 แยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตัวทำละลายที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วละลายอยู่มากำจัดน้ำด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ทำแห้งตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและชั่งน้ำหนักสารที่ได้ นำสารที่ได้มา spot บน silica gel rod SIII จากนั้นแยกในตัวทำละลายเคลื่อนที่ 3 ระบบ คือ ระบบที่ 1 คือ 100% *n*-hexane จนกระทั่งความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น ต่อด้วยระบบที่ 2 คือ 100% toluene ให้ความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 5 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น และระบบที่ 3 คือ 95% dichloromethane : 5% methanol จนกระทั่งความสูงของตัวทำละลายเคลื่อนที่อยู่ที่ระดับ 2 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น จากนั้นอบ silica gel rod SIII ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวิเคราะห์ปริมาณขององค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยเครื่อง TLC/FID ที่มีอัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน 150 มิลลิลิตรต่ออนาที อัตราการไหลของอากาศ 2 ลิตรต่ออนาทีและระดับความเร็วในการสแกน 30 วินาทีต่อหนึ่งครั้งของการสแกน ทำการอินทิเกรตหาพื้นที่ใต้กราฟ (Sharma *et al.*, 1998)

## 2. การวิเคราะห์องค์ประกอบของดิน

- 2.1 วัดความเป็นกรด-ด่างของดิน โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (ภาคผนวก ข)
- 2.2 วิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- 2.3 วิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในดิน โดยวิธี Kjeldahl ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- 2.4 วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน (Sharma *et al.*, 1998)
- 2.5 วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส โดยวิธี Bray II ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- 2.6 วิเคราะห์ชนิดของดิน ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## 2.7 ความชื้น (A.O.A.C., 2000)

### 3. การหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (waste lubricating oil-degrading microorganism) และหาจำนวน heterotrophic microorganism

เก็บตัวอย่างดิน 25 กรัม มาเตรียม suspension ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution หาจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยนำ 0.1 มิลลิลิตร ของ suspension ที่ระดับความเจือจางเหมาะสม เกลี่ยบนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน นับจำนวนโคโลนีและคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วย CFU ต่อกรัมดิน และหาจำนวน heterotrophic microorganism โดยนำ 0.1 มิลลิลิตร ของ suspension ที่ระดับความเจือจางเหมาะสม เกลี่ยบนอาหาร Nutrient agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนสังเกตเห็นโคโลนีชัดเจน นับจำนวนโคโลนีและคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วย CFU ต่อกรัมดิน (Ibekwe *et al.*, 2006)

## วิธีการทดลอง

### 1. การแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

#### 1.1 การแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

เตรียมตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร mineral salt medium (MSM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วันหรือจนกระทั่งเห็นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Mercadé *et al.*, 1996) จากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 1 ลงในอาหารใหม่และทำการเลี้ยงตามวิธีการเดิมอีก 3 ครั้ง (ดัดแปลงจาก Al-Sharidah *et al.*, 2000) เก็บตัวอย่างกลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร MSM ที่ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบขั้นต่อไป

#### 1.2 การคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

ถ่ายเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1.1 ร้อยละ 1 ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

โดยมีชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1

เลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

### 1.3 การหาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยได้

ถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 1.2 ร้อยละ 1 ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1, 3, 5, 7 และ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1

เลือกปริมาณน้ำมันที่กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

## 2. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินของกลุ่มเชื้อที่คัดเลือกได้

เลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้จากข้อ 1.2 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 เป็นแหล่งคาร์บอน ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน แล้วหึ่งแยกเซลล์ (8,500 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส, 20 นาที) ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) 2 ครั้ง แล้วเตรียมเซลล์ suspension ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ  $10^9$  และ  $10^6$  CFU/มิลลิลิตร

### 2.1 ผลของกล้าเชื้อต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

นำดินที่ไม่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมาวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบของดินตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1.2 แล้วแบ่งดินออกเป็น 5 ชุดการทดลอง แต่ละชุดใช้ดิน 500 กรัม ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 14×20×8 เซนติเมตร (ดัดแปลงจาก Dave *et al.*, 1994)

- ชุดการทดลองที่ 1 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 และเติม suspension ของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น  $10^9$  CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ  $10^7$  CFU/กรัมดิน

- ชุดการทดลองที่ 2 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ(121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 และเติม suspension ของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น  $10^6$  CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ  $10^4$  CFU/กรัมดิน

- ชุดการทดลองที่ 3 ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ในปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3

- ชุดการทดลองที่ 4 ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ในปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 และเติม suspension ของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น  $10^6$  CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ  $10^4$  CFU/กรัมดิน

- ชุดการทดลองควบคุม ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3

ทุกชุดการทดลองควบคุมปริมาตรของสารละลายที่เติมในดินให้เท่ากันโดยใช้ น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิดปากภาชนะด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างดินที่วันที่ 0 15 และ 30 วัน เพื่อวิเคราะห์ความชื้น พีเอชและทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 และหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการข้อ 3

เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

## 2.2 ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

นำตัวอย่างดิน 500 กรัม ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด  $14 \times 20 \times 8$  เซนติเมตร โดยเตรียมชุดการทดลองที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 และปรับระดับความชื้นให้ค่าเท่ากับร้อยละ 17 และ 27 ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส, 15 นาที) ปิดปากภาชนะด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างดินที่วันที่ 0 15 และ 30 วัน เพื่อวิเคราะห์ความชื้น พีเอชและทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 และหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการข้อ 3

เลือกความชื้นที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

### 2.3 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลาย น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

เตรียมตัวอย่างดิน 500 กรัม ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 14×20×8 เซนติเมตร โดยเตรียมชุดการทดลองที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ระดับความชื้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 และปรับอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้เท่ากับ 100:10:1 หรือ 100:20:1 หรือ 100:10:5 หรือ 300:10:1 โดยใช้แม่ปุ๋ยไนโตรเจนสูตร 46:0:0 และแม่ปุ๋ยฟอสฟอรัสสูตร 0:46:0 ปิดปากภาชนะด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างดินในวันที่ 0 15 และ 30 วัน เพื่อวิเคราะห์ความชื้น พีเอชและทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 และ 1.2 และหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการข้อ 3

## 3. การเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

### 3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2 มาเลี้ยงในอาหาร MSM และ MSM agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้อง นำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา re-streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดิม 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะต่างๆ ดังนี้

- ลักษณะของโคโลนี
- รูปร่างเซลล์ การเรียงตัว และการติดสีแกรม (Gram staining)

### 3.2 การศึกษาในระดับสปีชีส์

ส่งเชื้อที่คัดเลือกได้ให้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้ทำการเทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

### บทที่ 3

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

##### 1. การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากอุ้งช่อมรดก ปิมน้ำมันในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา สุราษฎร์ธานีและดินบริเวณสถานีไบโอดีเซล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเก็บที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 3 พบว่าลักษณะของตัวอย่างดินเป็นดินร่วนจำนวน 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50), ดินทราย 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 34) และดินเหนียว 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16) ซึ่งลักษณะเนื้อสัมผัสของดินมีผลต่อการแทรกซึมของน้ำมันลงสู่ดิน โดยดินที่มีลักษณะเป็นดินทรายจะทำให้ น้ำมันสามารถซึมผ่านได้ดีกว่าดินร่วนหรือดินเหนียว ดังนั้นน้ำมันจะถูกดูดซับไว้ในอนุภาคของดินได้ดีกว่าและอาจจะมีผลต่อการตรวจพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Márques-Rocha *et al.*, 2001) ดังนั้นการแยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากธรรมชาติจึงควรเลือกดินจากบริเวณที่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันมาก่อนเป็นแหล่งในการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากมีรายงานว่าบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันสูงกว่าบริเวณที่ไม่มีน้ำมันปนเปื้อนร้อยละ 61-67 (Atlas, 1981)



ตารางที่ 3 รายละเอียดการเก็บตัวอย่าง

Table 3. Collected samples details.

Source	Code	Soil texture			Date
		clay	silt	sand	
Motorcycle garage, Hatyai, Songkhla	SC-1	-	+	-	02/ 05/ 2006
Motorcycle garage, Hatyai, Songkhla	SC-2	-	-	+	02/ 05/ 2006
Motorcycle garage, Hatyai, Songkhla	SC-3	-	-	+	02/ 05/ 2006
Motorcycle garage, Hatyai, Songkhla	SC-4	-	+	-	02/ 05/ 2006
Motorcycle garage, Hatyai, Songkhla	SC-5	+	-	-	02/ 05/ 2006
Motorcycle garage, Hatyai, Songkhla	SC-6	-	+	-	02/ 05/ 2006
Motorcycle garage, Hatyai, Songkhla	SC-7	-	+	-	02/ 05/ 2006
Motorcycle garage, Hatyai, Songkhla	SC-8	-	+	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-9	+	-	-	25/ 06/ 2006
Motorcycle garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-10	-	+	-	04/ 06/ 2006
Motorcycle garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-11	-	-	+	04/ 06/ 2006
Motorcycle garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-12	-	-	+	04/ 06/ 2006
Motorcycle garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-13	-	+	-	04/ 06/ 2006
Motorcycle garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-14	-	+	-	04/ 06/ 2006

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (Cont.)

Source	Code	Soil texture			Date
		clay	silt	sand	
Motorcycle garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-15	+	-	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-16	-	+	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-17	-	+	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-18	-	+	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-19	-	+	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-20	+	-	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-21	-	+	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-22	-	+	-	02/ 05/ 2006
Garage, Huasai, Nakhonsithammarat	SC-23	+	-	-	25/ 06/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-24	-	+	-	04/ 06/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-25	-	-	+	04/ 06/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-26	-	-	+	04/ 06/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-27	-	-	+	04/ 06/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-28	-	-	+	04/ 06/ 2006

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (Cont.)

Source	Code	Soil texture			Date
		clay	silt	sand	
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-29	-	+	-	22/ 07/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-30	-	+	+	22/ 07/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-31	-	-	+	22/ 07/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-32	-	-	-	22/ 07/ 2006
Garage, Hatyai, SongKhla	SC-33	+	-	-	22/ 07/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-34	-	+	-	22/ 07/ 2006
Garage, Hatyai, Songkhla	SC-35	+	-	+	22/ 07/ 2006
Bangchak petrol station, Hatyai, Songkhla	SP-1	-	-	+	05/ 06/ 2006
Bangchak petrol station, Hatyai, Songkhla	SP-2	-	-	+	05/ 06/ 2006
Petrol station, Thachana, Suratthani	SP-3	-	-	+	05/ 06/ 2006
Petrol station, Thachana, Suratthani	SP-4	-	-	+	05/ 06/ 2006
Petrol station, Thachana, Suratthani	SP-5	-	-	-	05/ 06/ 2006
Biodeisel station, PSU, Hatyai, Songkhla	SP-6	-	+	-	17/ 06/ 2006
Biodeisel station, PSU, Hatyai, Songkhla	SP-7	-	+	-	17/ 06/ 2006

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (Cont.)

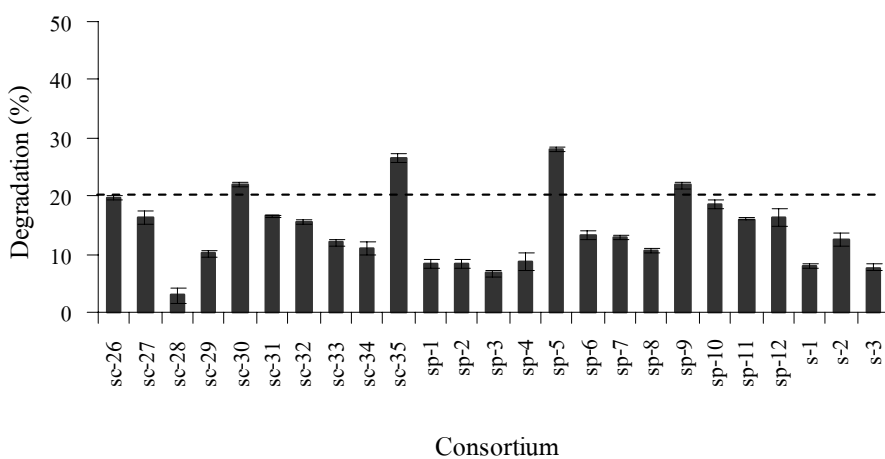
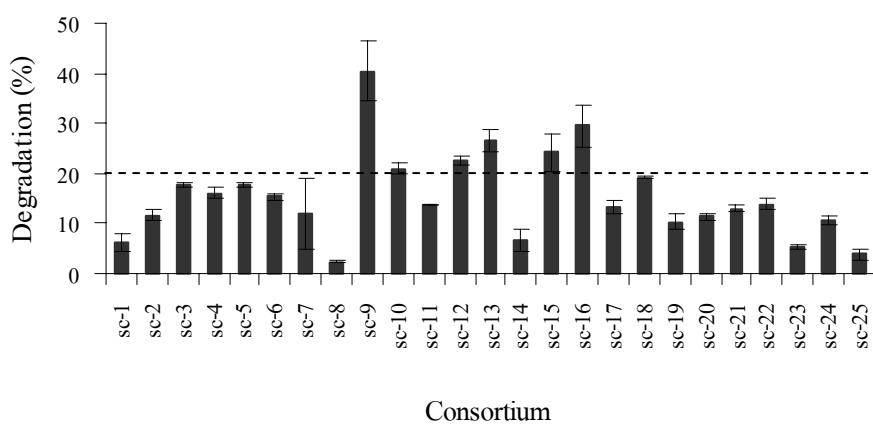
Source	Code	Soil texture			Date
		clay	silt	sand	
Biodeisel station, PSU, Hatyai, Songkhla	SP-8	-	+	-	17/ 06/ 2006
Shell petrol station, Hatyai, Songkhla	SP-9	+	-	-	22/ 07/ 2006
PTT petrol station, Hatyai, Songkhla	SP-10	-	-	+	22/ 07/ 2006
PTT petrol station, Hatyai, Songkhla	SP-11	-	+	-	22/ 07/ 2006
Cartex petrol station, Hatyai, Songkhla	SP-12	-	+	-	22/ 07/ 2006
Prience of Songkhla university, Hatyai, Songkhla	S-1	-	-	+	17/ 06/ 2006
Prience of Songkhla university, Hatyai, Songkhla	S-2	-	+	-	17/ 06/ 2006
Prience of Songkhla university, Hatyai, Songkhla	S-3	-	+	-	17/ 06/ 2006

## 2. การแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

### 2.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

จากการแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากปั้มน้ำมัน อุ้ช่อมรถยนต์ในจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา สุราษฎร์ธานีและสถานีไบโอดีเซล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยวิธี enrichment culture ในอาหาร mineral salt medium (MSM) ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว และทำการถ่ายกล้าเชื้อร้อยละ 1 ลงอาหารใหม่ 3 ครั้ง ทุกๆ 7 วันของการเลี้ยงเชื้อ เพื่อคัดเลือกกลุ่มเชื้อที่มีความสามารถในการเจริญและย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน มี 10 กลุ่มเชื้อ ที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมากกว่าร้อยละ 20 โดยกลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือร้อยละ 40.46 (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณอุ้ช่อมรถในอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งมีการปนเปื้อนของน้ำมันมาเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มเชื้อ SC-9 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยทั่วไปเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดีนั้นโดยส่วนใหญ่มักแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเนื่องจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนทำให้เกิดการคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีความสามารถสูงอยู่ในบริเวณนั้น สอดคล้องกับการทดลองของ Koma และคณะ (2001) ที่แยกเชื้อจากดินปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ salt medium ที่มี *n*-paraffin ร้อยละ 1 ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่าสามารถลดปริมาณน้ำมันได้ร้อยละ 20 หลังจากเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะขึ้นกับสายพันธุ์และองค์ประกอบของน้ำมันด้วย เช่น Jirasripongpun (2002) แยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ 2000 ppm เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าจาก 26 ไอโซเลต ที่แยกได้มี 1 ไอโซเลต คือ strain W9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุดคือ สามารถย่อยสลายสาร saturate, aromatic และ resin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหลังจากเลี้ยงเชื้อ 30 วันได้ร้อยละ 52.46, 38.13 และ 18.81 ตามลำดับ นอกจากนี้ Koma และคณะ (2003) แยกเชื้อจากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และส่วนของ cyclic alkane ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นพื้นฐาน พบว่ามี 2 สายพันธุ์ คือ NDKK48 และ NDKY76A สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ W medium ที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนโดยสายพันธุ์ NDKK48 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และส่วน cyclic alkane ได้ร้อยละ 27 และ

16 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ NDKY76A มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ และส่วน cyclic alkane หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน ได้ร้อยละ 27 และ 18 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Mandri และ Lin (2007) แยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินที่ปนเปื้อน น้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell-Haas ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 พบว่า สามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด 3 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticum*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Flavobacterium* sp. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหลังจาก เลี้ยงเชื้อ 28 วัน ได้ร้อยละ 84, 71 และ 60 ตามลำดับ



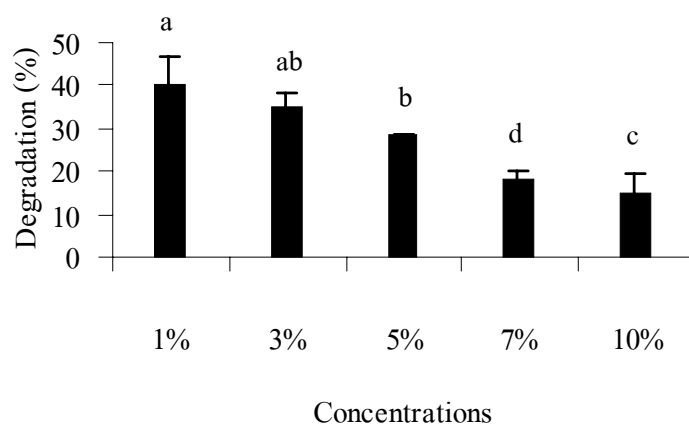
ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน

Figure 3. Biodegradation percentage of waste lubricating oil in mineral salt medium after 5 days degradation by soil consortia. Bars represent the standard deviation from three determinations.

## 2.2 การศึกษาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยได้

เมื่อเลี้ยงกลุ่มเชื้อ SC-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นร้อยละ 1, 3, 5, 7 และ 10 ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน พบว่าที่ความเข้มข้นของไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ร้อยละ 1, 3, 5, 7 และ 10 กลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40.46, 34.92, 28.61, 18.45 และ 15.05 ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 กลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (ภาพที่ 4) ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 1 ในการทดลองขั้นต่อไป การที่เพิ่มความเข้มข้นของไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลงอาจจะเนื่องมาจากไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำทำให้กลุ่มเชื้อมีแหล่งอาหารคาร์บอนไม่เพียงพอหรือปิดกั้นออกซิเจนที่ต้องการใช้ นอกจากนี้สารที่ปนเปื้อนมากับน้ำมันเช่น โลหะหนัก (Leathy and Colwell, 1990) อาจส่งผลต่อการเจริญและการย่อยสลายของจุลินทรีย์ได้ เช่น Adenipekun และ Fasidi (2005) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินที่เติมน้ำมันดิบความเข้มข้นร้อยละ 1, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 โดยเชื้อรา *Lentinus subnudus* พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันดิบร้อยละ 20 จะมีอัตราการย่อยสลายสูงสุดคือลดลงจาก 257 กรัมต่อกิโลกรัมดิน เหลือเพียง 198 และ 125 กรัมต่อกิโลกรัมดิน หลังทำการบ่มเป็นเวลา 3 และ 6 เดือน ขณะที่การใช้ความเข้มข้นของน้ำมันดิบร้อยละ 40 มีอัตราการย่อยสลายสูงสุดหลังจากบ่มเป็นเวลา 6 เดือน โดยลดลงจาก 337 กรัมต่อกิโลกรัมดิน เหลือ 165 กรัมต่อกิโลกรัมดิน จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของไขมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงๆ กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์บางกลุ่มมีประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มขึ้นน่าจะมีผลมาจากสาร intermediate ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายซึ่งเชื้อบางสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มเชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญและผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้ออื่นๆ ในกลุ่มเชื้อ (Atlas and atlas, 1991) นอกจากนี้การที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดีขึ้นแล้วนั้นแต่อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงเกินไปก็อาจยับยั้งการเจริญทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลงได้ (Del'Arco and Franca, 2001)





ภาพที่ 4 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่อการย่อยสลายโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ SC-9 ในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

Figure 4. Effect of waste lubricating oil concentration on degradation by SC-9 consortia in mineral salt medium after 5 days. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3. การเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Nutrient agar สามารถแยกได้ 4 ไอโซเลต ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันและแบ่งตามลักษณะการติดสีแกรม (Gram staining) ได้แบคทีเรียแกรมบวก 2 ไอโซเลต คือ SC9-1 และ SC9-3 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ไอโซเลต คือ SC9-2 และ SC9-4 โดยไอโซเลต SC9-1, SC9-3 และ SC9-4 เซลล์มีรูปร่างแท่ง (rod) ส่วนไอโซเลต SC9-2 มีรูปร่างกลม (cocci) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต มา streak บนอาหารแข็ง MSM ที่มีการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 พบว่ามีเพียง SC9-2 และ SC9-4 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลตนี้มีหน้าที่หลักในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในช่วงแรกและเมื่อมีสาร intermediate เกิดขึ้น ไอโซเลต SC9-1 และ SC9-3 จึงทำหน้าที่ในการย่อยสลายต่อไป อย่างไรก็ตามสมมุติฐานนี้ควรมีการพิสูจน์ต่อไปในอนาคต ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่พบมีทั้งโคโลนีแบนราบและนูน สีของโคโลนีมีทั้งโคโลนีสีขาว ขุ่นและเหลือง (ตารางที่ 4) เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ของทั้ง 4 ไอโซเลตโดย 16S rDNA พบว่า ไอโซเลต SC9-1 มีความใกล้เคียงร้อยละ 98 กับเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ไอโซเลต SC9-2 มีความใกล้เคียงร้อยละ 95 กับเชื้อ *Sphingobacterium multivorum* ไอโซเลต SC9-3 มีความใกล้เคียงร้อยละ 100 กับเชื้อ *Bacillus cereus* และไอโซเลต SC9-4 มีความใกล้เคียงร้อยละ 100 กับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ดังแสดงในตารางที่ 5 และสามารถสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ดังแสดงในภาพที่ 5 จากผลของ 16S rDNA และแผนภูมิต้นไม้ของไอโซเลต SC9-2 ซึ่งมีความเหมือนร้อยละ 95 กับเชื้อ *Sphingobacterium multivorum* หลังจากใช้โปรแกรม Blast แต่เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ผลที่ได้กลับมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas* sp. มากกว่า ซึ่งผลที่ได้นี้อาจจะเนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA ใช้ sequence ประมาณ 400 bp มีความเหมือนเพียงร้อยละ 95 ซึ่งค่อนข้างต่ำ ดังนั้นหากต้องการให้ได้ความเหมือนที่มากกว่านี้ควรวิเคราะห์แบบ full length ประมาณ 1500 bp หรืออาจใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลอื่นๆ มาช่วยในการเทียบเคียงสายพันธุ์ของเชื้อเช่น DNA-DNA hybridization หรือการทำ fatty acid profile จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วพบว่ามีทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Jirasripongpon (2002) ที่คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วพบว่ามี 5 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายมากกว่าร้อยละ 20 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 4 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ 1 ไอโซเลต เมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็นเชื้อ *Nocardia simplex*, *Gordonia terrae*, *Rhodococcus* sp. และ *Pseudomonas mandelii* ขณะที่ Mandri และ Lin (2007) คัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell-

Haas ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด 3 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบคือ *Acinetobacter calcoaceticum*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Flavobacterium* sp. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายร้อยละ 84, 71 และ 60 ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อ 28 วัน ซึ่งต่างจาก Mercadé และคณะ (1996) คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ร้อยละ 65 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็น *Pseudomonas*, *Serratia*, *Escherichai*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Alcaligenes* และ *Acinetobacter* ส่วน Koma และคณะ (2001) คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย *n*-paraffin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือเชื้อ *Acinetobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จะเห็นได้ว่าโอกาสในการพบแบคทีเรียแกรมลบในที่ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อาจจะเป็นเนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมี outer membrane ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นสารในกลุ่มฟอสโฟลิปิดซึ่งมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำจึงทำให้มีหน้าที่เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวทำให้เชื้อสามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำได้ดีขึ้น (Desai and Banat, 1997)

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 : (a) เจริญบนอาหาร Nutrient agar, (b) เจริญบนอาหาร mineral salt medium agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1

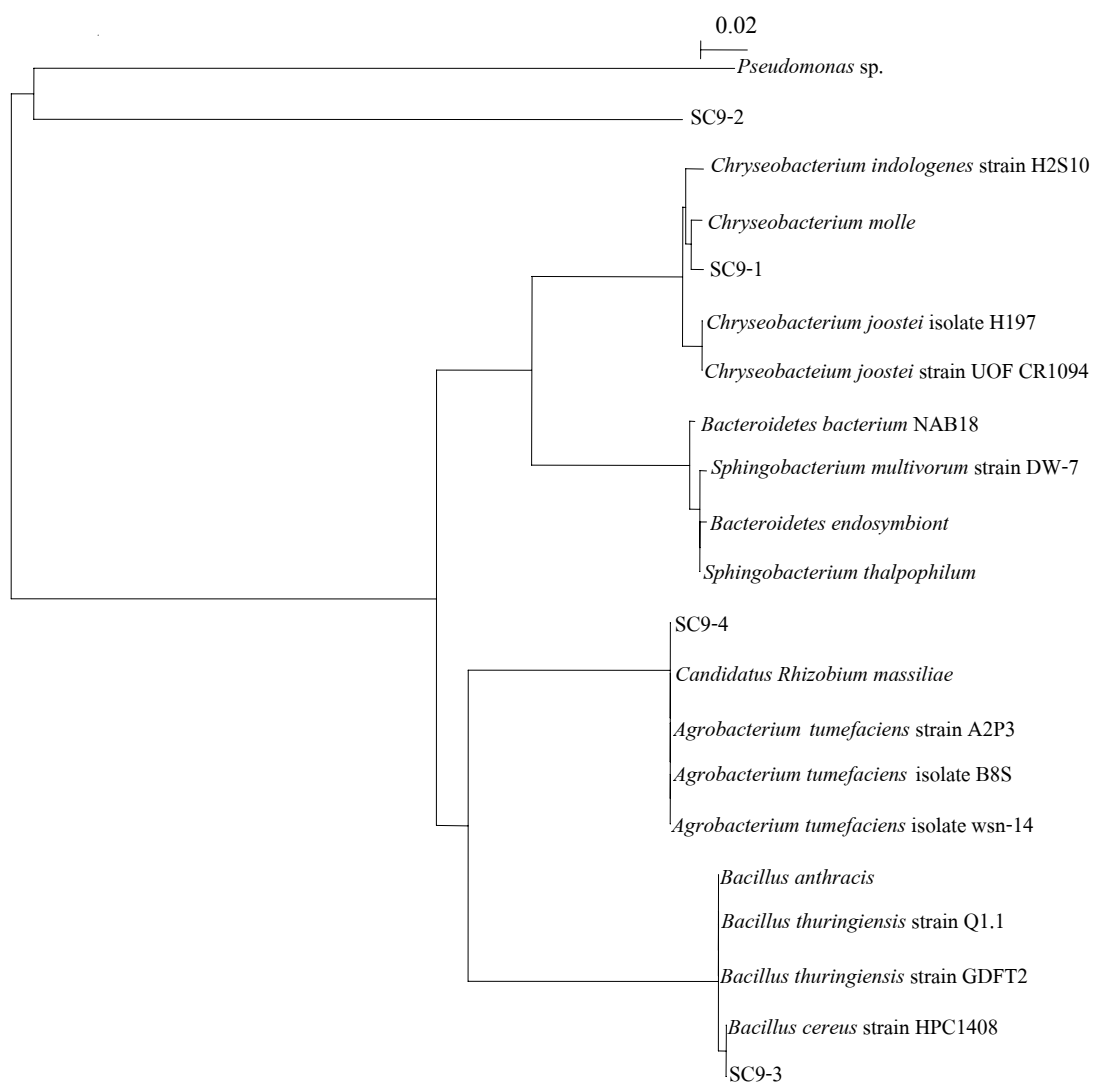
Table 4. Bacterial morphology isolated from SC-9 consortia: (a) growth on nutrient agar, (b) growth on mineral salt medium agar supplemented with 1% waste lubricating oil.

Isolates	Cell morphology	Colony morphology
SC9-1 <sup>a</sup>	gram positive, rod	dark-yellow, circular, convex, smooth edge, opaque
SC9-2 <sup>a,b</sup>	gram negative, cocci	yellow, circular, flat, smooth edge, opaque
SC9-3 <sup>a</sup>	gram positive, rod	off-white, circular, convex, erose edge, opaque
SC9-4 <sup>a,b</sup>	gram negative, rod	white, circular, flat, smooth edge, opaque

ตารางที่ 5 ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 โดย 16S rDNA

Table 5. Identification of bacterial isolated from SC-9 consortia by 16S rDNA sequencing.

Isolates	Closest strain	Sequence homology (%)
SC9-1	<i>Chryseobacterium</i> sp.	98
SC9-2	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	95
SC9-3	<i>Bacillus cereus</i>	100
SC9-4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100



ภาพที่ 5 แผนภูมิต้นไม้ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SC9-1, SC9-2, SC9-3 และ SC9-4

Figure 5. Phylogenetic tree of strain SC9-1, SC9-2, SC9-3 and SC9-4.

#### 4. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

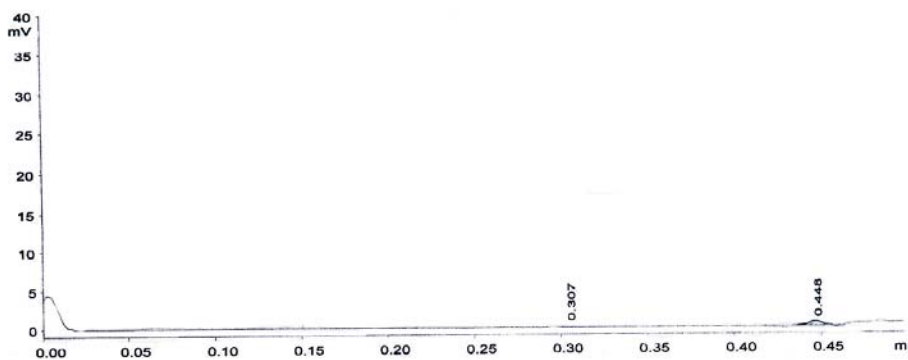
##### 4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของดิน

ในการทดลองครั้งนี้ได้นำดินที่ไม่เคยมีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยเก็บตัวอย่างมาจากดินในสวนต้นไม้ อำเภอรัษฎุมิ จังหวัดสงขลา มาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของดิน (ตารางที่ 6) พบว่าตัวอย่างดินถูกจำแนกเป็นดินชนิด sandy loam ซึ่งประกอบด้วยดินเหนียว (clay) ร้อยละ 19.04, ดินร่วน (silt) ร้อยละ 24.05 และดินทราย (sand) ร้อยละ 56.92 จากลักษณะเนื้อสัมผัสของดินสามารถบ่งชี้ได้ว่าอากาศและน้ำสามารถแทรกซึมผ่านชั้นดินได้ดีปานกลางซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดในการเคลื่อนย้ายของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในดิน (Márques-Rocha *et al.*, 2001) เมื่อพิจารณาปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในดินมีอัตราส่วนเริ่มต้นเท่ากับ 100:5:0.01 จะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในดินค่อนข้างต่ำซึ่งไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Ayotamuno *et al.*, 2006) นอกจากนี้ค่าพีเอชและความชื้นของดินขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและแร่ธาตุที่มีอยู่ในดิน (Dibble and Bartha, 1979) และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารไฮโดรคาร์บอนในส่วน aromatic hydrocarbon, resin และ asphaltene ของดินพบว่ามีส่วนประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนอยู่ในดินที่นำมาทดลองปริมาณน้อยมากซึ่งการวิเคราะห์ด้วย TLC/FID ไม่สามารถอินทิเกรตหาพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมออกมาได้ (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 6 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างดิน

Table 6. Physical and chemical characteristics of soil sample.

Property	Value
Texture	Sandy loam
Clay (%)	19.04
Silt (%)	24.05
Sand (%)	56.92
pH	5.03
Moisture content (%)	3.85
Organic matter (%)	2.54
Total N (%)	0.13
Available P (%)	0.00023



ภาพที่ 6 TLC/FID โครมาโตแกรมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเริ่มต้นในดินที่ใช้ในการทดลอง  
Figure 6. TLC/FID chromatogram of initial hydrocarbon components in soil.

#### 4.2 ผลของกลุ่มเชื้อ SC-9 ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

นำดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมาเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1 กรัมต่อ 100 กรัมดิน และเติมกล้าเชื้อของกลุ่มเชื้อ SC-9 ให้มีจำนวนเชื้อ  $10^7$  และ  $10^4$  CFU ต่อกรัมดิน ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ชุดการทดลองผลของกลุ่มเชื้อ SC-9 ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน

Table 7. Experimental conditions of effect of SC-9 consortia on waste lubricating oil degradation in soil.

Treatment	Sterilized soil	1% Waste lubricating oil	SC-9 consortia (CFU/g soil)	
			$10^7$	$10^4$
1	+	+	+	-
2	+	+	-	+
3	-	+	-	-
4	-	+	-	+
5	+	+	-	-

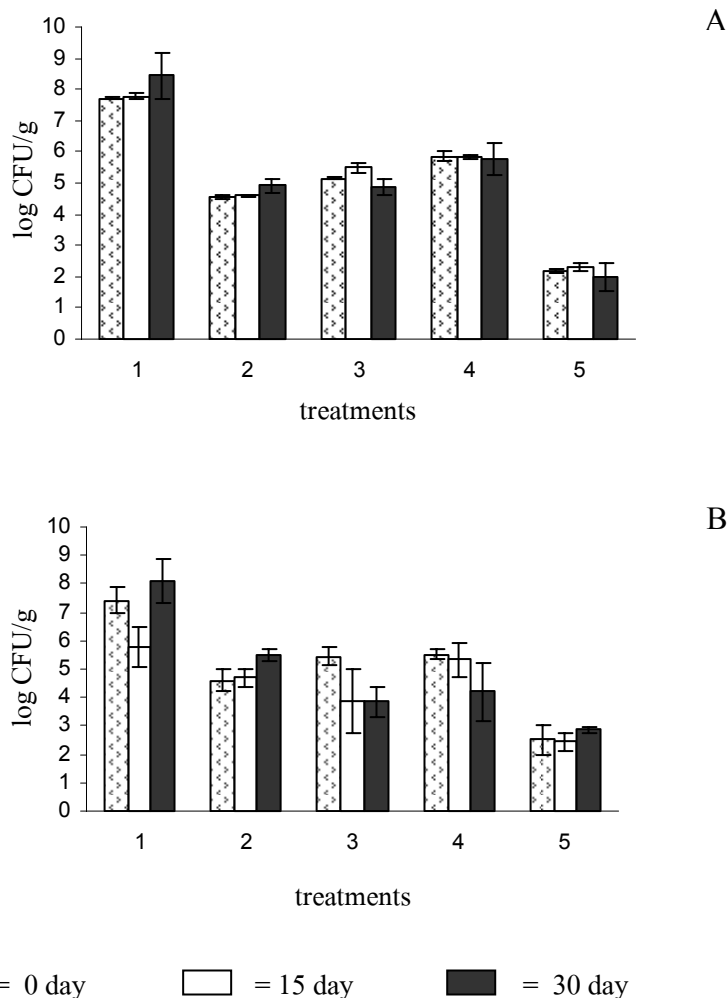
Symbols : + using sterilized soils or addition of 1% waste lubricating oil or addition of SC-9 consortia.

- not using sterilized soils or no addition of 1% waste lubricating oil or no addition of SC-9 consortia.

เมื่อพิจารณาจำนวนเชื้อ heterotrophic bacteria หลังจากการย่อยสลาย 30 วัน พบว่าทุกชุดการทดลองมีจำนวนเชื้อเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก โดยชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมจุลินทรีย์ลงไป  $10^7$  และ  $10^4$  CFU/g มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 7.71 log CFU/g เป็น 8.44 log CFU/g และจาก 4.55 log CFU/g เป็น 4.92 log CFU/g ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 3 ที่ใช้ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่มีการเติมจุลินทรีย์ลงไป ในช่วง 15 วันแรกจำนวนเชื้อ heterotrophic bacteria เพิ่มขึ้นจาก 5.16 log CFU/g เป็น 5.50 log CFU/g และลดลงเป็น 4.86 log CFU/g ในวันที่ 30 ของการบ่ม เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 4 ส่วนในชุดการทดลองที่ 5 ซึ่งใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่มีการเติมกลุ่มเชื้อลงไปจำนวนเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (ภาพที่ 7A)



จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในชุดการทดลองที่ 1 มีจำนวนเชื้อสูงสุด โดยช่วง 15 วันแรกมีจำนวนลดลงจากเดิมประมาณ  $1.5 \log \text{ CFU/g}$  และหลังจากวันที่ 30 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพิ่มจำนวนเป็น  $8.1 \log \text{ CFU/g}$  เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2 จำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นจาก  $4.59 \log \text{ CFU/g}$  เป็น  $5.48 \log \text{ CFU/g}$  ส่วนชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ใช้ดินที่ไม่มีสารฆ่าเชื้อ จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วลดลงอย่างมากโดยเฉพาะในชุดการทดลองที่ 4 จำนวนเชื้อลดลงจาก  $5.53 \log \text{ CFU/g}$  เป็น  $4.20 \log \text{ CFU/g}$  (ภาพที่ 7B) อาจจะเป็นเนื่องมาจากการแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ประจำถิ่นกับกล้าเชื้อที่เติมลงไปต้องอาศัยเวลาในการปรับตัวให้เหมาะสมต่อสภาวะแวดล้อมส่งผลให้การเพิ่มจำนวนเป็นไปอย่างช้าๆ (Baker *et al*, 1994) ส่วนชุดการทดลองที่ 5 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก จากผลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด และอัตราการย่อยสลายจะมีแนวโน้มสูงขึ้นถ้าในดินมีเชื้อที่สามารถย่อยน้ำมันอยู่ในปริมาณที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับ Ghazali และคณะ (2004) ที่ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยนำดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเติมกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นร้อยละ 10 ซึ่งประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa* strain S4.1, strain S53, *Bacillus* sp. strain S3.2, strain 113i, strain O63 และ *Micrococcus* sp. strain S พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก  $5.13 \times 10^7 \text{ CFU/g}$  เป็น  $7.76 \times 10^8 \text{ CFU/g}$  หลังจากบ่มเป็นเวลา 15 วัน และลดจำนวนเป็น  $1.38 \times 10^8 \text{ CFU/g}$  หลังจากบ่ม 30 วัน ส่วน Vasudevan และ Rajaram (2001) ศึกษาการย่อยสลาย sludge oil ที่ปนเปื้อนในดินโดยเติมกล้าเชื้อผสมของแบคทีเรีย พบว่าจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นจาก  $1 \times 10^7 \text{ CFU/g}$  เป็น  $2 \times 10^{10} \text{ CFU/g}$  หลังจากบ่มเป็นเวลา 90 วัน และให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย sludge oil ร้อยละ 40



ภาพที่ 7 ผลของการเติมกลุ่มเชื้อ SC-9 ต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ 0, 15 และ 30 วัน ของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1; (A) จำนวน heterotrophic bacteria, (B) จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

treatment 1 ดินฆ่าเชื้อ+ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^7$  CFU/g

treatment 2 ดินฆ่าเชื้อ+ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g

treatment 3 ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

treatment 4 ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g

treatment 5 ดินฆ่าเชื้อ+ น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

Figure 7. Effects of SC-9 consortia on number of microorganisms presented in each treatment at 0, 15 and 30 day of degradation of 1% waste lubricating oil in soil; (A) heterotrophic microorganism, (B) waste lubricating oil degrading bacteria. Bars represent the standard deviation from three determinations.

treatment 1 sterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^7$  CFU/g)

treatment 2 sterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g)

treatment 3 nonsterilized soil + waste lubricating oil

treatment 4 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g)

treatment 5 sterilized soil + waste lubricating oil

เมื่อพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยวิธี weight loss และวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วย TLC/FID พบว่าสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 3 ชนิดคือ aromatic hydrocarbon, resin และ asphaltene ซึ่งมี retention time คือ 0.212, 0.349 และ 0.441 ตามลำดับ ผลจากการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อจุลินทรีย์  $10^4$  CFU/g ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือร้อยละ 43.79 และมีการลดลงของปริมาณสาร aromatic hydrocarbon, resin และ asphaltene คิดเป็นร้อยละ 96.55, 97.94 และ 53.37 ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ 4 ที่ใช้ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อจุลินทรีย์  $10^4$  CFU/g ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40.77 และมีการลดลงของปริมาณสาร aromatic hydrocarbon, resin และ asphaltene คิดเป็นร้อยละ 93.13, 100 และ 70.07 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) รูปแบบการลดลงของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วแสดงดังภาพที่ 7 ส่วนชุดการทดลองที่ 3 และ 5 ซึ่งไม่มีการเติมกล้าเชื้อลงในดินทั้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่มีการฆ่าเชื้อ พบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วลดลงประมาณครึ่งหนึ่งของชุดที่มีการเติมกลุ่มเชื้อคือเหลือร้อยละ 20.48 และ 24.36 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Dave และคณะ (1994) ศึกษาการย่อยสลาย slop oil ที่ปนเปื้อนในดินโดยนำดินที่ปนเปื้อน slop oil ผ่านการฆ่าเชื้อมาเติมกล้าเชื้อผสมของจุลินทรีย์  $10^6$  CFU/g เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้ดินไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อผสมของจุลินทรีย์ในปริมาณที่เท่ากัน พบว่าชุดการทดลองที่ใช้ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 71 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการ

ทดลองที่ใช้ดินผ่านการฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 70 หลังจากบ่ม 30 วัน จากการจำลองสภาวะการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินจะเห็นว่าชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 4 ที่มีการเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์จะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงกว่าชุดการทดลองที่ 3 และ 5 ซึ่งไม่มีการเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้เนื่องมาจากกลุ่มเชื้อ SC-9 ที่เติมลงไปนั้นแยกได้จากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมาก่อนและใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์จึงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ที่มีอยู่ในดินเริ่มต้น เมื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ซึ่งใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์จำนวน  $10^7$  CFU/g และ  $10^4$  CFU/g ตามลำดับ พบว่าชุดการทดลองที่ 2 จำนวนเชื้อมีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงกว่าชุดการทดลองที่ 1 อาจจะเป็นเนื่องมาจากการเติมกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ SC-9 ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะส่งผลให้อัตราการย่อยสลายเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสาร intermediate อื่นๆ ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้หรืออาจรวมตัวกับ humic substance ในดิน (Vacca *et al.*, 2005) เป็นสารเชิงซ้อนซึ่งยากต่อการย่อยสลายและอาจจะเป็นพิษต่อตัวเซลล์ ดังนั้นการเติมกล้าเชื้อในปริมาณที่สูงจะมีอัตราการย่อยสลายเกิดขึ้นเร็วจริงแต่การสะสมของสารเชิงซ้อนที่ย่อยสลายยากก็เพิ่มสูงขึ้นเช่นกันเป็นผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลง

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชและค่าความชื้นในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 9) โดยการลดลงของค่าพีเอชอาจจะเป็นเนื่องมาจากการเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมการย่อยสลายที่เกิดขึ้น โดยเมื่อจุลินทรีย์มีการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะมีการปล่อยประจุของโปรตอนออกมา (Yu *et al.*, 2005) จึงทำให้พีเอชลดลง ส่วนความชื้นที่ลดลงหลังสิ้นสุดการทดลองเกิดจากการระเหยของน้ำเนื่องจากไม่ใช้การทดลองแบบระบบปิด จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่าชุดการทดลองที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินคือ ชุดการทดลองที่ 2 และ 4 โดยให้ประสิทธิภาพมากกว่าร้อยละ 40 เพื่อความเหมาะสมต่อสภาพการใช้งานจริงในสิ่งแวดล้อมดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ชุดการทดลองที่ 4 คือใช้ดินไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์  $10^4$  CFU/g เพื่อใช้ทดลองในขั้นต่อไป

ตารางที่ 8 ผลของกลุ่มเชื้อ SC-9 ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินในวันที่ 30

Table 8. Effect of SC-9 consortia on degradation of waste lubricating oil in soil after 30 days.

Treatments	Weight loss (%)	Degradation of waste lubricating oil (%)		
		Aromatics	Resins	Asphaltenes
1	34.06±0.05 <sup>b</sup>	91.56	97.86	11.55
2	43.79±0.09 <sup>a</sup>	96.55	97.74	53.37
3	20.48±0.25 <sup>c</sup>	57.04	0	56.65
4	40.77±0.06 <sup>a</sup>	93.13	100	70.07
5	24.48±0.12 <sup>d</sup>	64.42	0	68.70

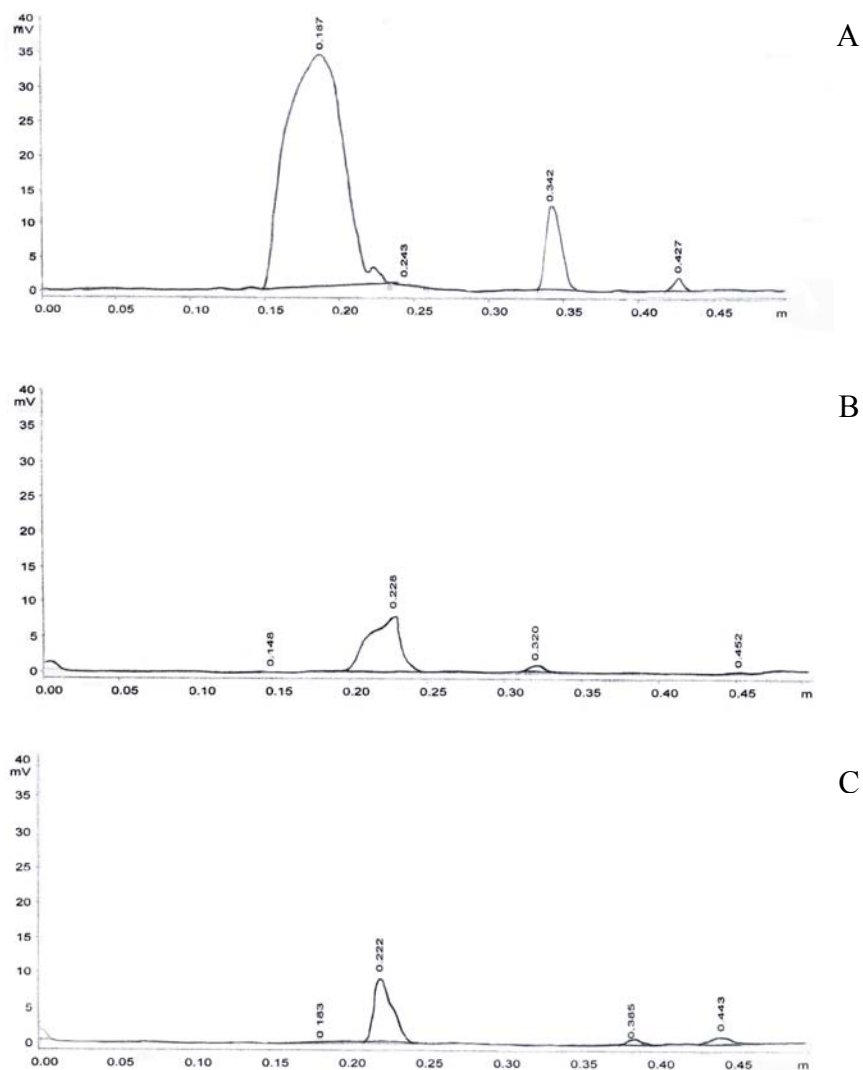
\* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01)

\* Different letters in the same column indicate significant differences (p<0.01).

ตารางที่ 9 ค่าพีเอชและความชื้นที่ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9

Table 9. pH and moisture content of soil in each treatments after degradation of waste lubricating oil in soil at 30 days by SC-9 consortia.

Treatments	pH		Moisture content (%)	
	initial	final	initial	final
1	5.26±0.14	5.35±0.13	17.60±0.20	15.77±0.15
2	5.04±0.10	5.15±0.03	17.63±0.64	15.87±0.57
3	5.26±0.06	5.06±0.07	17.87±0.45	16.20±0.30
4	5.33±0.15	5.17±0.09	17.47±0.49	16.43±0.67
5	5.19±0.09	4.90±0.05	17.80±0.17	16.33±0.42



ภาพที่ 8 TLC-FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของชุดการทดลองที่ 4 (ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g)

Figure 8. TLC-FID chromatogram of waste lubricating oil after extracted from soil microcosm in treatment 4 (nonsterilized soil + waste lubricating oil +  $10^4$  CFU/g of SC-9).

A = 0 day of degradation

B = 15 days of degradation

C = 30 days of degradation

Note: Aromatic hydrocarbon (RT =  $0.212 \pm 0.02$ ), resin (RT =  $0.349 \pm 0.03$ ) and asphaltene (RT =  $0.441 \pm 0.01$ )

### 4.3 ผลของความชื้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9

นำดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมาเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้น 1 กรัมต่อ 100 กรัมดิน และเติมกล้าเชื้อของกลุ่มเชื้อ SC-9 ให้มีจำนวนเชื้อ  $10^4$  CFU ต่อกรัมดิน ทำการปรับระดับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17, 27 และไม่ปรับความชื้น (ดินมีความชื้นร้อยละ 3.85) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ชุดการทดลองผลของความชื้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9

Table 10. Experimental conditions of effect of moisture content on waste lubricating oil degradation in soil by SC-9 consortia.

Treatment	Sterilized soil	1% Waste lubricating oil	SC-9 consortia ( $10^4$ CFU/g)	Moisture content (%)	
				17	27
1	-	+	+	-	-
2	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+

Symbols : + using sterilized soils or addition of 1% waste lubricating oil or addition of SC-9 consortia or adjusted of moisture content.

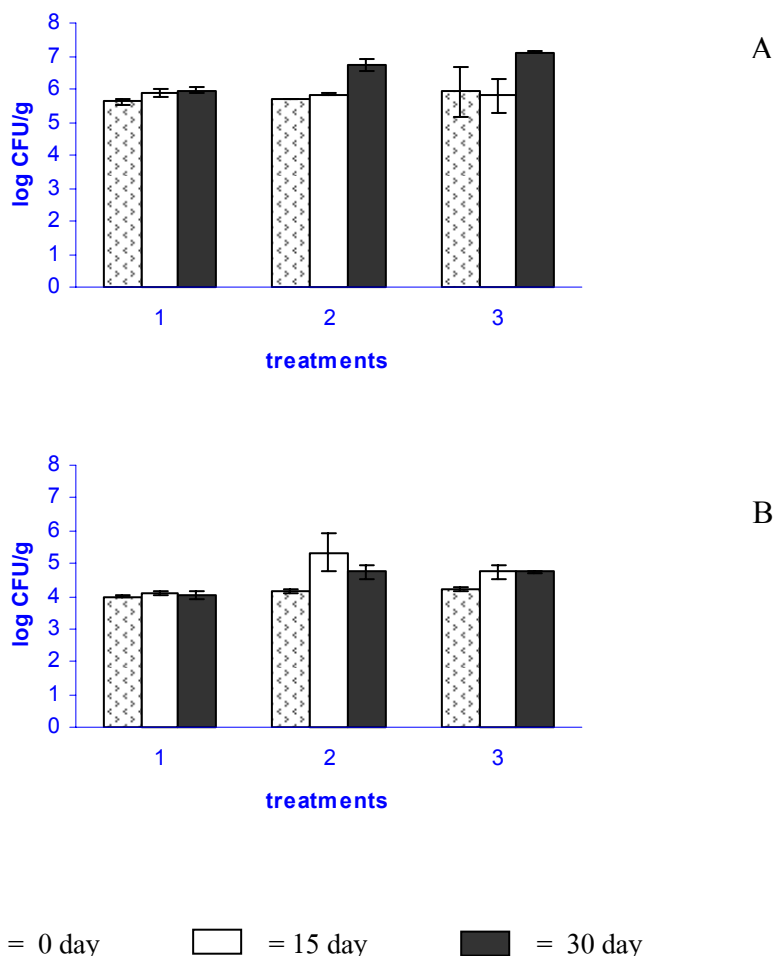
- not using sterilized soils or no addition of 1% waste lubricating oil or no addition of SC-9 consortia or adjusted of moisture content.

เมื่อพิจารณาจำนวนเชื้อ heterotrophic bacteria พบว่าจำนวนเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งมีการปรับให้ดินมีระดับความชื้นเป็นร้อยละ 17 และ 27 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นจาก  $5.69 \log$  CFU/g เป็น  $6.71 \log$  CFU/g และจาก  $5.91 \log$  CFU/g เป็น  $7.12 \log$  CFU/g ตามลำดับ หลังจากบ่มเป็นเวลา 30 วัน ขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งดินมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 3 และไม่มีการปรับระดับความชื้นพบว่าจำนวนเชื้อ heterotrophic bacteria มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก (ภาพที่ 9A)

จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในทุกชุดการทดลองพบว่าเพิ่มขึ้นใน 15 วันแรกและลดลงหลังจากบ่ม 30 วัน โดยชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งปรับให้ดินมี

ความชื้นร้อยละ 17 มีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงสุดโดยเพิ่มจาก 4.15 log CFU/g เป็น 5.34 log CFU/g หลังจากบ่ม 15 วัน และลดจำนวนเป็น 4.74 log CFU/g เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งปรับให้ดินมีความชื้นเป็นร้อยละ 27 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 4.22 log CFU/g เป็น 4.74 log CFU/g หลังจากบ่ม 15 วัน และลดจำนวนลงเล็กน้อยเมื่อครบ 30 วันของการบ่ม เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีความชื้นเริ่มต้นประมาณร้อยละ 3 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดคือ จาก 3.99 CFU/g เป็น 4.07 CFU/g หลังจากบ่ม 15 วัน และลดจำนวนลงเป็น 4.03 CFU/g ที่ 30 วันของการบ่ม (ภาพที่ 9B) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเพิ่มจำนวนของเชื้อ heterotrophic bacteria และ จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะเป็นไปอย่างรวดเร็วในชุดการทดลองที่ปรับระดับความชื้นเนื่องจากความชื้นในดินจะทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านสารอาหาร ออกซิเจนและสาร intermediate (Baker and Diane, 1994) จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถนำสารเหล่านั้นไปใช้ในกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ง่ายและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามถ้าความชื้นในดินสูงเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลงเนื่องจากช่องว่างในอนุภาคดินจะถูกแทนที่ด้วยน้ำทำให้เกิดสภาพไร้อากาศซึ่งโดยทั่วไปการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสภาพมีอากาศจะเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าในสภาพไม่มีอากาศ (Borresen and Rike, 2007)





ภาพที่ 9 ผลของความชื้นต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ 0, 15 และ 30 วัน ของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1; (A) จำนวน heterotrophic bacteria, (B) ปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

- treatment 1 ดินไม่มาเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g ไม่ปรับความชื้น
- treatment 2 ดินไม่มาเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17
- treatment 3 ดินไม่มาเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 27

Figure 9. Effects of moisture content on number of microorganisms presented in each treatment at 0, 15 and 30 day of degradation of 1% waste lubricating oil in soil; (A) heterotrophic

microorganism, (B) waste lubricating oil degrading bacteria. Bars represent the standard deviation from three determinations.

treatment 1 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g)

treatment 2 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g) +  
adjusted moisture content of soil to 17%

treatment 3 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g) +  
adjusted moisture content of soil to 27%

เมื่อพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยวิธี weight loss และวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วย TLC/FID พบว่าสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วคือ aromatic hydrocarbon และ asphaltene ซึ่งมี retention time คือ 0.182 และ 0.431 ตามลำดับ (ภาพที่ 10A) ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ 2 ปรับระดับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17 ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือร้อยละ 43.20 และมีการลดลงของปริมาณสาร aromatic hydrocarbon และ asphaltene คิดเป็นร้อยละ 43.13 และ 70.07 ตามลำดับ การลดลงของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วแสดงดังภาพที่ 10 ขณะที่ชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งปรับระดับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 27 ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายต่ำสุดคือร้อยละ 22.40 และมีการลดลงของปริมาณสาร aromatic hydrocarbon คิดเป็นร้อยละ 53.55 และ asphaltene ลดลงร้อยละ 100 ส่วนชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งไม่ปรับความชื้นและมีความชื้นเริ่มต้นของดินร้อยละ 3 พบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 37.10 และมีการลดลงของสารประกอบ aromatic hydrocarbon และ asphaltene คิดเป็นร้อยละ 41.31 และ 67.54 ตามลำดับ หลังจากบ่ม 30 วัน (ตารางที่ 11)

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชและค่าความชื้นในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 12) จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่าชุดการทดลองที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินคือ ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ดินไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์  $10^4$  CFU/g ปรับระดับความชื้นในดินเป็นร้อยละ 17 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 11 ผลของความชื้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9 ในวันที่ 30

Table 11. Effect of moisture content of soil on degradation of waste lubricating oil by SC-9 consortia after 30 days.

Treatments	Weight loss (%)	Degradation of waste lubricating oil (%)	
		Aromatics	Asphaltenes
1	37.10±0.04 <sup>b</sup>	41.31	67.54
2	43.20±0.15 <sup>a</sup>	43.13	70.07
3	22.40±0.15 <sup>c</sup>	53.55	100

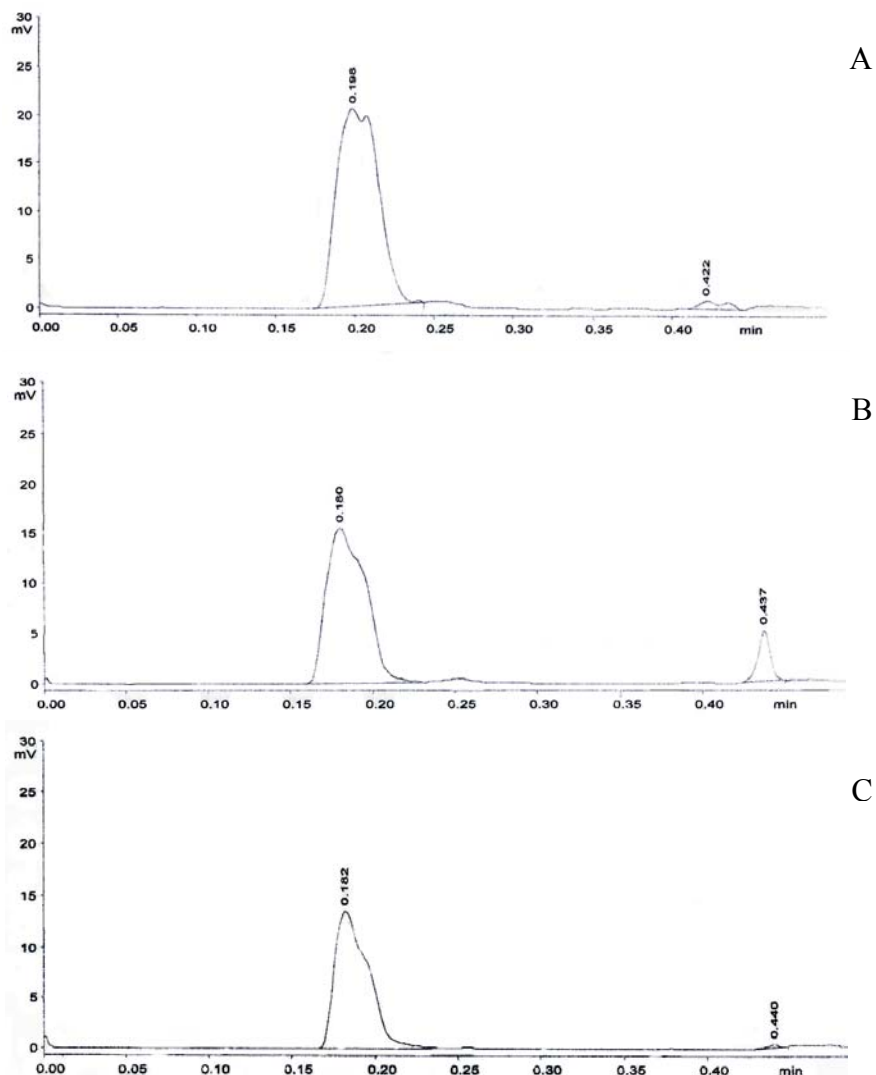
\* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

\* Different letters in the same column indicate significant differences (p<0.05).

ตารางที่ 12 ค่าพีเอชและความชื้นที่ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9

Table 12. pH and moisture content of soil in each treatments after degradation of waste lubricating oil in soil at 30 days by SC-9 consortia.

Treatments	pH		Moisture content (%)	
	initial	final	initial	final
1	5.48±0.04	5.18±0.08	3.14±0.07	2.99±0.09
2	5.33±0.15	5.17±0.09	17.36±0.21	15.87±0.47
3	5.48±0.03	5.10±0.02	27.70±0.57	24.55±0.21



ภาพที่ 10 TLC-FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของชุดการทดลองที่ 2 (ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17)

Figure 10. TLC-FID chromatogram of waste lubricating oil after extracted from soil microcosm in treatment 2 (nonsterilized soil + waste lubricating oil +  $10^4$  CFU/g of SC-9 + adjusted moisture content of soil to 17%).

A = 0 day of degradation

B = 15 days of degradation

C = 30 days of degradation

Note: Aromatic hydrocarbon (RT =  $0.182 \pm 0.03$ ) and asphaltene (RT =  $0.431 \pm 0.05$ )

### 4.3 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมัน หล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9

นำดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมาเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และเติมกล้าเชื้อของกลุ่มเชื้อ SC-9 ให้มีจำนวนเชื้อ  $10^4$  CFU/g ปรับระดับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17 และทำการปรับอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (C:N:P) ให้มีอัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ชุดการทดลองผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน: ไนโตรเจน: ฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9

Table 13. Experimental condition of effect of C:N:P on waste lubricating oil degradation in soil by SC-9 consortia.

Treatment	Sterilized soil	1% Waste lubricating oil	SC-9 consortia ( $10^4$ CFU/g)	17% Moisture content	Nutrient ratio (C:N:P)
1	-	+	+	+	100:10:1
2	-	+	+	+	100:20:1
3	-	+	+	+	100:10:5
4	-	+	+	+	300:10:1
5	-	+	+	+	Non-fertilized

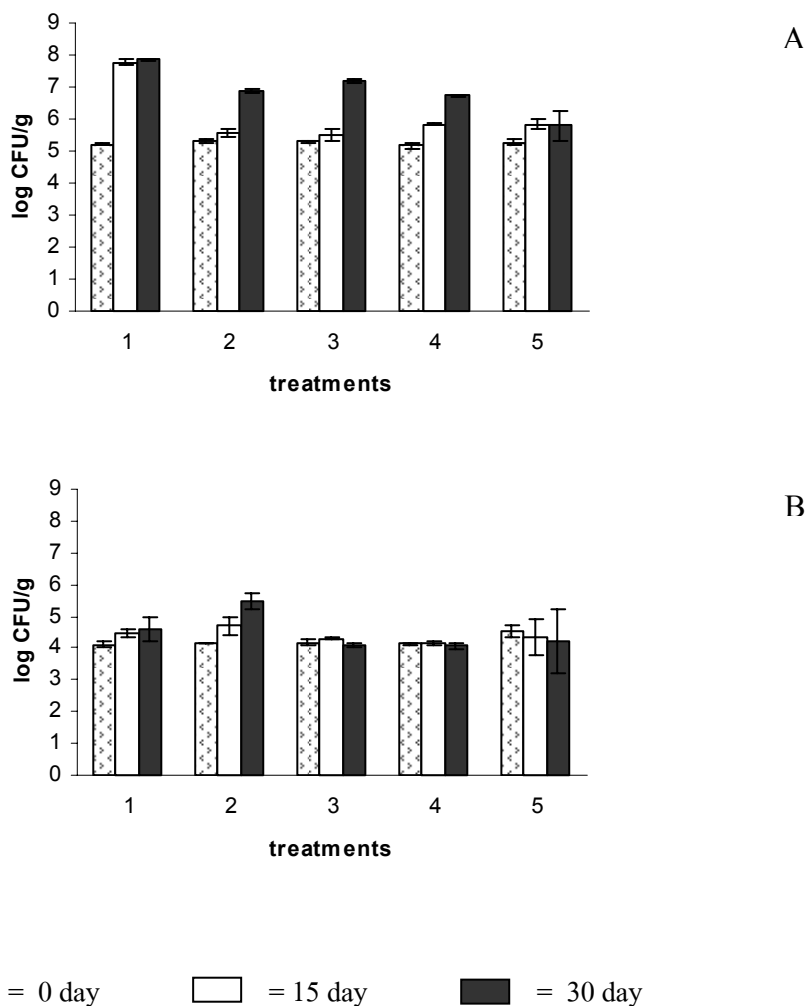
Symbols : + using sterilized soils or addition of 1% waste lubricating oil or addition of SC-9 consortia or adjusted of moisture content.

- not using sterilized soils or no addition of 1% waste lubricating oil or no addition of SC-9 consortia or no adjusted of moisture content.

เมื่อพิจารณาจำนวนเชื้อ heterotrophic bacteria ในชุดการทดลองที่ปรับอัตราส่วน C:N:P ทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นหลังจากบ่มครบ 30 วัน (ภาพที่ 11A) ชุดการทดลองที่ 1 ที่มีการปรับอัตราส่วนของ C:N:P เป็น 100:10:1 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นสูงสุดโดยเพิ่มจาก  $5.21 \log$  CFU/g เป็น  $7.78 \log$  CFU/g หลังจากบ่มเป็นเวลา 15 วัน และเพิ่มจำนวนเป็น  $7.86 \log$  CFU/g ที่ 30 วันของการบ่ม ขณะที่ชุดการทดลองที่ 5 ซึ่งไม่ปรับอัตราส่วนของ C:N:P และมีอัตราส่วนของ

C:N:P เริ่มต้นคือ 100:4:0.0065 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดจาก 5.26 log CFU/g เป็น 5.79 log CFU/g หลังจากบ่มเป็นเวลา 15 วัน และเพิ่มจำนวนเป็น 5.84 log CFU/g ที่ 30 วันของการบ่ม

เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว พบว่า ชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 100:20:1 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นสูงสุดโดยเพิ่มจาก 4.14 log CFU/g เป็น 4.69 log CFU/g หลังจากบ่มเป็นเวลา 15 วัน และเพิ่มจำนวนเป็น 5.48 log CFU/g ที่ 30 วันของการบ่ม ขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆ มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อไม่มากนัก (ภาพที่ 11B) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเพิ่มจำนวนเชื้อ heterotrophic bacteria และ เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะเป็นไปอย่างรวดเร็วในชุดการทดลองที่ปรับอัตราส่วน C:N:P โดย Atlas และ Bartha (1972) ได้เสนอว่าการเติมสารอาหารคือ ไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัสหรือทั้ง 2 อย่างลงในดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน จะช่วยส่งเสริมกิจกรรมการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งจุลินทรีย์จะนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้สร้างองค์ประกอบของเซลล์ในการเพิ่มจำนวน ดังนั้นเมื่อมีการปรับสารอาหารไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสในดินเพิ่มขึ้นจะช่วยส่งเสริมให้จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์สามารถบ่งชี้ความเป็นไปได้ของการย่อยสลาย (Song and Bartha, 1990) สอดคล้องกับ Thomas และคณะ (1992) ซึ่งเสนอว่าอัตราส่วน C:N:P ที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมการย่อยสลายคือ 120:10:1



ภาพที่ 11 ผลของอัตราส่วนระหว่าง C:N:P ต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ 0, 15 และ 30 วัน ของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยการเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1; (A) จำนวน heterotrophic bacteria, (B) จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

treatment 1 ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17 + ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 100:10:1

treatment 2 ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17 + ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 100:20:1

- treatment 3 ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17 + ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 100:10:5
- treatment 4 ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17 + ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 300:10:1
- treatment 5 ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17 + ไม่ปรับอัตราส่วน C:N:P

Figure 11. Effects of C:N:P ratio on number of microorganisms presented in each treatment at 0, 15 and 30 day of degradation of 1% waste lubricating oil in soil; (A) heterotrophic microorganism, (B) waste lubricating oil degrading bacteria. Bars represent the standard deviation from three determinations.

- treatment 1 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g) + adjusted moisture content of soil to 17% + adjusted C:N:P ratio to 100:10:1
- treatment 2 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g) + adjusted moisture content of soil to 17% + adjusted C:N:P ratio to 100:20:1
- treatment 3 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g) + adjusted moisture content of soil to 17% + adjusted C:N:P ratio to 100:10:5
- treatment 4 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g) + adjusted moisture content of soil to 17% + adjusted C:N:P ratio to 300:10:1
- treatment 5 nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g) + adjusted moisture content of soil to 17%

เมื่อพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยวิธี weight loss และวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่น



เครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วย TLC/FID พบว่าสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว คือ aromatic hydrocarbon และ asphaltene ผลจากการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ปรับอัตราส่วนของ C:N:P ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงกว่าชุดการทดลองที่ 5 ซึ่งไม่มีการปรับอัตราส่วนของ C:N:P โดยชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งปรับอัตราส่วนของ C:N:P เป็น 300:10:1 ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือร้อยละ 98.02 (ตารางที่ 14) และมีการลดลงของปริมาณสาร aromatic hydrocarbon และ asphaltene คิดเป็นร้อยละ 66.61 และ 69.99 ตามลำดับ (ตารางที่ 14) รูปแบบการลดลงของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วแสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Ibekwe และคณะ (2006) ที่ศึกษาผลของสารอาหารต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ โดยเติมมูลสัตว์ปริมาณ 30, 60 และ 90 กรัม ในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบ 100 กรัม พบว่าการเติมมูลสัตว์ปริมาณ 90 กรัม จะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือร้อยละ 49.47 นอกจากนี้พบว่าชุดการทดลองที่เติมมูลสัตว์เพื่อเพิ่มสารอาหารให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมมูลสัตว์ประมาณร้อยละ 20 จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมสารอาหารจะส่งเสริมอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยจุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารในรูปอนินทรีย์สารได้ง่ายกว่าอินทรีย์สาร (Henry *et al.*, 1991; Mark and Jeffrey, 1991) Gallego และคณะ (2001) เสนอว่าการใช้สารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในรูปของอนินทรีย์สารสามารถเพิ่มการย่อยสลายได้ถึงร้อยละ 90 ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ต้องการสารอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนกับฟอสฟอรัสอีกเล็กน้อยเพื่อใช้สร้างองค์ประกอบเซลล์ในการเพิ่มจำนวน กรณีดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในปริมาณที่สูงจะเกิดความไม่สมดุลระหว่างอัตราส่วน C:N:P ขึ้น ซึ่งการปรับอัตราส่วน C:N:P ในดินให้เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Ayotamuno *et al.*, 2006) จากการทดลองแม้จะมีการเพิ่มอัตราส่วนของคาร์บอนเพิ่มขึ้น 3 เท่าแต่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายก็ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองที่ปรับอัตราส่วน C:N:P จะมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการปรับอัตราส่วน C:N:P ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำสารอาหารคาร์บอนไปใช้สร้างองค์ประกอบของเซลล์ในการเพิ่มจำนวนทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีปริมาณลดลงได้ดีขึ้น

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชในวันแรกของการทดลอง พบว่าค่าพีเอชของแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกัน โดยชุดการทดลองที่ 1 และ 4 ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 100:10:1 และ 300:10:1 ชุดการทดลองที่ 5 ที่ไม่ปรับอัตราส่วน C:N:P มีค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.15-5.60 ขณะที่ชุดการ

ทดลองที่ 3 ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 100:10:5 มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.77 ส่วนชุดการทดลองที่ 2 ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 100:20:1 มีค่าพีเอชเริ่มต้น 7.92 (ตารางที่ 15) ผลจากการทดลองจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองที่มีไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสในอัตราส่วนที่สูงจะส่งผลให้ค่าพีเอชสูงขึ้น เนื่องจากสารอาหารไนโตรเจนที่เติมลงไปอยู่ในรูปของยูเรีย ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) จะทำปฏิกิริยากับน้ำที่แทรกอยู่ในอนุภาคดิน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะเปลี่ยนยูเรียไปเป็นแอมโมเนียและละลายอยู่ในดินส่งผลให้ดินมีพีเอชเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับสารอาหารฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของสารเชิงซ้อนแคลเซียม-ฟอสเฟต ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ) ซึ่งมีหินปูนเป็นองค์ประกอบเมื่อหินปูนทำปฏิกิริยากับน้ำในอนุภาคดินจะให้คาร์บอเนตออกมาส่งผลให้ค่าพีเอชของดินเพิ่มสูงขึ้น (ชอบ คณะฤกษ์ และสายทิพย์ ปฐมรัตน์, 2530) เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าค่าพีเอชลดลงทุกชุดการทดลองและพบว่าค่าความชื้นมีแนวโน้มลดลงในทุกชุดการทดลองเช่นกัน (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9 ในวันที่ 30

Table 14. Effect of C:N:P ratio on degradation of waste lubricating oil by SC-9 consortia after 30 days.

Treatments	Weight loss (%)	Degradation of waste lubricating oil (%)	
		Aromatics	Asphaltenes
1	92.31±0.24 <sup>a</sup>	43.07	100
2	97.81±0.15 <sup>a</sup>	66.17	0
3	93.20±0.28 <sup>a</sup>	61.37	42.01
4	98.02±0.22 <sup>a</sup>	66.61	69.99
5	40.77±0.06 <sup>b</sup>	93.13	70.07

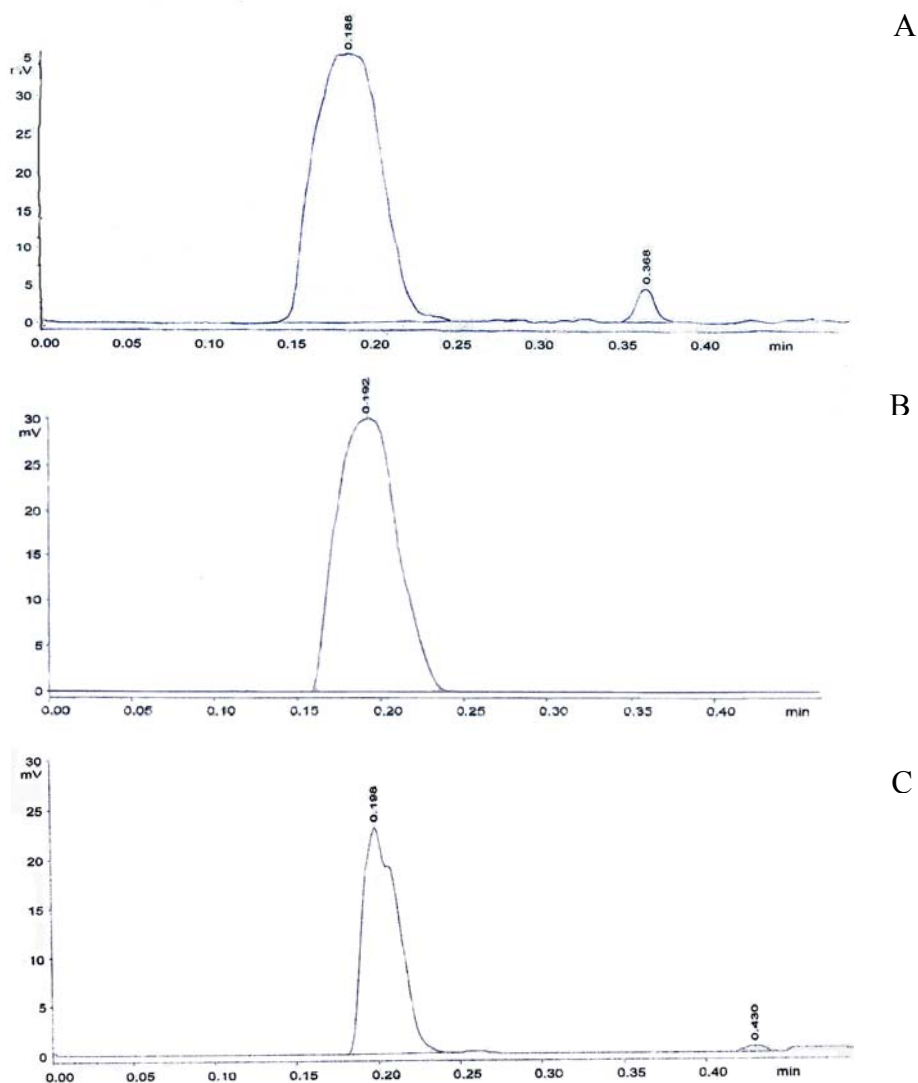
\* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

\* Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

ตารางที่ 15 ค่าพีเอชและความชื้นที่ 30 วันของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินโดยกลุ่มเชื้อ SC-9

Table 15. pH and moisture content of soil in each treatments after degradation of waste lubricating oil in soil at 30 days.

Treatments	pH		Moisture content (%)	
	initial	final	initial	final
1	5.15±0.07	4.92±0.09	17.55±0.07	15.15±0.49
2	7.92±0.17	6.60±0.23	17.45±0.21	15.80±0.14
3	6.77±0.02	5.99±0.21	17.70±0.42	15.60±0.28
4	5.62±0.11	5.35±0.12	17.25±0.07	15.30±0.42
5	5.33±0.15	5.17±0.09	17.36±0.31	15.58±0.65



ภาพที่ 12 TLC-FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของชุดการทดลองที่ 4 (ดินไม่ฆ่าเชื้อ + น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว + กลุ่มเชื้อ SC-9 จำนวน  $10^4$  CFU/g + ปรับความชื้นของดินเป็นร้อยละ 17 + ปรับอัตราส่วน C:N:P เป็น 300:10:1)

Figure 12. TLC-FID chromatogram of waste lubricating oil when extracted from soil microcosm in treatment 4 (nonsterilized soil + waste lubricating oil + SC-9 ( $10^4$  CFU/g) + adjusted moisture content of soil to 17% + adjusted C:N:P ratio to 300:10:1).

A = 0 day of cultivation

B = 15 days of cultivation

C = 30 days of cultivation

Note: Aromatic hydrocarbon (RT =  $0.193 \pm 0.02$ ) and asphaltene (RT =  $0.399 \pm 0.08$ )

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วบริเวณอุโมงค์มรดกและบ่มน้ำมันในเขตจังหวัด นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานีและสงขลาโดยวิธี enrichment culture ในอาหาร mineral salt medium (พีเอช 7.0) ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่ากลุ่ม เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลयर้อยละ 40 เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาศึกษาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เชื้อจุลินทรีย์ สามารถย่อยสลายได้ พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเท่ากับร้อยละ 1 มี ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับร้อยละ 40.46

เมื่อนำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ SC-9 มาแยกบนอาหารแข็งสามารถแยกได้ 4 ไอโซเลต คือ SC9-1, SC9-2, SC9-3 และ SC9-4 เมื่อจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าไอโซเลต SC9-1 และ SC9-3 คิดสีแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่ง ส่วนไอโซเลต SC9-2 และ SC9-4 คิดสีแกรมลบ มีรูปร่างกลมและรูปร่างแบบแท่ง ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ ลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต SC9-1 คือเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ไอโซเลต SC9-2 คือเชื้อ *Sphingobacterium multivorum* ไอโซเลต SC9-3 คือเชื้อ *Bacillus cereus* และ ไอโซเลต SC9-4 คือเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินได้ เลือกใช้ดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาจำลองสภาวะการปนเปื้อน น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของดินสามารถจำแนก ชนิดของดินเป็น sandy loam มีค่าพีเอช 5.03 ความชื้นในดินเท่ากับร้อยละ 3.85 อัตราส่วน คาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่ากับ 100:5:0.01

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดิน โดยกลุ่มเชื้อ SC-9 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่น เครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว คือเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมให้มีจำนวนเชื้อประมาณ  $10^4$  CFU/g ปรับระดับ ความชื้นในดินเท่ากับร้อยละ 17 เติมสารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสโดยให้มีอัตราส่วนของ คาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (C:N:P) เท่ากับ 300:10:1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

เท่ากับร้อยละ 98 และปริมาณสาร aromatic hydrocarbon และ asphaltene ลดลงร้อยละ 64 และ 70 ตามลำดับ

## ข้อเสนอแนะ

1. กลุ่มเชื้อ SC-9 มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดี ซึ่งสามารถแยกเชื้อเดี่ยวๆ ออกมาได้ 4 ไอโซเลต หากมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกิจกรรมและวิถีการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เกิดขึ้น โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต ว่าแต่ละไอโซเลตทำหน้าที่อย่างไร ในขั้นตอนไหน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในอนาคต
2. ไอโซเลต SC9-3 ที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรค หากมีการแพร่กระจายหรือมีการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่ผลิตภัณฑ์อาหารจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ดังนั้นการนำกลุ่มเชื้อ SC-9 ไปใช้ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมจริง ควรเลือกใช้ในรูปแบบของกล้าเชื้อผสมที่เตรียมขึ้นเองจากเชื้อไอโซเลตอื่นๆ ที่ได้จากการแยก
3. การหาองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วย TLC/FID เป็นเพียงการหาองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ไม่สามารถระบุชนิดของสารอย่างละเอียดได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบอย่างละเอียดจำเป็นต้องใช้วิธีหรือเครื่องมือขั้นสูงเช่น GC/MS

## เอกสารอ้างอิง

- ชอบ คณะฤกษ์ และสายทิพย์ ปฐมรัตน์. 2530. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยเคมีกับพืชต่าง ๆ จากผลการวิจัยของกอง ปฐพีวิทยา. วารสารกสิกร. หน้า 128-134.
- พนัส งามกนกวรรณ. 2545. ปัญหาน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว. วารสารโรงงาน. หน้า 51-56.
- สมควร ไช้แก้ว. 2545. ผลกระทบของน้ำมันและสารเคมีขจัดคราบน้ำมันต่อกิ้งกูด้า. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมพร สินโพธิ์ และธีระ นานาศรีรัตน์. 2551. การกำจัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และการนำมาใช้ใหม่ (ออนไลน์). สืบค้นจาก: <http://www.elecnet.chandra.ac.th/learn/courses/5513101/termwork/oil2/main.html> (22 มีนาคม 2551)
- สิริพร แก่นสียา. 2546. วารสารสิ่งแวดล้อม (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://ecurriculum.mv.ac.th/library2/environment/environnet/525-1.doc> (14 ธันวาคม 2549)
- Adenipekun, C. O. and Fasidi, I. O. 2005. Bioremediation of oil-polluted soil by *Lentinus subnudus*, a Nigerian white-rot fungus. Afr. J. Biotechnol. 4 : 796-798.
- Al-Sharidah, A., Richardt, A., Golecki, J. R., Dierstein, R. and Tadros, M. H. 2000. Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait. Microbial. Res. 155 : 157-164.
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A. and Maier, R. M. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 3262–3268.
- Antai, S. P. 1992. Biodegradation of bonny light crude oil by *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. Waste Manage. 10 : 61-64.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemistry. 17<sup>th</sup> Ed. Inc. Washington DC.
- Atagana, H. I., Haynes, R. J. and Wallis, F. M. 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. Biodegradation. 14: 297–307.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. Microbiol. Rev. 45 : 180-209.



- Atlas, R. M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Technol. Biol.* 52 : 149-156.
- Atlas, R. M. and Atlas, M. C. 1991. Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2 : 440-443.
- Atlas, R. M. and Bartha, R. 1972. Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal water. *Biotechnol. Bioeng.* 14 : 297-308.
- Ausubel, F. M., Brent, R. E., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- Ayotamuno, M. J., Kogbara, R. B., Ogaji, S. O. T. and Probert, S. D. 2006. Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria. *Appl. Energ.* 83 : 1249-1257.
- Baker, H. K. and Diane, S. H. 1994. Bioremediation. *In Environmental Microbiology Associates*. p. 10-259. McGraw-Hill, New York.
- Balba, M. T., Al-Awadhi, N. and Al-Daher, R. 1998. Biodegradation of oil contaminated soil : microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods.* 32 : 155-164.
- Barahona, L. M., Vazquez, 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.
- Bento, F. M., Camargo F. A. O., Okeke B. and Frankenberger-Júnior, W. T. 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz. J. Microbiol.* 34 : 65-68.
- Borresen, M. H. and Rike, A. G. 2007. Effect of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. *Cold Reg. Sci. Technol.* 48 : 129-138.
- Braddock, J. F., Ruth, M. L. and Catterall, P. H. 1997. Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils : implications for nutrient-amended bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 31 : 2078-2084.
- Bragg, J. R., Prince, R. C., Harner, E. J. and Atlas, R. M. 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature.* 368 : 413-418.

- Chaineau, C. H., Morel, J., Dupont, J. and Oudot, J. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganism isolate from a temperate agricultural soil. *Sci. Total Environ.* 277 : 237-247.
- Coulon, F., Pelletier, E., Gourhant, L. and Delille, D. 2005. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated Sub-Antarctic soil. *Chemosphere.* 58 :1439 –1448.
- Cuny, P., Faucet, J., Acquaviva, M., Bertrand, J. C. and Gilewicz, M. 1999. Enhanced biodegradation of phenanthrene by a marine bacterium in presence of a synthetic surfactant. *Lett. Appl. Microbiol.* 29 : 242–245.
- Dave, H., Ramakrishna, C., Bhatt, B. D. and Desai, J. D. 1994. Biodegradation of slop oil from petroleum industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10 : 653-656.
- Del'Arco, J.P. and Franca, F.P. 2001. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. *Environ. Pollut.* 110 : 515-519.
- Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 : 47-64.
- Dibble, J. T. and Bartha, R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 : 729-739.
- Forsyth, J. V., Tsao, Y. M. and Bleam, R. D. 1995. Bioremediation: when is augmentation needed. *In Bioaugmentation for Site Remediation.* (Hinchee, R. E., Fredrickson, J., Alleman, B. C., eds). p. 1–14. Battelle Press, Columbus.
- Fritsche, W. and Hofrichter, M. 2000. Aerobic degradation by microorganisms : principles of bacterial degradation. *In Biotechnology Environmental Processes II.* Vol. IIb. (Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, A., eds). p. 145-167. Wiley-Vch Verlage, Weinheim.
- Galvis, L. A. B., Bernal, D. A., Valdivia, A. C. R. and Dendooven, L. 2006. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline–alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere.* 62 : 1749–1760.
- Gallego, J. L. R., Lorego, J., Llamas, J. F., Vazquez, F. and Sanchez, J. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils : evolution of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation.* 12 : 325-333.

- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B. and Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 51 : 61-67.
- Goto, M., Kato, M., Asumi, M. and Venkateswaran, K. 1994. TLC/FID method for evaluation of the crude oil degrading capacity of marine microorganism. *J. Marine Biotechnol.* 2 : 45-50.
- Healy, M. G., Devine, C. M. and Murphy, R. 1996. Microbial production of biosurfactants. *Res. Conserv. Rec.* 18 : 41-57.
- Henry, H. T., John, R. H., Albert, D. V., Sanjay, D. J. and Wipawam, N. 1991. Enhancement of biodegradation of Alaskan weathered crude oil components by indigenous microbiota with the use of fertilizer and nutrients. *In Proceedings of the 1991 Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington DC.* p. 583-590.
- Hong, J. H., Kim, J., Choi, O. K., Cho, K. S. and Ryu, H. W. 2005. Characterization of a diesel-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* IU5, isolated from oil-contaminated soil in Korea. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21 : 381-384.
- 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. *African Biotechnol.* 5 : 983-986.
- Ijah, U. J. J. and Antai, S. P. 2003. Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *Int. 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.
- Iwamoto, T and Nasu, M. 2001. Current bioremediation practice and perspective (review). *J. Biosci. Bioeng.* 92 : 1-8.
- Jirasripongpun, K. 2002. The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 35 : 296-300.
- Jobson, A., Cook, F. D. and Westlake, D. W. S. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.* 22 : 1082-1089.
- 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.

- Koma, D., Sakashita, Y., Kubota, K., Fujii, Y., Hasumi, F., Chung, S. Y. and Kubo, M. 2003. Degradation of car engine base oil by *Rhodococcus* sp. NDKK48 and *Gordonia* sp. NDNY76A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 : 1590-1593.
- Leahy, J. G. and Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54 : 305 –315.
- Lee, M., Kim, M. K., Singleton, I., Goodfellow, M. and Lee, S.T. 2006. Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. *J. Appl. Microbiol.* 100 : 325–333.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265–275.
- Mark, A. J. and Jeffrey, H. G. 1991. In-situ Comparison of bioremediation methods for a number of residual fuel spill in Lee County, Florida. *In Proceedings of the 1991 Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington DC.* p. 533-530.
- Mandri, T. and Lin, J. 2007. Isolation and Characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 6 :23-27.
- Marquez-Rocha, F. J., Hernandez-Rodriguez, V. and Lamela, M. T. 2001. Biodegradation of engine and diesel oil in soil by microbial consortium. *Water Air Soil Pollut.* 128 : 313-320.
- Mercadé, M. E., Monleón, L., de Andeés, C., Rodón, I., Martinez, E., Espuny, M. J. and Manresa, A. 1996. Screening and selecting of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *J. Appl. Bacteriol.* 81 :161-166.
- Nakamura, S. K., Sugiura, K., Inomata, Y. Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., Tanaka, H. and Harayama, S. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *J. Ferment. Bioeng.* 82 : 570-574.
- Newman, S. H., Anderson, D. W., Ziccardi, M. H., Trupkiewicz, J. G., Tseng, F. S., Christopher, M. M. and Zinkl, J. G. 2000. An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated American coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. *Environ. Pollut.* 107 : 295-304 .

- Orisakwe, O. E., Njan, A. A., Afonne, O. J., Akumka, D. D., Orish, V. N. and Udemezue, O.O. 2004. Investigation into the nephrotoxicity of Nigerian bonny light crude oil in albino rats. *Int. J. Environ. Health Res.* 1 : 106–110.
- Pezeshki, S. R., Hester, M. W., Lin, Q. and Nyman, J. A. 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environ. Pollut.* 108 : 129-139.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I. M. 2002. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *J. Basic Microbiol.* 42 : 284-291.
- Rafael, D. V. 1988. Environmental impact of used motor oil. *Sci. Total Environ.* 79 : 1-23.
- 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. *Bioresource Technol.* 67: 279-285.
- Rayment, G. E. and Higginson, F. R. 1992. Australian laboratory handbook of soil and water chemical methods. Inkata Press, Melbourne.
- Shabtai, Y. 1990. Production of exopolysaccharides by *Acinetobacter* strains in a controlled fed-batch fermentation process using soap stock oil (SSO) as carbon source. *Int. J. Biol. Macromol.* 12 :145-152.
- Sharma, B. K., Sarowha, S. L. S., Bhagat, S. D., Tiwari, R. K., Gupta, S. K. and Venkataramani, P. S. 1998. Hydrocarbon group type analysis of petroleum heavy fraction using the TLC/FID technique. *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 :539-544.
- 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.
- Song, H. G. and Bartha, R. 1990. Effect of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 646-651.
- Thomas, J. M., Ward, C. H., Raymond, R. L., Wilson, J. T. and Loehr, R. C. 1993. Bioremediation. *In Encyclopedia of Microbiology.* p. 369-385. Academic Press, California.

- 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.
- Vacca, D. J., Blears, W. F. and Hickey, W. J. 2005. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 3797-3805.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. and Ward, O. P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 : 503-549.
- Vasudevan, N. and Rajaram, P. 2001. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environ. Inter.* 26 : 409-411.
- Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L., King, D. and Holder, E. L. 1996. Bioremediation of an experimental oil spill on shoreline of Delaware Bay. *Environ. Sci. Technol.* 30 : 1764-1775.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73 : 1163–1172.
- Wang, X. and Bartha, R. 1990. Effects of bioremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. *Soil Biol. Biochem.* 22 : 501-505.
- Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I. and Okuyama, H. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr. Microbiol.* 49 : 415-422.
- 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 sediment. *Mar. Pollut. Bull.* 51 : 1071-1077.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

#### 1. Mineral salt medium (ดัดแปลงจาก Ijah and Upke, 1992)

$K_2HPO_4$	1.8	กรัม
$KH_2PO_4$	1.2	กรัม
$NH_4Cl$	4.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเป็น 7.0 ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้นลงไป 15 กรัม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

#### 2. Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	0.5	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

#### 3. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข

### 1. วัดความเป็นกรด-ด่าง (ดัดแปลงจาก Rayment and Higginson, 1992)

#### วิธีการ

1. ชั่งดิน 10 กรัม ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำ deionized 50 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที วางทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอนประมาณ 5 นาที
3. วัดค่าพีเอชของสารละลายดิน ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

### 2. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น ดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC. (2000)

1. นำภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักของภาชนะพร้อมฝา
2. ชั่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ใส่ในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ( $W_1$ )
3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบ และใส่ในเดซิเคเตอร์จนเย็น ชั่งน้ำหนัก ( $W_2$ )
5. คำนวณหาร้อยละของความชื้นโดยใช้สูตร

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

## ภาคผนวก ค

## ผลการทดลอง

## ผลการเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ โดยการทำให้ 16S rDNA sequencing

## 1. ผลการเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ของเชื้อไอโซเลต SC9-1

```

emb|AJ534853.2|CHR534853 Chryseobacterium sp. DW3 partial 16S rRNA gene,
isolate DW3
Length=1421

Score = 990 bits (536), Expect = 0.0
Identities = 550/557 (98%), Gaps = 0/557 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTGAGAGCGGCGCACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGCCTTTATCTGGGGGATAGCC 60
      |||
Sbjct 26 TTGAGAGCGGCGCACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGCCTTTATCTGGGAGATAGCC 85

Query 61 TTTCGAAAGGAAGATTAATACCCATAATATAAGAAACGGCATCGTTTTTTATTGAAAGC 120
      |||
Sbjct 86 TTTCGAAAGGAAGATTAATACCCATAATATAAGAAACGGCATCGTTTTTTATTGAAAGC 145

Query 121 TCCGGCGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA 180
      |||
Sbjct 146 TCCGGCGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA 205

Query 181 AGTCAATGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCCCAGACTGGTACTGAGACACGGA 240
      |||
Sbjct 206 AGTCAATGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCCCAGACTGGTACTGAGACACGGA 265

Query 241 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGGTGAGAGCCTGATCCA 300
      |||
Sbjct 266 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGGTGAGAGCCTGATCCA 325

Query 301 GCCATCCCAGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTGTACAGGGATAA 360
      |||
Sbjct 326 GCCATCCCAGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTGTATAGGGATAA 385

Query 361 ACCTACCCCTCGTGAGGGTAGCTGAAGGTACTGTACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC 420
      |||
Sbjct 386 ACCTACTCACGTGTGAGTAGCTGAAGGTACTATACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGC 445

Query 421 CAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGT 480
      |||
Sbjct 446 CAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGT 505

Query 481 CCGTAGGCGGATCTGTAAGTCAGTGGTGAATCTCACAGCTTAACTGTGAAACTGCCATT 540
      |||
Sbjct 506 CCGTAGGCGGATCTGTAAGTCAGTGGTGAATCTCACAGCTTAACTGTGAAACTGCCATT 565

Query 541 GATACTGCAGGTCTTGA 557
      |||
Sbjct 566 GATACTGCAGGTCTTGA 582

```

## 2. ผลการเทียบเคียงข้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ของเชื้อไอโซเลต SC9-2

```

gb|EF659317.1| Uncultured bacterium clone WET-E-011 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=664
Score = 688 bits (372), Expect = 0.0
Identities = 389/398 (97%), Gaps = 4/398 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 1   TTCCGGTACATTCAGCTCCCTACACGTATTKAGGTTTATTCCCGGACAAAAGCAGTTTAC 60
          |||
Sbjct 417  TTCCGGTACATTCAGCTCCCTACACGTAAGGAGGTTTATTCCCGGACAAAAGCAGTTTAC 358

Query 61  AACCCATAGGGCAGTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGGTTCAGGCTTCCGCCATTGACC 120
          |||
Sbjct 357  AACCCATAGGGCAGTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGGTTCAGGCTTCCGCCATTGACC 298

Query 121 AATATTCCTTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGG 180
          |||
Sbjct 297  AATATTCCTTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGG 238

Query 181  GATTCCTCTCAGAGCCCCCTAGACATCGTCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTACCAACTA 240
          |||
Sbjct 237  GATTCCTCTCAGAGCCCCCTAGACATCGTCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTACCAACTA 178

Query 241  GCTAATGTCACGCGAGCCCATCTCCATCCTATAAATATTTAATCAACTGAACATGCNANA 300
          |||
Sbjct 177  GCTAATGTCACGCGAGCCCATCTCCATCCTATAAATATTTAATCAACTGAACATGCCA-A 119

Query 301  -TGATG-ATGTTATGCGGTGTTAATCTCTCTTTTCGAGAGGCTATCCCCCTGATGGAGGCA 358
          |||
Sbjct 118  CTG-TGGATGTTATGCGGTGTTAATCTCTCTTTTCGAGAGGCTATCCCCCTGATGGAGGTA 60

Query 359  GGTGCTCACGCGTTACGCACCCGTGCGCCACTCTCAC 396
          |||
Sbjct 59   GGTGCTCACGCGTTACGCACCCGTGCGCCACTCTCAC 22

```

### 3. ผลการเทียบเคียงข้อมูลเบสที่เรียงในระดับสปีชีส์ของเชื้อไอโซเลต SC9-3

gb|EF503528.1| Bacillus cereus strain HPC1408 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=762

Score = 900 bits (487), Expect = 0.0  
Identities = 487/487 (100%), Gaps = 0/487 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 1   GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCC 60
          |||
Sbjct 70   GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCC 129

Query 61   GGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG 120
          |||
Sbjct 130   GGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG 189

Query 121  GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC 180
          |||
Sbjct 190  GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC 249

Query 181  TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA 240
          |||
Sbjct 250  TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA 309

Query 241  CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT 300
          |||
Sbjct 310  CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT 369

Query 301  GACGGAGCACCGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTAGGG 360
          |||
Sbjct 370  GACGGAGCACCGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTAGGG 429

Query 361  AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG 420
          |||
Sbjct 430  AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG 489

Query 421  CTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG 480
          |||
Sbjct 490  CTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG 549

Query 481  GGCGTAA 487
          |||
Sbjct 550  GGCGTAA 556

```

#### 4. ผลการเทียบเคียงข้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ของเชื้อไอโซเลต SC9-4

gb|DQ383276.2| Agrobacterium tumefaciens strain 7406 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1432

Score = 963 bits (521), Expect = 0.0  
Identities = 521/521 (100%), Gaps = 0/521 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 1   GGGTGAGTAACGCGTGGGAACATACCCTTTCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATT 60
          |||
Sbjct 55   GGGTGAGTAACGCGTGGGAACATACCCTTTCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATT 114

Query 61   AATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCGCGTTGGAT 120
          |||
Sbjct 115  AATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCGCGTTGGAT 174

Query 121  TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGAT 180
          |||
Sbjct 175  TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGAT 234

Query 181  GATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA 240
          |||
Sbjct 235  GATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA 294

Query 241  TATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGG 300
          |||
Sbjct 295  TATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGG 354

Query 301  GTTGTAAAGCTCTTTCACCGATGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCGGCTA 360
          |||
Sbjct 355  GTTGTAAAGCTCTTTCACCGATGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCGGCTA 414

Query 361  ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGC 420
          |||
Sbjct 415  ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGC 474

Query 421  GTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGA 480
          |||
Sbjct 475  GTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGA 534

Query 481  ACTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAA 521
          |||
Sbjct 535  ACTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAA 575

```



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวจิตติมา แก้วเรือง	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4911020005	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี- ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Jittima Kaewrueng, Vorasan Sobhon and Suppasil Maneerat. 2007. Isolation and Screening of Waste Lubricating Oil Degrading Microorganisms Consortia from Soil. The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”, Thailand, October 9-12, 2007. pp. 62.