รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ใน soil slurry

จัดทำโดย

ผศ. ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2551-2552

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจากบริเวณอู่ซ่อมรถและปั๊มน้ำมันในจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานีและสงขลา ทำการแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (ULO) ด้วยวิธี enrichment culture โดยนำตัวอย่างดิน 1 กรัม เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและตรวจสอบกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยวิธี weight loss พบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดคือ กลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40.46 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. (A), *Sphingobacterium multivorum* (B), *Bacillus cereus* (C) และ *Agrobacterium tumefaciens* (D) ผลของการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร Mineral Salt Medium (MSM) จุลินทรีย์ผสมระหว่าง 2, 3 และ 4 สายพันธุ์ และกลุ่มเชื้อ SC9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ หลังจากทำการทดลอง 7 วัน พบว่า กลุ่มเชื้อ SC9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงกว่าเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ 44.5% และเมื่อศึกษาปัจจัยของปริมาณดิน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ค่าพีเอชเริ่มต้นของดินใน soil slurry และแหล่งสารอาหารที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยกลุ่มเชื้อ SC9 ใน soil slurry หลังจากทำการทดลอง 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร MSM มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ที่เติมดิน 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เชื้อเริ่มต้น 15% (ปริมาตรต่อปริมาตร) $(NH_4)_2SO_4$ 4 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร สามารถย่อยสลาย ULO ได้ 61.2%

Abstract

Consortium of used lubricating oil (ULO) 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 used lubricating oil. One gram of soil sample was added into mineral salt medium containing 1% used lubricating oil as sole carbon source. Used lubricating oil degradation activity was measured by weight loss method. The most active consortium in the assimilation of used lubricating oil was SC-9. The SC-9 consortium showed 40.46% oil degrading activity within 5 days. The oil concentration had affected the degradation of the SC-9 consortium. The degrading activity was decreased from 40.46% to 15.05% when used lubricating oil was increased from 1% to 10%. The SC-9 consortium 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*. This study was conducted to evaluate the biodegradability of ULO in Mineral Salt Medium (MSM) using a pure and mixed bacterial culture and SC9 consortium of bacterial culture isolated from oil contaminated soil. Four bacterial strains including *Chryseobacterium* sp., *Sphingobacterium multivorum*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens* were used as inoculum for ULO degradation in MSM medium in comparison with their mixtures and SC9 consortium. After 7 days of incubation, SC9 consortium was the most effective starter as evidenced by 44.5% degradation of ULO. Factors affecting ULO degradation by SC9 consortium in soil slurry including soil concentration, inoculum size, initial pH of soil slurry and nutrients source as well as with and without sterilization were studied. Maximal degradation rate of ULO (61.2%) was obtained when SC9 consortium was incubated in MSM medium at initial pH 8.0 supplemented with 10% (w/v) soil concentration, 15% (v/v) inoculum size, 40 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1.8 g/L K_2HPO_4 and 0.6 g/L KH_2PO_4 for 7 days.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยและขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ศุภศิลป์ มณีรัตน์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Abstract	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบาญ	IV
รายการตาราง	V
รายการภาพ	VII
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการทดลองและวิจารณ์	10
สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	43
Output	49

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 : (a) เจริญบนอาหาร Nutrient agar, (b) เจริญบนอาหาร mineral salt medium agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1	15
2	ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 โดย 16S rDNA	15
3	ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของดินตัวอย่าง	17
4	ผลของการเติมเชื้อเดี่ยว, เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อ SC9 ต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	19
5	ผลของปริมาณดินต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเข้มข้น 1% โดยการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	23
6	ผลของการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	26
7	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% โดยการเติมดิน 10% และเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	29
8	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% และกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	32

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
9	ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% และกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	35
10	ผลของอัตราส่วนของแหล่งฟอสฟอรัสต่อต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% กลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% และแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	37

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน	12
2	ผลของความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่อการย่อยสลายโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ SC-9 ในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน	13
3	แผนภูมิต้นไม้ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SC9-1, SC9-2, SC9-3 และ SC9-4	16
4	ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (A) ที่ความเข้มข้น 1% และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) โดยการเติมเชื้อเดี่ยว, เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	18
5	ผลของปริมาณดินต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (A) ที่ความเข้มข้น 1% และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) โดยกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	23
6	ผลของปริมาณกลุ่มเชื้อ SC9 ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (A) ที่ความเข้มข้น 1% และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	25
7	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% (A) และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	28
8	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% (A) และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% และกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	31
9	ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% (A) และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% และกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	34

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ผลของอัตราส่วนของแหล่งฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% (A) และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% กลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% และแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน	36
11	TLC-FID โครมาโตแกรมของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่สกัดได้จากน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% กลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% และแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0 (A), 7 (B) และ 30 (C) วัน โดย Aromatic hydrocarbon I (RT=0.209±0.004) Aromatic hydrocarbon II (RT=0.218±0.004)	39
12	GC-MS โครมาโตแกรมของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่สกัดได้จากน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% กลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% และแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0 (A), 30 (B) วัน	40

บทนำ

ประเทศไทยมีการใช้น้ำมันหล่อลื่นเป็นจำนวนมากทั้งในอุตสาหกรรมและการคมนาคม พบว่าในปี 2540 มีปริมาณน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้ว (used lubricating oil) รวมทั้งประเทศ ประมาณ 329 ล้านลิตร สามารถจัดเก็บได้เพียง 219 ล้านลิตร หรือร้อยละ 66 โดยการจัดเก็บรวบรวมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์อีกครั้ง เช่น ใช้ผสมน้ำมันเตาเป็นเชื้อเพลิง ใช้หล่อลื่นโซ่หรือทากันปลวก เป็นต้น ส่วนอีกกว่า 100 ล้านลิตร หรือร้อยละ 34 คาดว่ามีการจัดเก็บรวบรวมไว้ใช้ประโยชน์หรือเททิ้งในลักษณะที่ไม่เหมาะสมเช่น ทิ้งลงในแหล่งน้ำ บริเวณที่อยู่อาศัย พื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษสะสมในต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว (พนัส งามกนกวรรณ, 2545)

การปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในดินหรือแหล่งน้ำเป็นปัญหาหนึ่งที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเมื่อสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะมีการรวมตัวหรือเกาะติดกับสารอินทรีย์ต่างๆ ทำให้การย่อยสลายยากยิ่งขึ้นและมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Mercadé *et al.*, 1996) โดยสาเหตุใหญ่ที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อม คือ การขาดความระมัดระวังและความรับผิดชอบของผู้ใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ เช่น การเททิ้งลงสู่แหล่งดินหรือท่อระบายน้ำหลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำมันเครื่อง 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) การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือสารก่อมลพิษต่างๆ จะมีประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อมีการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ (Vasudevan and Rajaram, 2001)

สำหรับในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (used lubricating oil, ULO) ในดินยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะการศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในประเทศรวมไปถึงการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อช่วยเพิ่ม

ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ปนเปื้อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับการแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำจัดและแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในสิ่งแวดล้อมต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

- ดินปนเปื้อนน้ำมันบริเวณอู่ซ่อมรถมอเตอร์ไซค์และปั๊มน้ำมันในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา สุราษฎร์ธานีและดินบริเวณสถานีไบโอดีเซล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติกและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการทดสอบ
- ดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสวนต้นไม้ อำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา
- น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (ULO) จากอู่ซ่อมรถมอเตอร์ไซค์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Mineral Salt Medium (MSM) ประกอบด้วย (ต่อ 1 ลิตร) K_2HPO_4 1.8 กรัม, KH_2PO_4 1.2 กรัม, NH_4Cl 4.0 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, NaCl 0.1 กรัม และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 กรัม ปรับพีเอชเท่ากับ 7.5 (ดัดแปลงจาก Ijah and Upke, 1992)
- Nutrient agar (NA) บริษัท Himedia (Mumbai, India)
- Nutrient broth (NB) บริษัท Himedia (Mumbai, India)

วิธีการวิเคราะห์

1. ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

1.1 Weight loss method สกัด culture broth ด้วย dichloromethane ในอัตราส่วนที่เท่ากันกับ culture broth แล้วนำส่วนของตัวทำละลายมากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 ทำแห้งตัวทำละลายด้วยสุญญากาศและชั่งน้ำหนักสารที่ได้ (Mercadé *et al.*, 1996) จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Shirai *et al.*, 1995) จากสมการ

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

W_1 = น้ำหนักของน้ำมันเริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักของน้ำมันที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

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

1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วย Thin layer chromatography (TLC) ที่มี flame ionization detector (FID) เป็นอุปกรณ์วัด สกัดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในตัวอย่างดินด้วย dichloromethane ในอัตราส่วน 1:2 แยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตัวทำละลายที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วละลายอยู่มากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_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 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของอากาศ 2 ลิตรต่อนาทีและระดับความเร็วในการสแกน 30 วินาทีต่อหนึ่งครั้งของการสแกน ทำการอินทิเกรตหาพื้นที่ใต้กราฟ (Sharma *et al.*, 1998)

1.3 การวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยใช้ Gas Chromatography

นำน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ได้จากการสกัดมาละลายใน dichloromethane ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อละลายน้ำมันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองใยแก้ว (glass membrane filter GF-A, Whatman) เก็บไว้ในขวดที่มีฝาเกลียวปิดสนิท นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (Shirai *et al.*, 1995) โดยนำส่วนที่สกัดได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ฉีดลงในเครื่อง GC ที่มี flame ionization detector (FID) เป็นตัวตรวจวัด ใช้ capillary column ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร มีสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ อุณหภูมิของ Injector และ Detector เท่ากับ 322 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ 100 องศาเซลเซียส รักษาไว้คงที่เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิสุดท้าย 320 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียส เมื่อได้อุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ 320 องศาเซลเซียส รักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 15 นาที ใช้ฮีเลียม (He) เป็นแก๊สตัวพา คำนวณปริมาณของไฮโดรคาร์บอนที่ลดลงโดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อ (Koma *et al.*, 2001; Wongsa *et al.*, 2004)

2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของดิน

2.1 วัดความเป็นกรด-ด่างของดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 20 นาที ระหว่างที่รอให้คนเป็นระยะ ๆ 2 -3 ครั้ง เมื่อครบกำหนดนำมาวัดด้วยเครื่อง pH meter ก่อนวัดต้องเปิดเครื่องทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นปรับเครื่องด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7.0 และ 4.0 แล้วนำไปวัด pH ของตัวอย่างดินที่เตรียมไว้ (Beck *et al.*, 1980)

2.2 วิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน

ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.3 วิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในดินโดยวิธี Kjeldahl

ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์อุตสาหกรรมเกษตรเพื่อการส่งออก คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.4 วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 5 กรัม ใส่ในฟลาสก์ 125 มิลลิลิตร แล้วเติม hexane 10 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน แล้วนำส่วนของตัวทำละลายไประเหยแห้งในเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ แล้วนำไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้มาละลายใน hexane ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองใยแก้ว (glass membrane filter GF-A, Whatman) โดยจะใช้ส่วนสกัด 1 ไมโครลิตร ฉีดลงเครื่อง GC แล้ววิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด (Sharma *et al*., 1998)

2.5 วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยวิธี Bray II

ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.6 วิเคราะห์ชนิดของดิน

ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.7 ความชื้น

ชั่งตัวอย่างดิน 100 กรัม ใส่ในจานระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำตัวอย่างดินไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 105 ± 1 องศาเซลเซียส อบจนแห้งและได้น้ำหนักคงที่ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน dessicator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (Brady, 1974)

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

W_1 = น้ำหนักของดินเริ่มต้น

W_2 = น้ำหนักของดินที่ผ่านการอบแห้ง

3 การหาจำนวน heterotrophic microorganism

เก็บตัวอย่างดิน 25 กรัม หรือ culture broth 25 มิลลิลิตร มาเตรียม suspension ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution หาจำนวน 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

เติมตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 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 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1.1 เลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

1.3 การหาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยได้

ถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 1.2 ร้อยละ 1 ลงในฟลาสก์ขนาด 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 เลือกปริมาณน้ำมันที่กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

2. การเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2 มาเลี้ยงในอาหาร MSM และ MSM agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน

ปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้อง นำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา re-streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดิม 2-3 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะต่างๆ ดังนี้

- ลักษณะของโคโลนี
- รูปร่างเซลล์ การเรียงตัว และการติดสีแกรม (Gram staining)

2.2 การศึกษาในระดับสปีชีส์

ส่งเชื้อที่คัดเลือกได้ให้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้ทำการเทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของเชื้อเดี่ยว เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

4. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของเชื้อที่คัดเลือกได้ใน soil slurry

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน แล้วเหวี่ยงแยกเซลล์

(8,500 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส, 20 นาที) ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 2 ครั้ง แล้วเตรียมเซลล์ซัสเพนชั่นด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีจำนวนเซลล์ 10^7 CFU/มิลลิลิตร

4.1 ผลของปริมาณดินต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมดินที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ในสวนต้นไม้ (ไม่มีการฆ่าเชื้อ) 0%, 5%, 10%, 15% และ 20% จากนั้นเติมเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ลงไป 10% โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1 และ 3 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

4.2 ผลของปริมาณเชื้อต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีพีเอชเท่ากับ 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมดิน 10% ลงไป แล้วเติมเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ลงไป 0%, 5%, 10%, 15%, 20% และ 25% โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1 และ 3 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

4.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1 และ 3 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

4.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี NH_4Cl หรือ NH_4NO_3 หรือ $(NH_4)_2SO_4$ หรือยูเรีย ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1%

เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1 และ 3 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

4.5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 แล้วเติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1 และ 3 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

4.6 ผลของอัตราส่วนของแหล่งฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และแหล่งฟอสฟอรัส คือ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 อัตราส่วน 0:0, 0:1.2, 1.8:0, 0.9:1.2, 1.8:0.6 และ 1.8:1.2 (กรัมต่อลิตร) แล้วปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และหาจำนวน heterotrophic microorganism ตามวิธีการวิเคราะห์ผลข้อ 1 และ 3 ตามลำดับ เลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

จากการเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากอู่ซ่อมรถ ปั๊มน้ำมันในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา สุราษฎร์ธานีและดินบริเวณสถานีไบโอดีเซล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเก็บที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร พบว่าลักษณะของตัวอย่างดินเป็นดินร่วนจำนวน 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50), ดินทราย 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 34) และดินเหนียว 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16) ซึ่งลักษณะเนื้อสัมผัสของดินมีผลต่อการแทรกซึมของน้ำมันลงสู่ดิน โดยดินที่มีลักษณะเป็นดินทรายจะทำให้น้ำมันสามารถซึมผ่านได้ดีกว่าดินร่วนหรือดินเหนียวดังนั้นน้ำมันจะถูกดูดซับไว้ในอนุภาคของดินได้ดีกว่าและอาจจะมีผลต่อการตรวจพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Márques-Rocha *et al.*, 2001) ดังนั้นการแยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากธรรมชาติจึงควรเลือกดินจากบริเวณที่มีประวัติการปนเปื้อนน้ำมันมาก่อนเป็นแหล่งในการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากมีรายงานว่าบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันสูงกว่าบริเวณที่ไม่มีน้ำมันปนเปื้อนร้อยละ 61-67 (Atlas, 1981)

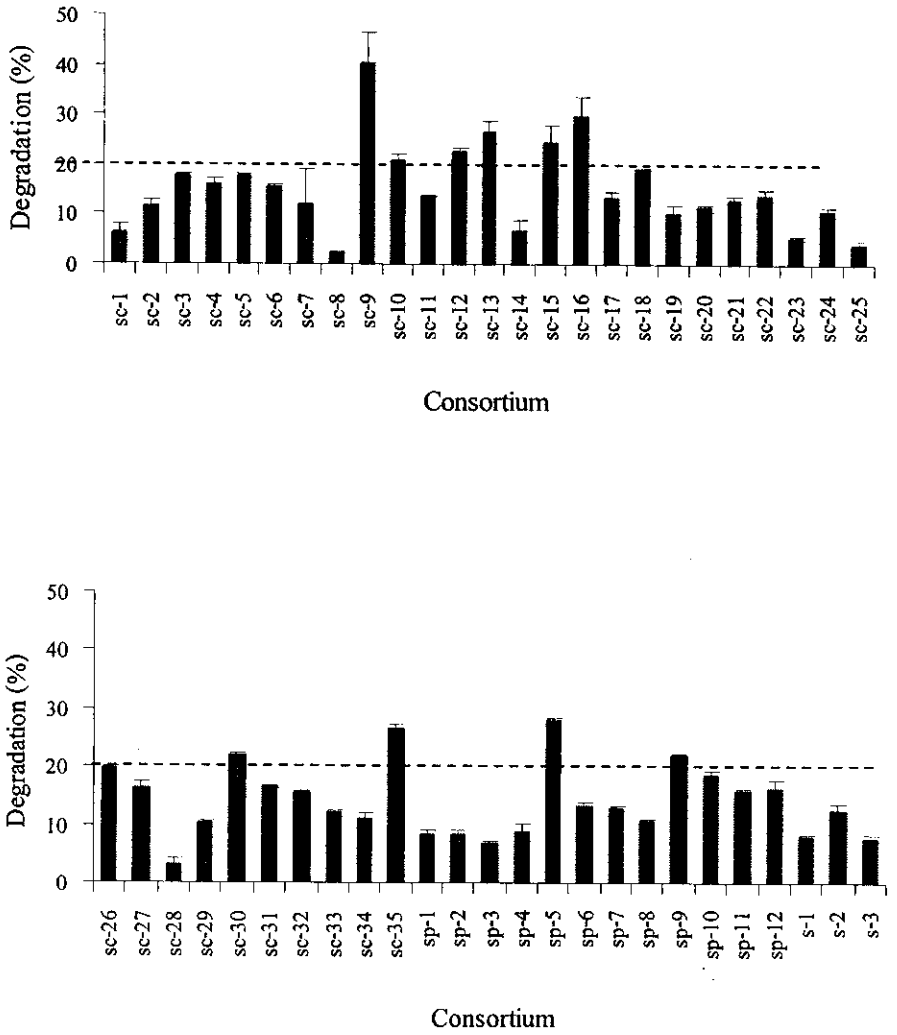
2. การแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว

2.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

จากการแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากปั๊มน้ำมัน อู่ซ่อมรถยนต์ในจังหวัดนครศรีธรรมราช 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 1) ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณอู่ซ่อมรถในอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งมีการปนเปื้อนของน้ำมันมาเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มเชื้อ SC-9 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

โดยทั่วไปเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดีนั้นโดยส่วนใหญ่มักแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเนื่องจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนทำให้เกิดการคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีความสามารถสูงอยู่ในบริเวณนั้น สอดคล้องกับการทดลองของ Koma และคณะ (2001) ที่แยกเชื้อจากดินปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ salt medium ที่มี *n*-paraffin ร้อยละ 1 ซึ่งเป็น

องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 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 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์และส่วน cyclic alkane หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน ได้ร้อยละ 27 และ 18 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Mandri และ Lin (2007) แยกเชื้อที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell-Haas ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 10 พบว่าสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด 3 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticum*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Flavobacterium* sp. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 28 วันได้ร้อยละ 84, 71 และ 60 ตามลำดับ



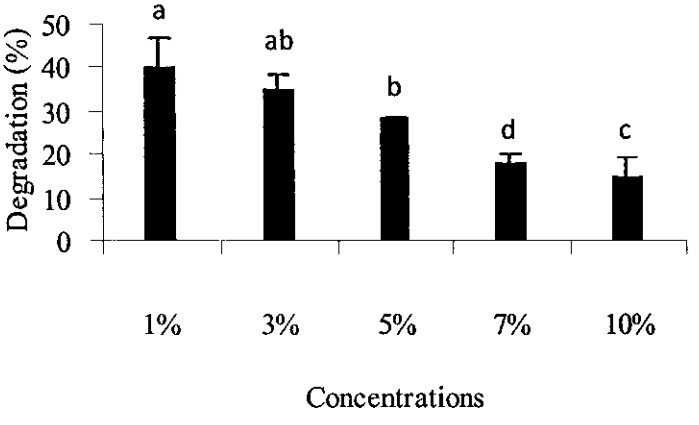
ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน ในอาหาร mineral salt medium (พีเอช 7.0) ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

2.2 การศึกษาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยได้

เมื่อเลี้ยงกลุ่มเชื้อ SC-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นร้อยละ 1, 3, 5, 7 และ 10 ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ร้อยละ 1, 3, 5, 7 และ 10 กลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40.46, 34.92, 28.61, 18.45 และ 15.05 ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 กลุ่มเชื้อ SC-9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการย่อยสลาย

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 2) ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 1 ในการทดลองขั้นต่อไป

การที่เพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลงอาจจะเนื่องมาจากน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำทำให้กลุ่มเชื้อมีแหล่งอาหารคาร์บอนไม่เพียงพอหรือปิดกั้นออกซิเจนที่ต้องการใช้ นอกจากนี้สารที่ปนเปื้อนมากับน้ำมันเช่น โลหะหนัก (Leahy and Colwell, 1990) อาจจะส่งผลต่อการเจริญและการย่อยสลายของจุลินทรีย์ได้ 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 จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงๆ กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์บางกลุ่มมีประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มขึ้นน่าจะมีผลมาจากสาร intermediate ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายซึ่งเชื้อบางสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มเชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญและผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้ออื่นๆ ในกลุ่มเชื้อ (Atlas and atlas, 1991) นอกจากนี้การที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดีขึ้นแล้วนั้นแต่อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงเกินไปก็อาจยับยั้งการเจริญทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดลงได้ (Del'Arco and Franca, 2001)



ภาพที่ 2 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่อการย่อยสลายโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ SC-9 ในอาหาร mineral salt หลังจากเลี้ยงเชื้อ 5 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

3. การเทียบเคียงสายพันธุ์กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Nutrient agar สามารถแยกได้ 4 ไอโซเลต ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันและแบ่งตามลักษณะการติดสีแกรม (Gram staining) ได้ แบคทีเรียแกรมบวก 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 สีของโคโลนีมีทั้งโคโลนีสีขาวขุ่นและเหลือง (ตารางที่ 1) 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 มีความใกล้เคียง ร้อยละ 100 กับเชื้อ *Bacillus cereus* และไอโซเลต SC9-4 มีความใกล้เคียงร้อยละ 100 กับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ดังแสดงในตารางที่ 2 และสามารถสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ดังแสดงในภาพที่ 3 จากผลของ 16S rDNA และแผนภูมิต้นไม้ของไอโซเลต SC9-2 ซึ่งมีความเหมือนร้อยละ 95 กับเชื้อ *Sphingobacterium multivorum* หลังจากใช้โปรแกรม Blast แต่เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ผลที่ได้กลับมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas* sp. มากกว่า ซึ่งผลที่ได้อาจจะเนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วย 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, Gordona 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

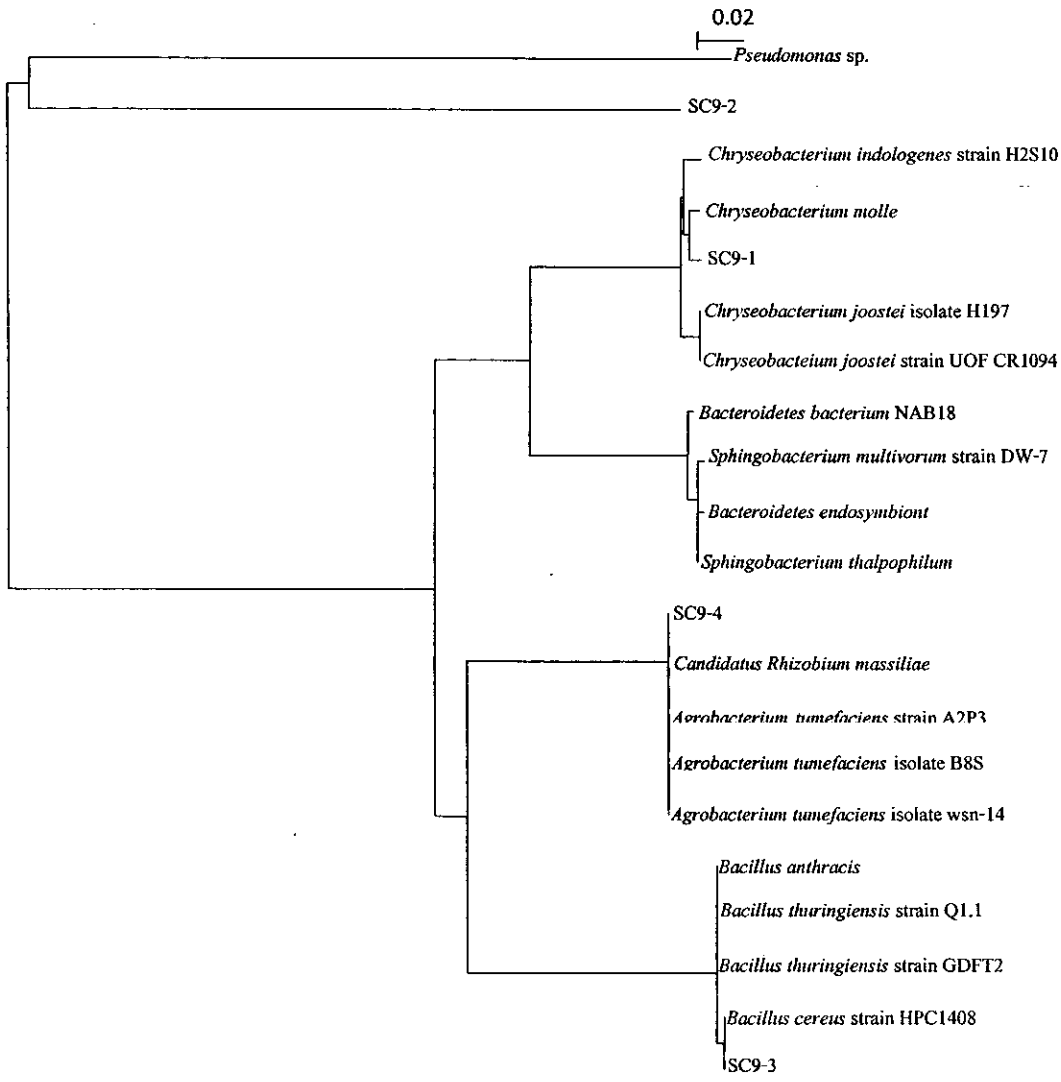
Mercadé และคณะ (1996) คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ร้อยละ 65 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็น *Pseudomonas, Serratia, Escherichai, Enterobacter, Citrobacter. Alcaligenes* และ *Acinetobacter* ส่วน Koma และคณะ (2001) คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย *n*-paraffin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือเชื้อ *Acinetobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จะเห็นได้ว่าโอกาสในการพบแบคทีเรียแกรมลบในที่ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสิ่งแวดล้อมสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อาจจะเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบมี outer membrane ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นสารในกลุ่มฟอสฟอลิปิดซึ่งมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำจึงทำให้มีหน้าที่เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวทำให้เชื้อสามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำได้ดีขึ้น (Desai and Banat, 1997)

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

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

ตารางที่ 2 ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC-9 โดย 16S rDNA

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



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

4. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดินที่จะใช้ใน soil slurry

จากการเก็บตัวอย่างดินที่ ต. เขาพระ อ. รัตภูมิ จ. สงขลา ซึ่งเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์มีองค์ประกอบของอินทรียวัตถุสูงและไม่มีประวัติการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยเมื่อนำไปสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในดิน พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของสารดังกล่าว (ตารางที่ 3) จากนั้นส่งดินไปวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของดินที่ห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จากผลการวิเคราะห์ พบว่าดินตัวอย่างมีลักษณะเป็นดินร่วน (Loam soil) มีค่าพีเอชและความชื้นเท่ากับ 6.29 และ 20% จะเห็นได้ว่าค่าความชื้นของดินตัวอย่างอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งความชื้นของดินที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะอยู่ในช่วง 30-90% (Baker and

Diane, 1994) ส่วนค่าพีเอชนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารปนเปื้อนและชนิดของจุลินทรีย์ว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการย่อยสลายสารปนเปื้อนชนิดใด อยู่ในช่วงใด ซึ่งค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแบคทีเรียจะอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง คือ พีเอช 7.0 (Ashok and Saxena, 1995) ส่วนปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณฟอสฟอรัสในดินตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 2.5%, 0.13% และ 0.054% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในดินตัวอย่างเท่ากับ 100:5:2 จะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในดินมีปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Lay *et al.*, 2005)

ถึงแม้ดินตัวอย่างจะมีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญ แต่ในการทดลองในครั้งนี้เป็นการทดลองกับดินในสภาพของเหลวเปียกจึงทำให้ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ในดินมีปริมาณน้อยลง จึงจำเป็นต้องมีการเติมสารอาหารลงไป และจำเป็นต้องมีการหาปริมาณสารอาหาร ปริมาณดิน และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งมีต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

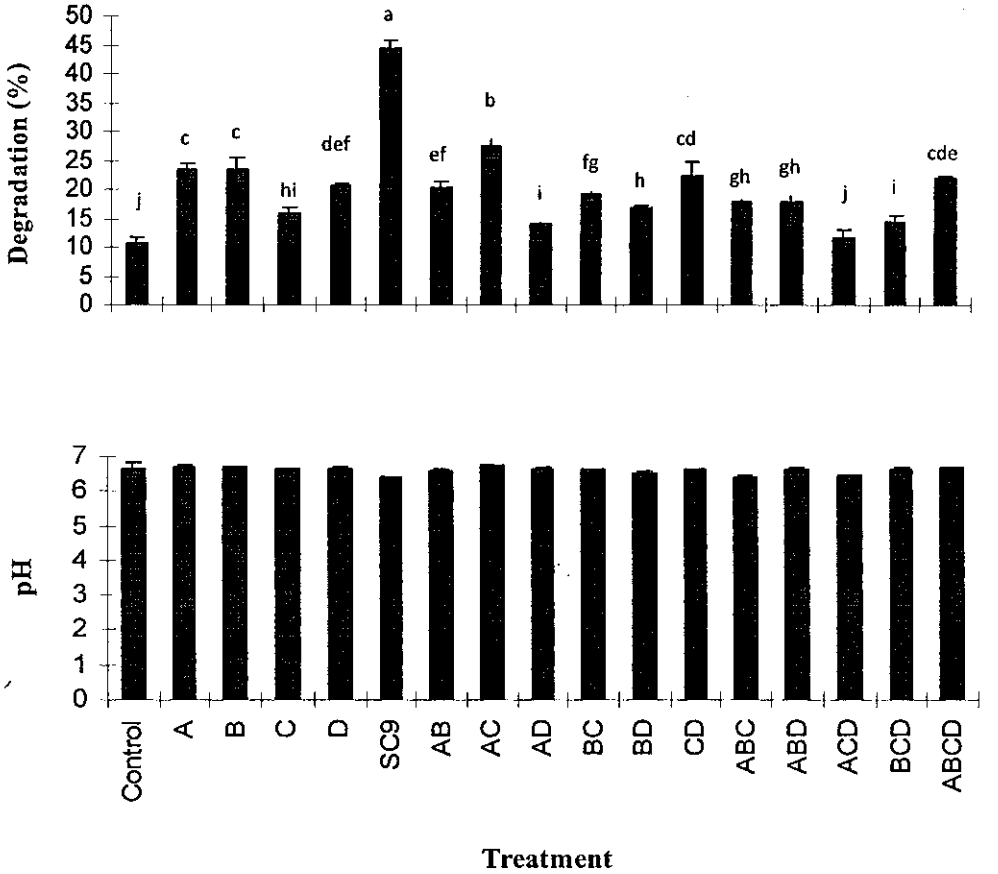
ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของดินตัวอย่าง

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

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำกล้าเชื้อที่เทียบเคียงสายพันธุ์แล้ว 4 สายพันธุ์ (A คือ *Chryseobacterium* sp., B คือ *Sphingobacterium multivorum*, C คือ *Bacillus cereus* และ D คือ *Agrobacterium tumefaciens*) และกลุ่มเชื้อ SC9 มาทำการทดสอบการย่อยสลาย ULO ของเชื้อเดี่ยว 4 สายพันธุ์ (A, B, C, D), 2 สายพันธุ์ (AB, AC, AD, BC, BD, CD; 1:1, v/v), 3 สายพันธุ์ (ABC, ABD, ACD, BCD; 1:1:1, v/v), 4 สายพันธุ์ (ABCD;

1:1:1:1, v/v) และกลุ่มเชื้อ SC9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7 log CFU/mL เลี้ยงเชื้อเดี่ยวและกลุ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4 พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด คือ 44.5% รองลงมาคือชุดการทดลอง AC เป็นชุดที่มีการเติมเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ร่วมกับ *B. cereus* ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO 27.5%



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (A) ที่ความเข้มข้น 1% และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) โดยการเติมเชื้อเดี่ยว, เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน
ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสอดคล้องกับผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง และ

รองลงมาคือชุดการทดลอง AC มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10.1 log CFU/mL และ 9.9 log CFU/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 และเมื่อพิจารณาถึงค่าพีเอชของ culture broth พบว่า ทุกชุดการทดลองมีการลดลงของค่าพีเอช ดังแสดงในภาพที่ 4 การเติมกลุ่มเชื้อ SC9 มีการลดลงของค่าพีเอชมากที่สุดโดยลดลงจาก 7.0 เป็น 6.4 ซึ่งสอดคล้องกับการมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย ULO มากที่สุดและมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นสูงที่สุด การลดลงของพีเอชในการย่อยสลาย ULO สอดคล้องกับการทดลองของ Hamdi และคณะ (2007) ที่ศึกษาการลดลงของสารประกอบ PAHs โดยการส่งเสริมการเจริญและการเติมเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าค่าพีเอชของทุกชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 6-7 ซึ่งการที่พีเอชลดลงนั้นเนื่องมาจากในระหว่างการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จุลินทรีย์ปล่อยสารออกมาอยู่ในรูปของโปรตอนซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน โดยมีเอนไซม์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา alicyclic alcohol จะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันและออกซิเดชัน ได้เป็นสารประกอบไดคาร์บอกซิลิกแอซิด (Juhasz, 1997) เป็นผลทำให้พีเอชมีค่าลดลง

ตารางที่ 4 ผลของการเติมเชื้อเดี่ยว, เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อ SC9 ต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

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

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของเชื้อผสมระหว่างเชื้อ *Chryseobacterium* sp. ร่วมกับ *B. cereus* (AC) จะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วดีกว่าเชื้อเดี่ยวทั้ง 2 สายพันธุ์ ในชุดการทดลอง A และ C ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีเอนไซม์ที่สามารถทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมกันในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดีกว่าเอนไซม์ของสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง แต่เมื่อใช้เชื้อ *Chryseobacterium* sp. ร่วมกับ *S. multivorum* และ *A. tumefaciens* ในชุดการลอง AB และ AC ตามลำดับ และใช้ *B. cereus* ร่วมกับ *S. multivorum* และ *A. tumefaciens* ในชุดการลอง BC และ CD ตามลำดับ นั้นให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่มีเชื้อผสม 3 สายพันธุ์ และต่ำกว่าในชุดการทดลอง AC นั้นอาจเป็นเพราะเกิดภาวะแข่งขันกันหรือแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถย่อยสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายได้จึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายต่ำ แต่มีรายงานของ Syakti และคณะ (2004) ศึกษาการทำงานร่วมกันของ *Chryseobacterium* sp. และ *Sphingomonas* sp. 2MPII ในการย่อยสลาย *n*-ecosane และ phenanthrene พบว่า สามารถย่อยสลาย *n*-ecosane ได้ 58% และย่อยสลาย phenanthrene ได้ 64% การที่เชื้อผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ (ABCD) ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่ำกว่ากลุ่มเชื้อ SC9 นั้นเป็นเพราะกลุ่มเชื้อ SC9 อาจจะมีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดนอกจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่แยกได้ จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดียิ่งขึ้น โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีอยู่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแบบส่งเสริมกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rosa และคณะ (2009) ที่ศึกษาการย่อยสลาย phenol ที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรม พบว่า กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์สามารถมีชีวิตอยู่ที่ความเข้มข้นของ phenol 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตรและสามารถย่อยสลาย phenol ได้เร็วกว่าเชื้อสายพันธุ์ *A. calcoaceticus* var. *anitratus* โดยการใช้กลุ่มเชื้อสามารถย่อยสลาย phenol ได้ 86.0% ในขณะที่การใช้เชื้อ *A. calcoaceticus* var. *anitratus* ย่อยสลาย phenol ได้เพียง 48.5% และมีรายงานของ Rahman และคณะ (2002) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 และ *Pseudomonas* sp. DS10-129 พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายน้ำมันดิบได้สูงที่สุดถึง 78% รองลงมาคือ *Pseudomonas* sp. DS10-129 และ *Bacillus* sp. DS6-86 สามารถย่อยสลายได้เท่ากับ 66% และ 59% ตามลำดับ แต่มีรายงานของ วิภา ต้นแพง (2546) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยใช้กลุ่มเชื้อ W3 และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. รหัส ALIP S34 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. รหัส ALIP S34 สามารถย่อยสลายสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ดีกว่ากลุ่มเชื้อ W3 ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้สมบูรณ์ในวันที่ 5 ของการทดลอง ส่วนกลุ่มเชื้อ W3 นั้นย่อยสลายสารประกอบอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ 94.1% ในวันที่ 5 ของการทดลอง และมีรายงานถึงความสามารถของจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากกลุ่มเชื้อ SC9 คือ *Chryseobacterium*

sp., *Sphingobacterium multivorum*, *Bacillus cereus* และ *Agrobacterium tumefaciens* นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิด aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon (สมศักดิ์ วังใน, 2528; Cerniglia, 1993; Syakti *et al.*, 2004; Adebusoye *et al.* 2006; Tao *et al.* 2007; Seo *et al.* 2009)

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

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นชี้ให้เห็นว่ากลุ่มเชื้อ SC9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงกว่าเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มเชื้อ SC9 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

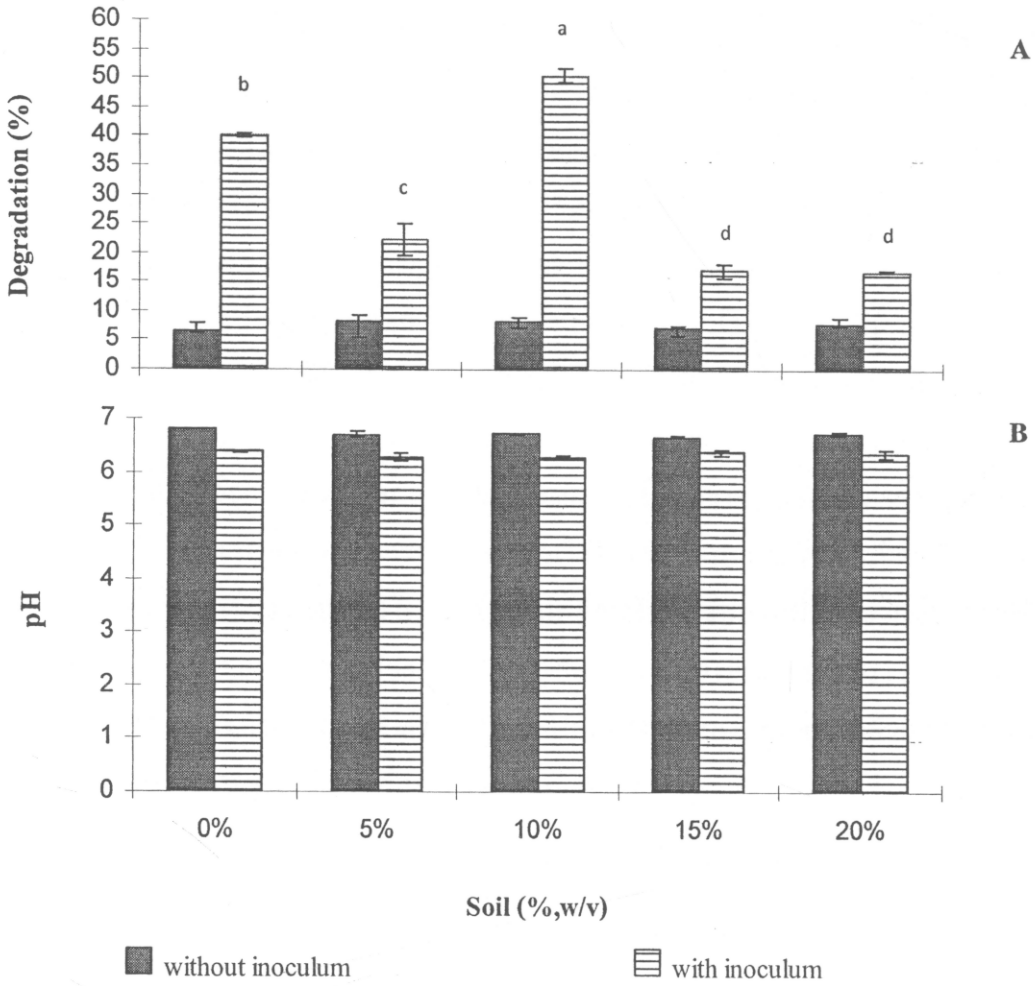
6. ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของเชื้อที่คัดเลือกได้ใน soil slurry

6.1 ผลของปริมาณดินต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 ที่ได้จากการคัดเลือก มาทำการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% ใน soil slurry โดยปรับให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7.0 log CFU/mL ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และมีการเติมดิน 0%, 5%, 10%, 15% และ 20% บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่า ชุดควบคุมมีการย่อยสลายเกิดขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากเกิดการระเหยและเกิดการย่อยสลายทางกายภาพหรือทางเคมี (abiotic degradation) (Shabir *et al.*, 2007) ในระหว่างการฆ่าเชื้อ ส่วนในชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงที่สุด คือ 50.5% รองลงมาคือชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมดิน (0%) ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO 40.0% อาจเป็นเพราะดินตัวอย่างที่เติมลงไปนั้นมีสารอาหารจำพวกไนโตรเจน (0.13%) และมีฟอสฟอรัส (0.054%) (ตารางที่ 3) สารอาหารเหล่านี้จะถูกชะออกมาจากอนุภาคของดิน จุลินทรีย์จึงนำสารอาหารที่ถูกชะมาใช้ในการเจริญ (Ramirez *et al.*, 2001) ส่วนในชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 5%, 15% และ 20% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเท่ากับ 22.3%, 17.1% และ 16.9% ตามลำดับ และในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 จะมีการอัตราการลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วคงที่แม้ว่าจะมีการเพิ่มความเข้มข้นของดินแสดงให้เห็นว่าการเกาะติด (sorption) ของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วกับอนุภาคของดินหรือสารอินทรีย์ในดินนั้นน้อยมาก (ภาพที่ 5)

การที่เติมดินลงไป 5% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมดิน (0%) นั้นอาจเป็นเพราะสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เกิดการเกาะติด (sorption) กับอนุภาคของดินหรือสารอินทรีย์ในดิน ทำให้กลุ่มเชื้อ SC9 ไม่สามารถนำสารอาหารมาใช้ในการเจริญและการย่อยสลายได้จึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่ำ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดินเป็น 10% จะให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงที่สุดในการทดลองนี้อาจเป็นเพราะเกิดความสมดุลระหว่างสารอาหารและแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลายของกลุ่มเชื้อ SC9 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของดินเป็น 15% และ 20% จะทำให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วต่ำนั้นอาจเป็นเพราะเกิดการเกาะติด (sorption) ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบใน ULO กับอนุภาคของดิน (Okuda *et al.*, 2007) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนได้จึงมีการย่อยสลายเกิดขึ้นน้อย นอกจากนี้ในบางครั้งตัวเซลล์จุลินทรีย์เองก็อาจถูกดูดติด (adsorp) ไว้กับอนุภาคดินได้ด้วย (Bai *et al.*, 1997)

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดพบว่า ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วซึ่งชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10.9 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมดินมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10.2 log CFU/mL ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของทั้ง 2 ชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันนั้น อาจเป็นเพราะชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมดิน (0%) ลงไปนั้นกลุ่มเชื้อ SC9 สามารถนำสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ไปใช้ในการเจริญและย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ดี โดยที่สารอาหารและน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วไม่ถูกเกาะติดกับอนุภาคของดิน ส่วนในชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% นั้นมีการเกาะติดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วกับอนุภาคของดินมากกว่าการเกาะติดของสารอาหาร กลุ่มเชื้อ SC9 จึงสามารถใช้สารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM รวมทั้งสารอาหารที่มีอยู่ในดินในการเจริญได้ ทำให้ช่วยเพิ่มความสามารถของจุลินทรีย์ในการเกาะจับกับน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เกาะติดกับอนุภาคของดิน จึงไม่ส่งผลต่อการเจริญและการย่อยสลายและเมื่อพิจารณาถึงค่าพีเอชของดินในสภาพของเหลวเปียกพบว่า ค่าพีเอชของชุดควบคุมคือชุดที่ไม่มีการเติมดินและไม่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 มีค่าพีเอชคงที่เนื่องจากไม่มีการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้น ในขณะที่ค่า พีเอชของชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 พีเอชมีค่าลดลงเนื่องจากเกิดการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% ซึ่งมีการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุดมีการลดลงของค่าพีเอชมากที่สุดเช่นกันคือลดลงจาก 7.0 เป็น 6.5



ภาพที่ 5 ผลของปริมาณดินต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (A) ที่ความเข้มข้น 1% และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) โดยกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน
ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 5 ผลของปริมาณดินต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเข้มข้น 1% โดยการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

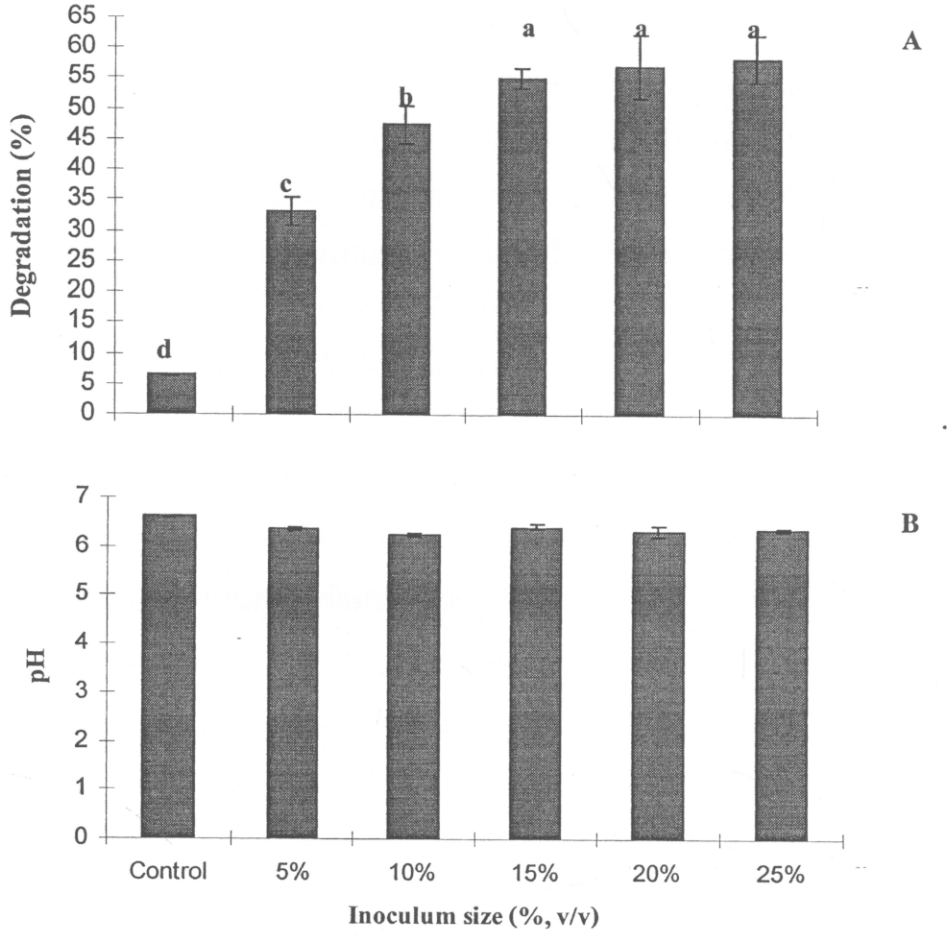
Soil (%)	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
0	10.2±0.01
5	9.9±0.01
10	10.9±0.01
15	9.6±0.01
20	9.4±0.01

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินสภาพของเหลวเปียกเป็นการเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และช่วยเพิ่มความสามารถในการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์เนื่องจากเมื่อมีดินอยู่ในระบบทำให้มีสารอาหารมากขึ้น อย่างไรก็ตามในบางกรณีความสามารถในการย่อยสลายก็อาจจะลดลงได้เนื่องจากอนุภาคดินอาจเกิดการดูดซับกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Okuda *et al.*, 2007) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินสภาพของเหลวเปียกโดยจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดิน ปริมาณสารอาหาร ปริมาณออกซิเจน และอัตราส่วนระหว่างดินและน้ำ (Li *et al.*, 2008b) Labare และ Alexander (1995) ศึกษาการบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารประกอบ PAHs ในดินสภาพของเหลวเปียกซึ่งมีอัตราส่วนของดินต่อน้ำ 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า สามารถส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลาย phenanthrene ได้ดีขึ้นจาก 4.4% เป็น 36.9% เนื่องจากน้ำจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสดังกล่าวเกิดจากดินแตกตัว ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเคลื่อนไปยังวัฏภาคน้ำได้มากขึ้น รวมทั้งเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ด้วย (Doick and Semple, 2003) เช่นเดียวกับรายงานของ Fu และ Alexander (1995) ที่ทำการบำบัดสารประกอบ PAHs ในดินสภาพของเหลวเปียกด้วยอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสามารถเพิ่มการย่อยสลาย phenanthrene ได้

จากผลการศึกษานี้ชุดการทดลองที่มีการเติมดิน 10% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกดินที่ความเข้มข้น 10% ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

6.2 ผลของปริมาณเชื้อต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7.0 log CFU/mL ปริมาณต่างกัน คือ 0%, 5%, 10%, 15%, 20% และ 25% และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน และเติมดิน 10% ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมื่อมีการเพิ่มเปอร์เซ็นต์เซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยของเชื้อสูงขึ้นความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยการใช้เซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอย 25% ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงที่สุดคือ 58.4% อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่ 15%, 20% และ 25% ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลของปริมาณกลุ่มเชื้อ SC9 ต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว (A) ที่ความเข้มข้น 1% และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอย 25% มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง โดยมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 12.7 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลองที่มีการเติมเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอย 20% และ 15% มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 12.2 log CFU/mL และ 11.1 log CFU/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ SC9 (ภาพที่ 6B) การมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมากขึ้นจะมีผลทำให้การลดลงของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพิ่มมากขึ้นด้วย (Adebusoye *et al.*, 2006) เพราะจะมีเอนไซม์ที่จำเพาะกับต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมากขึ้นส่งผลให้อัตราเร็วในการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้น (Regina *et al*,. 2006) Pathak และคณะ (2009) ศึกษาปริมาณเชื้อที่มีผลต่อการย่อยสลาย naphthalene ที่ปนเปื้อนในดิน โดยใช้เชื้อแบคทีเรียสาย

พันธุ์ *Pseudomonas* sp. HOB1 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อ *Pseudomonas* sp. HOB1 จะทำให้อัตราการย่อยสลาย naphthalene เพิ่มขึ้นด้วย โดยเมื่อใช้ปริมาณเชื้อต่ำสุดในการทดลองคือ 0.96 มิลลิลิตร ($A_{660\ nm}$ = 1.0) จะให้อัตราการย่อยสลายต่ำสุดเท่ากับ 63% ภายใน 24 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง และเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเป็น 2.3 มิลลิลิตร ($A_{660\ nm}$ = 1.0) จะให้อัตราการย่อยสลาย 100% ภายใน 24 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง

จากผลการศึกษานี้ชุดการทดลองที่มีการเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอย 15%, 20% และ 25% ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยที่ 15% ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

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

6.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

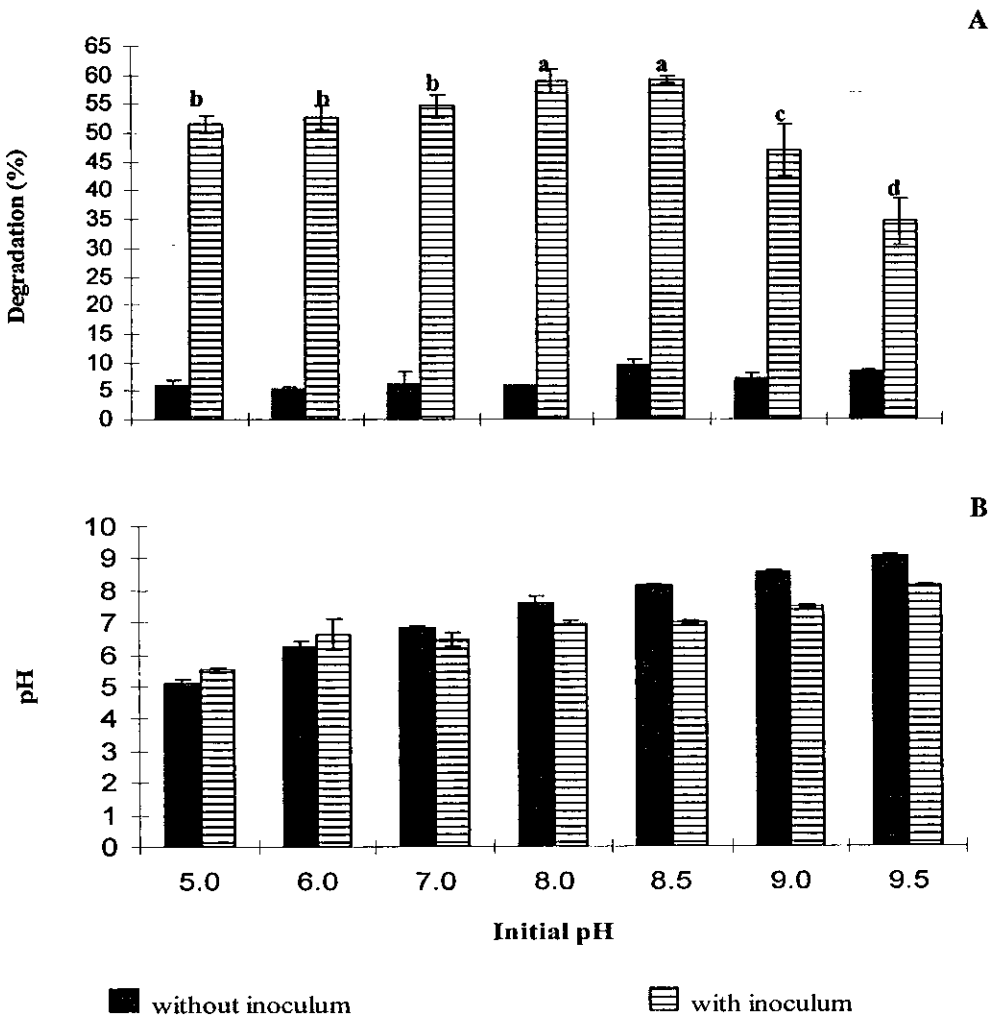
เมื่อทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 แล้วเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7.0 log CFU/mL และมี ULO 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.5 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงที่สุด คือ 59.3% รองลงมาคือชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 58.9% อย่างไรก็ตามค่าการลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่พีเอช 8.0 และ 8.5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 7) และเมื่อเพิ่มค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 9.0 และ 9.5 จะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วลดลงเป็น 47.1% และ 34.7% ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Li และคณะ (2008b) ที่ศึกษาการย่อยสลาย hexachlorobutadiene (HCBD) โดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อน HCBD และตะกอนน้ำเสียจากบ่อบำบัดของโรงงานปิโตรเคมี พบว่าเชื้อสามารถย่อยสลายสารประกอบ

HCBD ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 7 วัน ที่พีเอชเริ่มต้น 7.0, 7.5 และ 8.0 ส่วนการย่อยสลายสารประกอบ HCBD มีค่าลดลงที่พีเอช 6.0 และ 9.0 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 30.4% และ 54.4% ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Lee และคณะ (2008) ที่ศึกษาการย่อยสลายสารประกอบ cyclohexane ที่มีความแตกต่างของพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 4.7-8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลาย cyclohexane สูงที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 96.0% รองลงมาคือ ชุดที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 93.0% แต่อย่างไรก็ตามผลของของค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วย Rahman และคณะ (2002) ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากดินในบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันดีเซลประกอบด้วย *Micrococcus* sp. GS2-22, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 และ *Pseudomonas* sp. DS10-129 โดยปรับพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีค่าเท่ากับ 6.5, 7.5 และ 8.5 ตามลำดับ พบว่า ที่พีเอช 7.5 จุลินทรีย์ผสม 5 สายพันธุ์ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ 78% ภายในเวลา 20 วันที่ทำการทดลอง ส่วนที่พีเอช 8.5 จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Flavobacterium* sp. DS5-73 ให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ 43% ภายในเวลา 20 วันที่ทำการทดลอง

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.5 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.5 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และ 7.0 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.4×10 log CFU/mL และ 11.3 log CFU/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชของชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และ 6.0 มีค่าเพิ่มขึ้น การที่พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นหลังการทดลองนั้นเป็นเพราะเกิดการปลดปล่อยสาร by-product ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในระหว่างการย่อยสลายจึงทำให้พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น (Rahman *et al.*, 2003b) ซึ่งแตกต่างกับค่าพีเอชของชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 มีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 7) โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะชักนำให้เกิดการสร้างกรดอินทรีย์และสารตัวกลางชนิดอื่น ๆ ขึ้นเช่น aldehyde และ ketone เป็นต้น (Nwachukwu and Ugoji, 1995; Okpokwasili and James, 1995; Fritsche and Hofrichter, 2000) ดังนั้นกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าของพีเอชมีค่าลดลง (Oboh *et al.*, 2006) ในทุกชุดการทดลอง

โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนหรือเป็นกลาง (Dibble and Bartha, 1979; Abu and Dike, 2008) ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มเชื้อ SC9 จะมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแตกต่างกันดังรายงานของ Tao และคณะ (2007) ศึกษาผลของพีเอชต่อการย่อยสลาย phenanthrene ที่ปนเปื้อนในดินโดยใช้ *Sphingomonas* sp. GY2B ในอาหาร mineral salts medium ที่มี phenanthrene 10 มิลลิกรัมกรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาความแตกต่างของพีเอชในช่วง 6.3-8.9 พบว่า *Sphingomonas* sp. GY2B

สามารถเจริญได้ดีและสามารถย่อยสลาย phenanthrene ได้มากกว่า 90 % ในช่วงพีเอช 7.2-8.9 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจาก 2 วันที่ทำการทดลอง ส่วนที่พีเอชมีค่าเป็นกรดนั้น *Sphingomonas* sp. GY2B เจริญได้น้อยกว่าที่สภาวะพีเอชที่เป็นกลางหรือด่างอ่อนและให้อัตราการย่อยสลายต่ำกว่าด้วย หากสารละลายมีค่าพีเอชสูงหรือต่ำมากเกินไปอาจส่งผลต่อเซลล์จุลินทรีย์ เช่น ส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และค่าของซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) มีค่าเพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้โครงสร้างของเซลล์ จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถปรับตัวให้ดำรงชีวิตในช่วงที่มีสภาพเป็นกรดหรือเป็นด่างสูงได้ (Baatout *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008)



ภาพที่ 7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% (A) และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากผลการศึกษานี้ชุดการทดลองที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 8.0 และ 8.5 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้น 8.0 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% โดยการเติมดิน 10% และเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

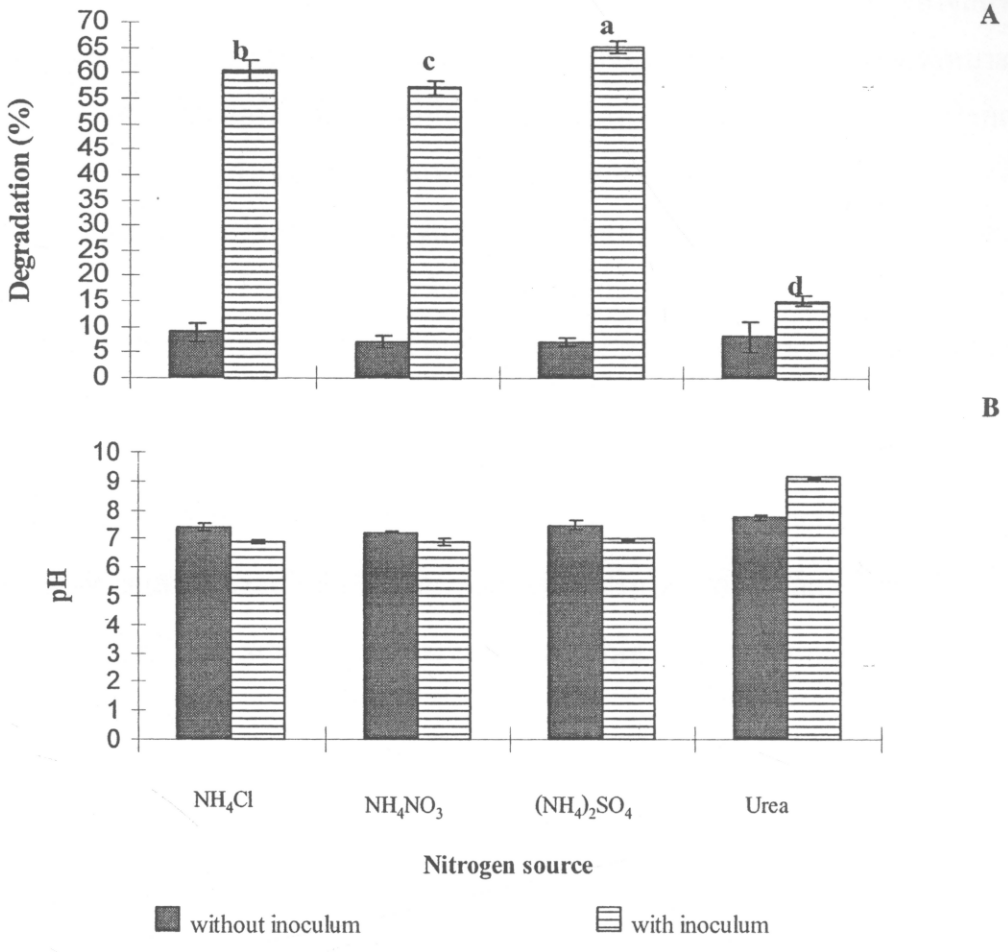
Initial pH	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
5.0	10.2±0.12
6.0	10.4±0.08
7.0	11.3±0.12
8.0	11.4±0.03
8.5	11.5±0.01
9.0	9.3±0.06
9.5	9.1±0.12

6.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

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

$(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดอาจเป็นเพราะมีปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และอยู่ในรูปแบบที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ง่าย ซึ่งการที่มีแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมนั้นสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ (Kwapisz *et al.*, 2008) อีกทั้ง $(NH_4)_2SO_4$ ยังมีซัลเฟอร์ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็คตรอนที่ดี (Newell *et al.*, 1995) และเป็นสารอาหารอีกชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเจริญของจุลินทรีย์ (Scelza *et al.*, 2007; Cameotra and Singh, 2008) สารอาหารถือเป็นส่วนสำคัญที่จะส่งเสริมให้การย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์ต้องการแหล่งไนโตรเจนเพื่อนำไปใช้ในการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิกซึ่งส่วนประกอบของเซลล์หรือสร้างพลังงานที่จำเป็นในการดำรงชีวิต (Trindade *et al.*, 2005; Shabir *et al.*, 2007)

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุดการทดลองที่มี $(NH_4)_2SO_4$ มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.4 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลองที่มี NH_4Cl มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.2 log CFU/mL ดังแสดงในตารางที่ 8 และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง ยกเว้นชุดการทดลองที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้นจากพีเอชเริ่มต้น 8.0 เป็น 9.2 หลังจาก 7 วันที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 8) และชุดการทดลองที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุดเท่ากับ 7.8 log CFU/mL ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงอาจเป็นเพราะสารละลายมีค่าพีเอชสูงมากเกินไปเนื่องมาจากยูเรียแตกตัวให้แอมโมเนียในปริมาณมาก มีความเป็นด่างสูงและเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนหรือเป็นกลาง (Abu and Dike, 2008)



ภาพที่ 8 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% (A) และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% และกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันนั้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแตกต่างกันและยังขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจนอีกด้วย จะเห็นได้จากชุดการทดลองที่เติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่ำสุด นั่นอาจเป็นเพราะอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของกลุ่มเชื้อ SC9 คือมีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไป ส่วนในชุดการทดลองที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ (100:8) แต่เมื่อมีการเติมดินลงไป 10% ก็จะทำให้มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น เพราะในดินมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ 100:5 (ตารางที่ 3) จึงทำให้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ในช่วงที่เหมาะต่อการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของกลุ่มเชื้อ SC9 ส่วนในชุดการทดลองที่มี NH_4Cl และ NH_4NO_3 เป็น

แหล่งไนโตรเจนนั้น มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์อยู่แล้ว แต่เมื่อเพิ่มดินลงไป 10% ก็จะทำให้มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเช่นกันแต่ก็ยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สังเกตได้จากผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่มีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 ชุดการทดลอง แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการย่อยสลายนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วย Barahona และคณะ (2004) ศึกษาผลของอัตราส่วนของ C:N ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันดีเซลที่ปนเปื้อนในดินของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น โดยใช้อัตราส่วนของ C:N เท่ากับ 100:10 และ 100:30 พบว่า ชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนของ C:N เท่ากับ 100:10 มีอัตราการลดลงของปริมาณน้ำมันดีเซล 67% หลังจาก 109 วันที่ทำการทดลอง

ตารางที่ 8 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน 10% และกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

Nitrogen source	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
NH_4Cl	11.2±0.15
NH_4NO_3	11.0±0.03
$(NH_4)_2SO_4$	11.4±0.04
Urea	7.8±0.03

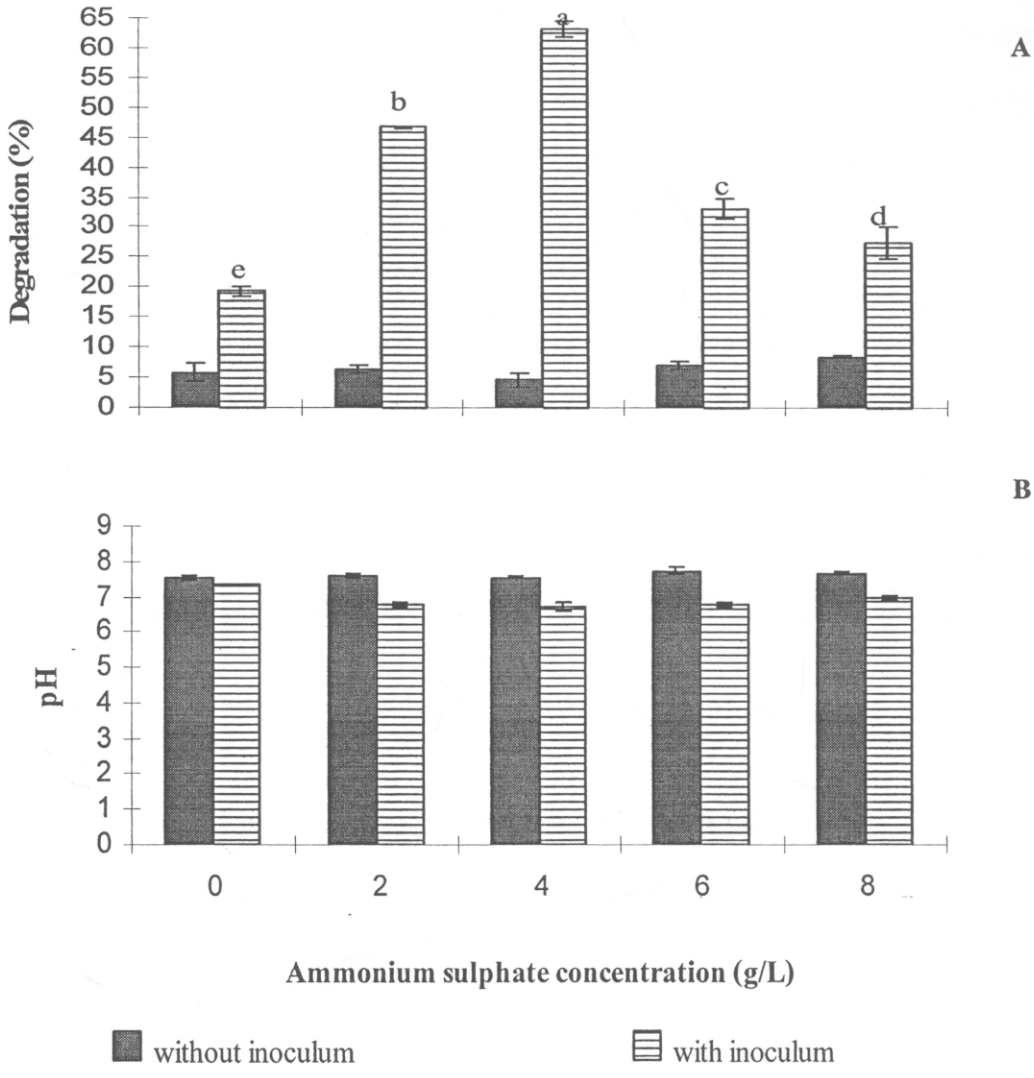
จากผลการศึกษานี้ชุดการทดลองที่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือก $(NH_4)_2SO_4$ ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองขั้นต่อไป

6.5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 กรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนแต่ละชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 100:0, 100:4, 100:8, 100:12 และ 100:16 ตามลำดับ แล้วปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 แล้วเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7.0 log CFU/mL และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในฟลาสก์

ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของ ULO สูงที่สุด คือ 63.3% รองลงมาคือชุดการทดลองที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 6.9% ดังแสดงในภาพที่ 9 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 6 และ 8 กรัมต่อลิตร พบว่าความสามารถในการย่อยสลาย น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของกลุ่มเชื้อ SC9 ค่อย ๆ ลดลง โดยปกติการเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถทำได้โดยการเติมสารอาหารอนินทรีย์ เช่น ฟอสฟอรัสและไนโตรเจนลงไปเพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ โดยทั่วไปถึงแม้จะเติมในปริมาณที่มากเกินไปก็จะไม่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Morgan and Watkinson, 1989) แต่มีรายงานการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูงประมาณ 4000 มิลลิกรัมของไนโตรเจนต่อกิโลกรัมของดิน (Genouw *et al.*, 1994) และในบางครั้งการมีสารอาหารในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก็มีผลทำให้อัตราการย่อยสลายน้อยลงเช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนควรหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มอัตราการย่อยสลาย (Huang *et al*, 2008)

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุดการทดลองที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.4 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลองที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10.2 log CFU/mL ซึ่งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วส่วนในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด คือ มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นประมาณ 7.0 log CFU/mL เป็น 8.2 log CFU/mL ดังแสดงในตารางที่ 9 การที่ในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไป มีการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเกิดขึ้นนั้นเป็นเพราะในดินที่เติมลงไปนั้นมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ 100:5 (ตารางที่ 9) สารอาหารเหล่านี้จึงถูกชะออกมาจากอนุภาคของดิน จุลินทรีย์จึงสามารถใช้สารอาหารเหล่านั้นในการเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดการย่อยสลายเกิดขึ้น (Ramirez *et al.*, 2001) และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% (A) และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% และกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

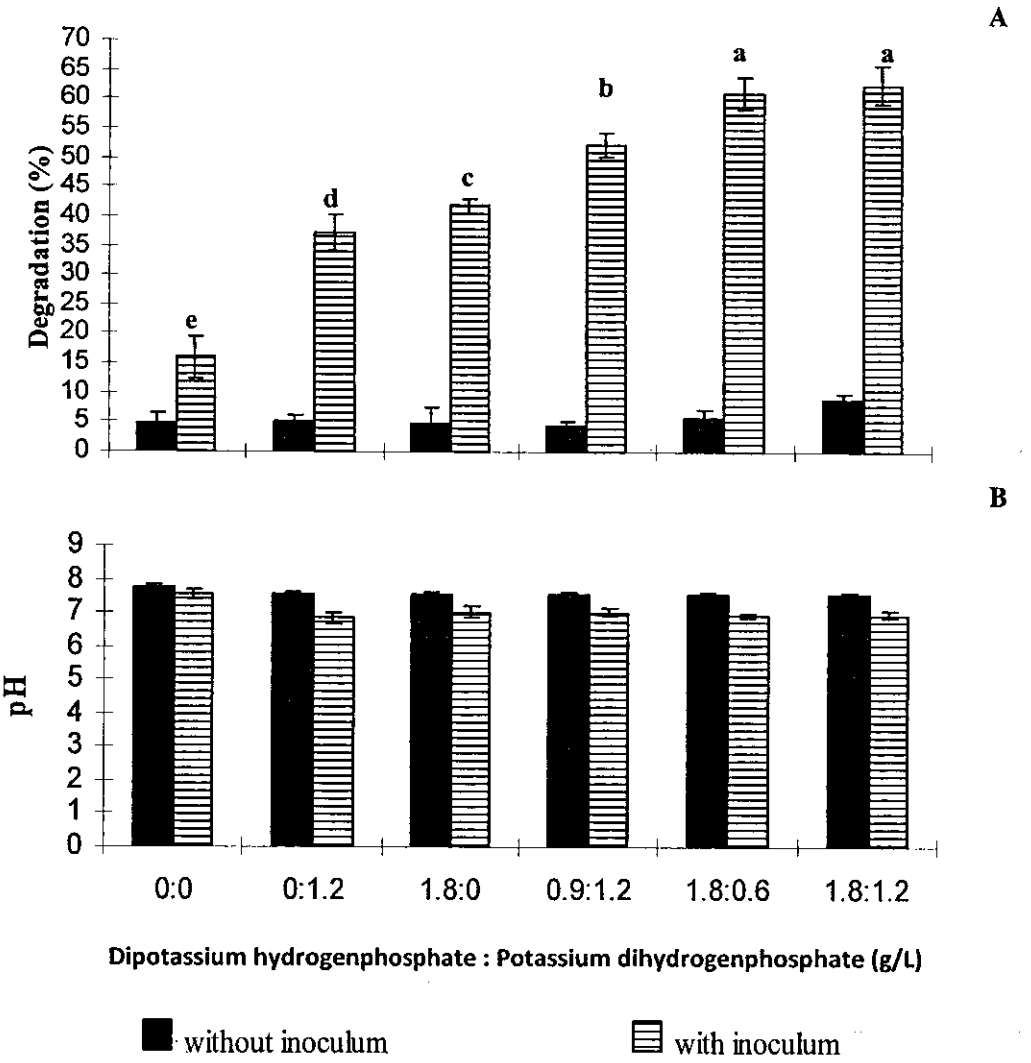
จากผลการศึกษานี้ชุดการทดลองที่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือก $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% และกลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

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

6.6 ผลของอัตราส่วนของแหล่งฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และแหล่งฟอสฟอรัส คือ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 0:0, 0:1.2, 1.8:0, 0.9:1.2, 1.8:0.6 และ 1.8:1.2 (กรัมต่อลิตร) ซึ่งอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ของแต่ละชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 100:8:0, 100:8:2.8, 100:8:3.2, 100:8:4.4, 100:8:4.6 และ 100:8:6 ตามลำดับ แล้วปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของแต่ละชุดการทดลองให้เท่ากับ 8.0 เติมน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์จุลินทรีย์ในรูปแขวนลอยลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มี K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 1.8:1.2 และ 1.8:0.6 (กรัมต่อลิตร) ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเท่ากับ 62.6% และ 61.2% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่าการลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่อัตราส่วน 1.8:1.2 และ 1.8:0.6 (กรัมต่อลิตร) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 10) ปริมาณของฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในแหล่งฟอสฟอรัสมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งฟอสฟอรัส โดย K_2HPO_4 มีปริมาณของฟอสฟอรัสมากกว่า KH_2PO_4 อยู่ 2 เท่า K_2HPO_4 จึงมีความสำคัญต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมากกว่า KH_2PO_4 ดังการทดลองหากลดปริมาณของ K_2HPO_4 ลงจึงส่งผลให้อัตราการย่อยสลายลดลงด้วย



ภาพที่ 10 ผลของอัตราส่วนของแหล่งฟอสฟอรัสต่อการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% (A) และการเปลี่ยนแปลงพีเอช (B) ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% กลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% และแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า ชุดการทดลองที่มี K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 อัตราส่วน 1.8:1.2 (กรัมต่อลิตร) มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุดใน 7 วันที่ทำการทดลอง มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.8 log CFU/mL รองลงมาคือชุดการทดลองที่มี K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 อัตราส่วน 1.8:0.6 และ 0.9:1.2 (กรัมต่อลิตร) มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 11.5 log CFU/mL และ 11.2 log CFU/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 การที่ชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งฟอสฟอรัส (0%) มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากเริ่มต้นประมาณ 7.0 log CFU/mL เป็น 9.2 log CFU/mL และมีการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเกิดขึ้นนั้นเป็นเพราะ

ในดินที่เติมลงไปมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เท่ากับ 100:5:2 (ตารางที่ 3) ฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในดินที่เติมลงไปจึงถูกชะออกมาจากอนุภาคของดิน อีกทั้งยังมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM จุลินทรีย์จึงสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในการเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดการย่อยสลายเกิดขึ้น (Ramirez *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2008) และเมื่อพิจารณาค่าพีเอชพบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 10 ผลของอัตราส่วนของแหล่งฟอสฟอรัสต่อต่อจำนวน Heterotrophic bacteria ในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% กลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% และแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

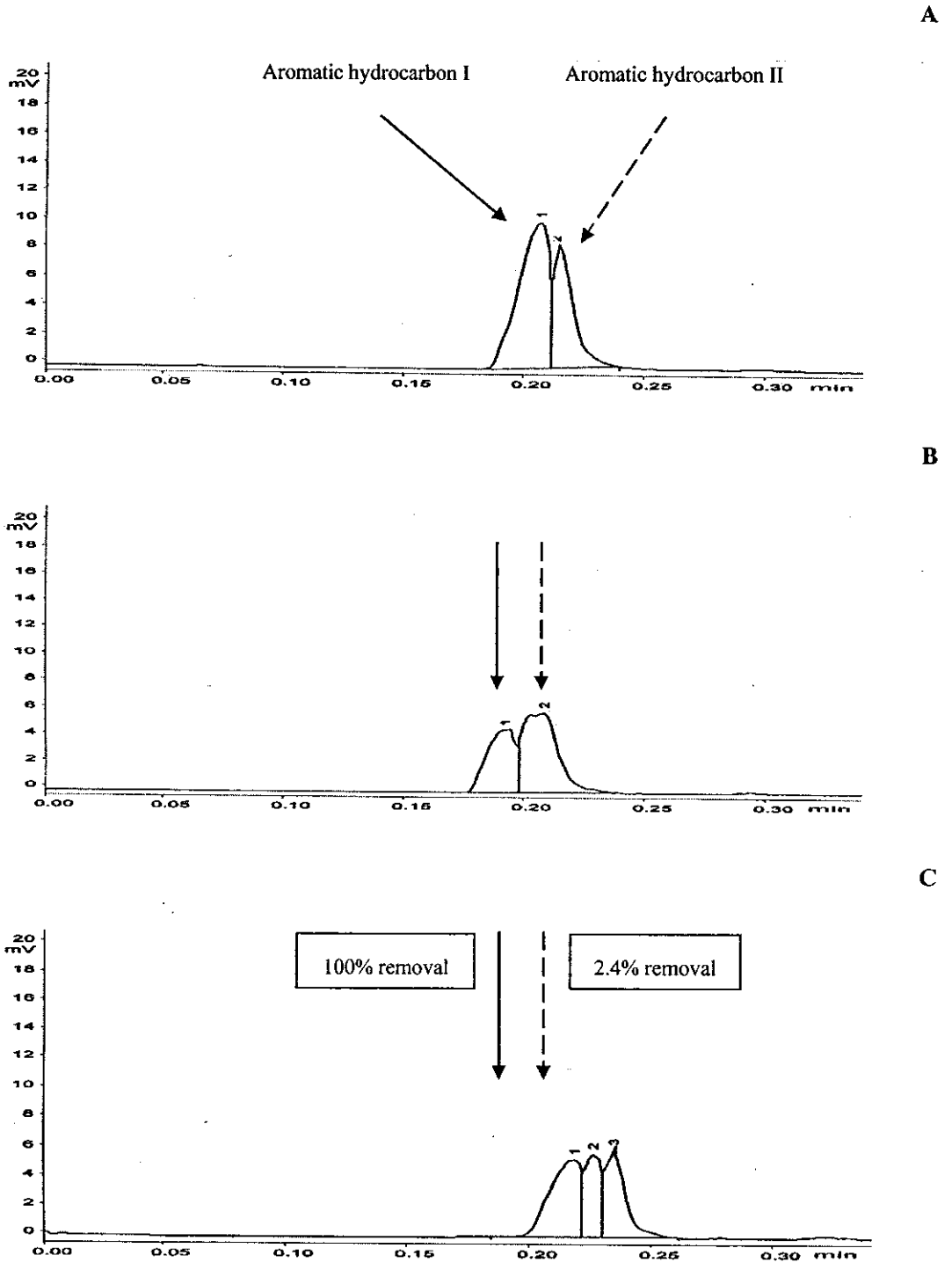
Ratio of dipotassium hydrogenphosphate : potassium dihydrogenphosphate (g/L)	Heterotrophic bacteria (Log CFU/mL)
0:0	9.2±0.11
0:1.2	10.9±0.01
1.8:0	10.9±0.06
0.9:1.2	11.2±0.08
1.8:0.6	11.5±0.01
1.8:1.2	11.8±0.13

การที่มีปริมาณของแหล่งฟอสฟอรัสที่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้นมีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพไม่น้อยไปกว่าแหล่งไนโตรเจน เพราะการที่มีแหล่งฟอสฟอรัสเพียงพอนั้นจะส่งเสริมให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) แล้วส่งผ่านออกมาภายนอกเซลล์หรืออยู่ภายในเซลล์จะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลาย โดยเอนไซม์ฟอสฟาเตสมีความสำคัญในกระบวนการลดความเป็นพิษ (detoxification) ในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Rosenberg and Alexander, 1979) ทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการเจริญได้ง่ายขึ้น ในทางตรงกันข้ามถ้ามีแหล่งฟอสฟอรัสไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เอนไซม์ฟอสฟาเตสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นก็จะมีปริมาณน้อยการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นน้อยด้วย เพราะว่าเอนไซม์ฟอสฟาเตสมีความสัมพันธ์กับปัจจัยการย่อยสลายทางชีวภาพปัจจัยอื่นด้วย เช่น จำนวนของจุลินทรีย์ อัตราการหายใจและมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ (Lee *et al.*, 2008) จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งฟอสฟอรัสจะทำให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเพิ่มมากขึ้น

แต่ในบางครั้งการเพิ่มปริมาณของฟอสฟอรัสมากเกินไปก็ไม่ได้ส่งเสริมการเจริญและการย่อยสลาย เพราะจุลินทรีย์จะสะสมฟอสฟอรัสในรูปของ apatite และสารประกอบเชิงซ้อนแคลเซียมฟอสเฟต ($Ca(H_2PO_4)_2$) (Shabir *et al.*, 2007)

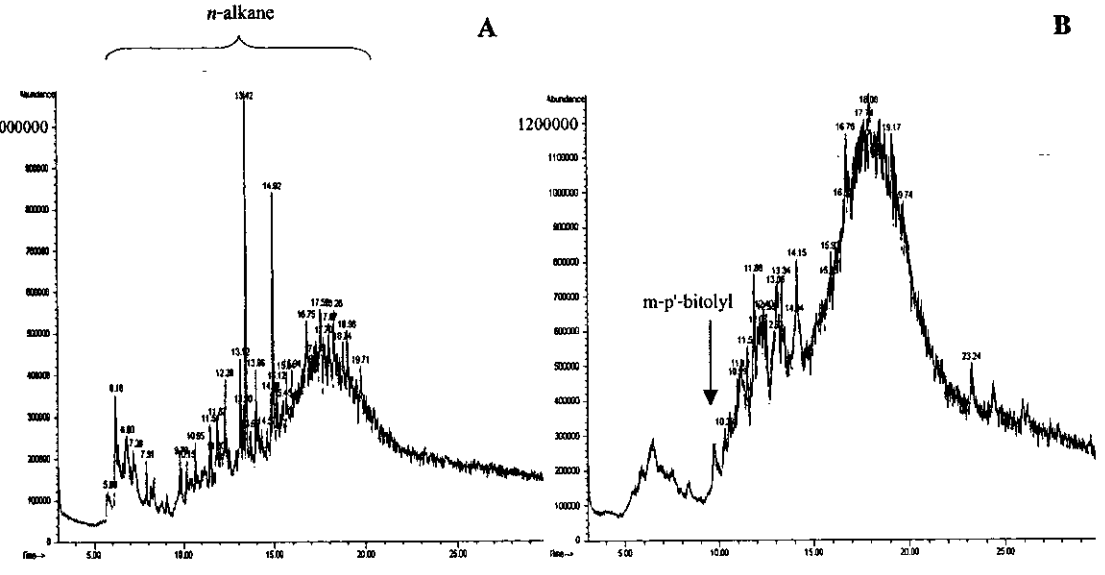
จากผลการศึกษานี้ชุดการทดลองที่มีการเติม K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 อัตราส่วน 1.8:0.6 และ 0.9:1.2 (กรัมต่อลิตร) ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือก K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตรและ KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตรเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วใน soil slurry

เมื่อนำน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ได้จากการสกัดในวันที่ 0, 7 และ 30 มาวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วย TLC-FID พบว่า มีปริมาณสาร aromatic hydrocarbon I และ aromatic hydrocarbon II ลดลง 100% และ 2.4% ตามลำดับ ในวันที่ 30 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ดังแสดงในภาพที่ 11 สาร aromatic hydrocarbon II มีปริมาณเพิ่มขึ้น 18.8% ในวันที่ 30 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 และในวันที่ 30 ของการทดลองมีสารประกอบอื่นเกิดขึ้นนอกเหนือจากสาร aromatic hydrocarbon I และ aromatic hydrocarbon II อาจเป็นเพราะเกิดการสะสมของสารตัวกลาง (intermediate) เกิดขึ้นในการย่อยสลายทางชีวภาพนั้น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะถูกย่อยสลายเป็นสารตัวกลาง หลังจากนั้นจะเกิดการสะสมของสารตัวกลางก่อนที่เกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralisation) โดยจุลินทรีย์ (Collina *et al.*, 2005)



ภาพที่ 11 TLC-FID โครมาโตแกรมของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่สกัดได้จากน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% กลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% และแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0 (A), 7 (B) และ 30 (C) วัน โดย Aromatic hydrocarbon I (RT=0.209±0.004) Aromatic hydrocarbon II (RT=0.218±0.004)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยเครื่อง TLC-FID นั้นมีข้อจำกัดคือวิเคราะห์ได้เพียงกลุ่มขององค์ประกอบของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น alkane, aromatic, resins และ asphaltene ซึ่งน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมีองค์ประกอบเป็น aromatic hydrocarbon I และ aromatic hydrocarbon II เมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC-FID ส่วนเครื่อง GC-MS นั้นสามารถวิเคราะห์ถึงรายละเอียดของแต่ละ องค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วได้ ดังนั้นจึงนำตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า องค์ประกอบในน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเริ่มต้นที่วันที่ 0 มีองค์ประกอบของสารประกอบ aliphatic hydrocarbon ที่ C_{11}-C_{29} (ภาพที่ 12A) เมื่อทำการทดลองผ่านไป 30 วัน ตรวจพบ m-p'-bitolyl (ภาพที่ 12B) และตรวจไม่พบ aliphatic hydrocarbon ที่ C_{11}-C_{29} แสดงว่ากลุ่มเชื้อ SC9 สามารถย่อยสลายสารกลุ่มดังกล่าวได้หมด



ภาพที่ 12 GC-MS โครมาโตแกรมของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่สกัดได้จากน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ความเข้มข้น 1% ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 8.0 มีดิน10% กลุ่มเชื้อ SC9 ปริมาณ 15% และแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0 (A), 30 (B) วัน

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วบริเวณอู่ซ่อมรถและปั๊มน้ำมันในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานีและสงขลาโดยวิธี enrichment culture ในอาหาร mineral salt medium (พีเอช 7.0) ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดคือ SC-9 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายร้อยละ 40 เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC-9 มาศึกษาปริมาณสูงสุดของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเท่ากับร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับร้อยละ 40.46

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

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

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของเชื้อเดี่ยว เชื้อผสมและกลุ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กล้าเชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Chryseobacterium* sp., *Sphingobacterium multivorum*, *Bacillus cereus* และ *Agrobacterium tumefaciens* และกลุ่มเชื้อ SC9 มาทำการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของเชื้อเดี่ยว เชื้อผสม และกลุ่มเชื้อ SC9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7 log CFU/mL เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ชุดการทดลองที่มีการเติมกลุ่มเชื้อ SC9 ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงที่สุด คือ 44.54%

เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วของเชื้อที่คัดเลือกได้ใน soil slurry พบว่า เมื่อนำกลุ่มเชื้อ SC9 15% เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และแหล่งฟอสฟอรัส คือ K_2HPO_4 1.8 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.6

กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 แล้วเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7 log CFU/mL และมีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แล้วเติมดินและเซลล์ซัสเพนชั่นลงไป 10% และ 15% ตามลำดับ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเท่ากับ 61.17% โดยสามารถกลุ่มเชื้อ SC9 สามารถย่อยสลาย aliphatic hydrocarbon ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 30 วัน

เอกสารอ้างอิง

พนัส งามคนกวรรณ. 2545. ปัญหาน้ำมันหล่อลื่นใช้แล้ว. วารสารโรงงาน. หน้า 51-56.

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

สมศักดิ์ วังใน. 2528. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. ไทยวัฒนาพาณิชย์. กรุงเทพฯ.

Abu, G.O. and Dike, P.O. 2008. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. Bioresour. Technol. 99: 4761-4767.

Adebusoye, S.A., Ilori, M.O., Amund, O.O., Teniola, O.D. and Olatope. S.O. 2006. Microbial degration of petroleum hydrocarbons in a polluted Tropical stream. J. Amer. Sci. 2: 48-57.

Adenipekun, C.O. and Fasidi, I.O. 2005. Bioremediation of oil-pulluted 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.

Ashok, B.T. and Saxena, S. 1995. Biodegradation of polycyclic-a review. J. Sci. Ind. Res. 54: 443-451.

Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perpective. Microbiol. Rev. 45: 180-209.

Atlas, R.M. and Atlas, M.C. 1991. Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills. Curr. Opin. Biotechnol. 2: 440-443.

Baatout, S., Leys, N., Hendrickx, L., Dams, A. and Margeay, M. 2007. Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research. Acta Astronaut. 60: 451-459.

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.

Back, R.H., Banwart, W.L. and Hassett, J.J. 1980. Introductory Soil Science a Laboratory Manual. 3rd Ed. Stipes. Lllinois.

Bai, G., Brusseau, M.L. and Miller, R.M. 1997. Influence of rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1866-1873.

Baker, H.K. and Diane, S.H. 1994. Bioremediation. Environmental Microbiology Associates. p. 10-256. McGraw-Hill. New York.

Barahona, L.M., Vázquez, R.R., Velasco, M.H., Jarquin, C.V., Pérez, O.Z., Cantú, A.M. and Albores, A. 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. Appl. Soil. Ecol. 27: 165-175.

Cameotra, S.S. and Singh, P. 2008. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. Inter. Biodeter. Biodegrad. 62: 274-280.

Cerniglia, C.E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. 4: 331-338.

Collina, E., Bestetti, G., Gennaro, P.D., Franzetti, A., Gugliersi, F., Lasagni, D. and Pitea, A. 2005. Naphthalene biodegradation kinetics in an aerobic slurry-phase bioreactor. Environ. Inter. 31: 167-171.

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. Microbail 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.

Doick, K.J. and Semple, K.T. 2003. The effect of soil: water ratio on the mineralization of phenanthrene: LNAPL mixtures in soil. FEMS Microbial. Lett. 220: 29-33.

Fritsche, W. and Hofrichter, M. 2000. Aerobic Degradation by Microorganisms. *In* Environmental Processes. Vol. 11b. 2nd ed. (Klein, J., ed.). p. 145-155. Wiley-Vch. Germany.

Fu, M.H. and Alexander, M. 1995. Use of surfactants and slurrying to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 551-558.

Genouw, G., Naeyer, F., Meenan, P., Werf, J., Nijs, W. and Verstraete, W. 1994. Degradation of oil sludge by landfarming, a case study at the Ghent Harbour. Biodegradation. 5: 37-46.

Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B. and Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. Inter. Biodeter. Biodegrad. 54: 61-67.

Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I. and Jedidi, N. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. Soil Biol. Biochem. 39: 1926-1935.

Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F., Liu, R. L. and Li, G. 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. Mar. Pollut. Bull. 56: 1714-1718.

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 Ukpe, L.I. 1992. Biodegradation of crude oil by *Bacillus* strains 28A and 61B isolation from oil spilled soil. Waste Manage. 12: 55-60.

Jirasripongpun, K. 2002. The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil. Lett. Appl. Microbiol. 35: 296-300.

Juhasz, A.J., Britz, M.L. and Stanley, G.A. 1997. Degradation of fluoranthen, pyrene, benzo[*a*]anthracene and dibenzo[*a,h*]anthacene by *Brukholderia cepacia*. J. Appl. Microbiol. 83: 189-198.

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.

Kwapisz, E., Wszelaka, J., Marchut, O. and Bielecki, S. 2008. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7. Inter. Biodeter. Biodegrad. 61: 214-222.

Labare, M.P. and Alexander, M. 1995. Enhanced mineralization of organic compounds in non-aqueous phase liquids. Environ. Toxicol. Chem. 14: 257-265.

Leahy, J.G. and Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54: 305-315.

Lee, E.H. and Cho, K.S. 2008. Characterization of cyclohexane and hexane degradation by *Rhodococcus* sp. EC1. Chemosphere. 71: 1738-1744.

Li, M.T., Hao, L.L., Sheng, L.X. and Xu, J.B. 2008. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1. Bioresour. Technol. 99: 6878-6884.

Mandri, T. and Lin, J. 2007. Isolation and Characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazula-Natal, South Afica. 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.

Morgan, P. and Watkinson, R. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and method for soil biotreatment. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 8: 305-333.

Morgan, P. and Watkinson, R.J. 1992. Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the *in situ* biotreatment of contaminated soil and groundwater. Water. Res. 26: 73-78.

Newell, C.J., Winters, J.A., Rafai, H.S., Miller, R.N., Gonzales, J. and Wiedemeier, T.H. 1995. Modeling Intrinsic remediation with multiple electron acceptors: results from seven sites. In: Proceedings of the Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water: Provention, Detection and Restoration. National Water Well Association, Houston, TX. P. 33-47.

Nwachukwu, S.U. and Ugoji, E.O. 1995. Impacts of crude petroleum spills on microbial communities of tropical soils. Inter. J. Ecol. Environ. Sci. 21: 169-176.

Oboh, B.O., Ilori, M.O., Akinyemi, J.O. and Adebusoye, S.A. 2006. Hydrocarbon degrading potentials of bacteria isolated from a Nigerian bitumen (tarsand) deposit. Nature Sci. 3: 51-57.

Okpokwasili, G.C. and James, W.A. 1995. Microbial contamination of kerosene, gasoline and crude oil and their spoilage potentials. Mater. Org. 29: 147-156.

Okuda, T., Garduño, M.E.A., Suzuki, M., Matsui, C., Kose, T., Nishijima, W. and Okada, M. 2007. Enhancement of biodegradation of oil adsorbed on fine soils in a bioslurry reactor. Chemosphere. 68: 281-286.

Pathak, H., Kantharia, D., Malpani, A. and Madamwar, D. 2009. Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: *In vitro* studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms. J. Hazard. Mater. Article in press.

Rahman, K.S.M., Rahman, J.T., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R. and Banat, I. M. 2003b. Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresour. Technol. 90: 159-168.

Rahman, K.S.M., Rahman, J.T., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I.M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresour. Technol. 85: 257-261.

Ramirez, N., Cutright, T. and Ju, L.K. 2001. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium. Chemosphere. 44: 1079-1086.

Regina, O.E., Emuobonuvie, I.F. and Roseline, U.E. 2006. Growth responses of bacteria isolates on various concentrations of crude oil. J. Amer. Sci. 2: 13-16.

Rosa, S.M.C., Dams, R.I., Rosa, E.V., Radetski, M.R., Corrêa, A.X.R. and Radetski, C.M. 2009. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. J. Hazard. Mater. 164: 61-66.

Rosenberg, A. and Alexander, M. 1979. Microbial cleavage of various organophosphorus insecticides. Appl. Environ. Microbiol. 37: 886-891.

Scelza, R., Rao, M.A. and Gianfreda, L. 2007. Effects of compost and of bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. Soil Biol. Biochem. 39: 1303-1317.

Seo, J.S., Keum, Y.S. and Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. Inter. J. Environ. Res. Public Health. 6: 278-309.

Shabir, G., Afzal, M., Anwar, F., Tahseen, R. and Khalid, Z.M. 2007. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. Inter. Biodeter. Biodegrad. 61: 161-166.

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.

Syakti, A.D., Acquaviva, M., Gilewicz, M., Doumenq, P. and Bertrand, J.C. 2004. Comparison of *n*-eicosane and phenanthrene removal by pure and mixed cultures of two marine bacteria. Environ. Res. 96: 228-234.

Tao, X.Q., Lu, G.N., Dang, Z., Yang, C. and Yi, X.Y. 2007. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. Proc. Biochem. 42: 401-408.

Trindade, P.V.O., Sobral, L.G., Rizzo, A.C.L., Leite, S.G.F. and Soriano, A.U. 2005. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. Chemosphere. 58: 515-522.

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.

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.

Zinjarde, S.S. and Pant, A.A. 2002. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. Mar. Pollut. Bull. 44: 118-121.

Output

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

Kaewrueng, J., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2007. Isolation and screening of waste lubricating oil degrading microorganism consortia from soil. The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness". Thammasart University, Patumthani, Thailand. 9-12 October.

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

Kaewrueng, J. and Maneerat, S. 2009. The use of an SC-9 consortium in the biodegradation of soil contaminated by waste lubricating oil. The 21st Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology: A Solution to the Economic Crisis?. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 24-25 September.

นักศึกษาบัณฑิตศึกษาที่จบจากโครงการนี้

จิตติมา แก้วเรือง. 2551. การแยกและคัดเลือกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ในดิน. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นฤมล มีบุญ. 2552. การเร่งการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในดินสภาพของเหลวเปียกโดยการเติมกลุ่มจุลินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.